



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica  
i del Medi Natural

## Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

# Caracterización y validación de anticuerpos recombinantes como herramienta neurobiológica para el estudio de las conexiones sinápticas

Abraham Ortega Reboso

### Trabajo Final de Grado en Biotecnología

Curso académico 2020/2021

**Tutora Académica:**  
Esther Giraldo Reboloso

**Cotutor:**  
Pietro Fazzari

**Cotutora:**  
Ana González Manteiga

**Directora experimental:**  
María del Carmen Navarro

Valencia, julio de 2020



# **Caracterización y validación de anticuerpos recombinantes como herramienta neurobiológica para el estudio de las conexiones sinápticas**

**Resumen:** Durante el avance en el entorno científico, el uso de anticuerpos ha sido de gran utilidad para la cuantificación y localización de proteínas en las muestras biológicas. De este modo, es prioritario refinar las técnicas para hacerlas más eficaces, rápidas, y acorde con los nuevos entendimientos bioéticos.

En la actualidad, la mayor parte de los anticuerpos que se utilizan en el ámbito científico proceden de origen animal, hecho que desentaja con el principio de las Tres Erres (reemplazar, reducir y refinar). El amplio abanico de oportunidades que nos ofrece el uso de anticuerpos recombinantes no solo supone un progreso desde el punto de vista ético, sino que plantea un gran número de ventajas: una mayor velocidad y uniformidad de la producción; el abaratamiento de los procesos en ausencia de animales; y la posibilidad de cambiar la especie, isotipo y subtipo del anticuerpo, pudiendo afinar su especificidad según nos complazca.

El objetivo de este trabajo consiste en la caracterización y validación de cinco anticuerpos monoclonales recombinantes que actúan como marcadores neuronales y sinápticos. Para ello, se transfectaron los plásmidos codificantes para estos cinco anticuerpos monoclonales recombinantes en la línea celular HEK 293T. La eficacia de nuestros anticuerpos se testó para asegurar su multidisciplinariedad en procesos de Western Blot, en cultivos neuronales y en muestras histológicas cerebrales.

En conclusión, los anticuerpos recombinantes producidos servirán para reconocer marcadores neuronales y sinápticos de forma específica. No obstante, no es su única frontera, pues establecer esta tecnología tiene un impacto en la producción de anticuerpos monoclonales de relevancia médica, así como en el tratamiento de enfermedades infecciosas como el Sars-Covid19, o en terapia inmunológica u oncológica.

**Palabras Clave:** Neurobiología; anticuerpos recombinantes monoclonales; sinapsis; neurona; western blot; inmunofluorescencia; plásmidos recombinantes

**Autor:** D. Abraham Ortega Rebozo

**Lugar de realización:** Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)

**Tutora Académica:** Prof. Dra. Esther Giraldo Reboloso

**Cotutor:** Dr. Pietro Fazzari

**Cotutora:** Dña. Ana González Manteiga

**Directora experimental:** Dra. María del Carmen Navarro

**Titulación:** Grado en Biotecnología

**Curso académico:** 2020/2021

Valencia, julio de 2020

## **Characterization and validation of recombinant antibodies as a neurobiological tool for the study of synaptic connections**

**Abstract:** During the progression of the scientific environment, the use of antibodies has been very useful for the quantification and localization of proteins in biological samples. Thus, it is a priority to refine the techniques to make them more effective, faster, and in accordance with the new bioethical frames.

At present, most of the antibodies used in the scientific field are from animal origin, disagreeing with the Three Rs principle (replace, reduce and refine). The use of recombinant antibodies, besides being a more ethical choice, also represent a great number of advantages: greater speed and uniformity of production; cheaper processes in the absence of animals; and the possibility of changing the species, isotype and subtype of the antibody, being able to fine-tune its specificity as we please.

The objective of this project consists in the characterization and validation of five recombinant monoclonal antibodies that act as neuronal and synaptic markers. For this, the plasmids whose sequence codes for these five recombinant monoclonal antibodies were transfected into the HEK 293T cell line. The efficacy of our antibodies was tested to ensure their multidisciplinary in western blot processes, in neuronal cultures, and in cerebral histological samples.

In conclusion, the recombinant antibodies produced will serve to recognize neuronal and synaptic markers specifically. However, its frontiers are wider, since establishing this technology means an impact on the production of monoclonal antibodies of medical relevance, such as the treatment of infectious diseases like Sars-Covid19, or in immunological and oncological therapies.

**Key words:** Neurobiology; recombinant monoclonal antibodies; synapse; neuron; western blot; immunofluorescence; recombinant plasmids.

## **AGRADECIMIENTOS**

El punto al que he llegado tras estos años de universidad es consecuencia de todas las personas que encontré por el camino. Todas me han hecho aprender; evolucionar como individuo, como profesional, como compañero y como amigo. Llevo un trozo de cada uno de ellos en mí y los muestro con orgullo en cada paso que doy.

Así mismo, doy gracias por las personas que ya se encontraban en mi vida antes de haber comenzado esta aventura. A mis amigos de siempre, con los que ahora me ha tocado crecer desde la distancia. Estos kilómetros solo han creado vínculos más fuertes, y cada día ha sido una nueva oportunidad para volver a conocernos. Seguir siendo un espectador en vuestro camino es un regalo, porque somos apoyo e inspiración, y nada nos separa.

También agradezco a todos los profesionales que dedicaron su tiempo en mi aprendizaje. A Pietro Fazzari y Esther Giraldo por haber confiado en mí para formar parte de su entorno laboral. A Carmen Navarro, Ana González, Ángela Rodríguez y Yaiza Domínguez por haberme asesorado durante estos meses de forma tan activa con su sabiduría y paciencia. A aquel profesorado de la UPV dispuesto a transmitir su vocación en cada una de sus clases. Han labrado en mí un biotecnólogo competente, y formaron los primeros cimientos de una vida laboral.

Finalmente, mi mayor agradecimiento lo dirijo hacia mis padres, pues sin su sacrificio yo no podría estar viviendo esta oportunidad. Les debo todo lo que soy, por el amor y el apoyo incondicional que he recibido durante toda mi vida, al igual que con mi familia, y en especial, mis abuelos, quienes siempre creyeron en mí.

# ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1. 1.	1. El rol de los anticuerpos en el sistema inmune.....	1
1. 1. 2.	Estructura y tipos de anticuerpos .....	2
1. 2. 1.	Anticuerpos policlonales y monoclonales .....	5
1. 2. 2.	Aspectos éticos y propuesta de mejora.....	6
1. 3. 1.	Anticuerpos recombinantes.....	7
1. 3. 1.	Anticuerpos recombinantes para la neurobiología.....	8
2.	Objetivos e hipótesis .....	11
3.	Materiales y métodos.....	12
3. 1. 1.	Reservorio de los plásmidos .....	12
3. 1. 2.	Miniprep: amplificación y extracción de plásmidos a pequeña escala. ....	12
3. 1. 3.	Maxiprep: amplificación y extracción de plásmidos a media escala.....	13
3. 1. 4.	Digestión de los plásmidos y electroforesis. ....	14
3. 2.	Cultivos celulares .....	14
3. 2. 1.	Línea celular HEK 293T .....	14
3. 2. 2.	Transfección de las células HEK 293T .....	15
3. 2. 3.	Cultivos neuronales primarios .....	16
3. 2. 4.	Fijación de los cultivos neuronales primarios .....	16
3. 3.	Procesado de las proteínas .....	17
3. 3. 1.	Extracción de proteínas de corteza cerebral .....	17
3. 3. 2.	Western Blot .....	17
3. 3. 3.	Concentración de anticuerpos .....	19
3. 4.	Tinción y procesado de imágenes.....	19
3. 4. 1.	Tinción inmunocitoquímica .....	19
3. 4. 2.	Tinción inmunohistoquímica.....	21
3. 4. 3.	Procesado de imágenes.....	21
4.	Resultados .....	22
4. 1.	Validación de la estructura del plásmido y su productividad.....	22
4. 2.	Producción del anticuerpo a media escala.....	24
4. 2. 1.	Caracterización de la funcionalidad en Western Blot .....	24
4. 2. 2.	Caracterización de la funcionalidad en tinción inmunocitoquímica .....	25
4. 2. 3.	Caracterización de la funcionalidad en tinción inmunohistoquímica .....	28
4. 3.	Concentración de los anticuerpos .....	28

4.	3.	1.	Prueba de concentración .....	29
4.	3.	2.	Tinción inmunocitoquímica con los anticuerpos concentrados.....	30
5.			Discusión.....	32
5.	1.		Caracterización de la actividad de los anticuerpos.....	32
5.	2.		Aplicación en el marco neurobiológico .....	33
5.	3.		Validación de su actividad frente a los anticuerpos monoclonales.....	33
6.			Conclusión .....	35
7.			Referencias .....	36
8.			Anexo.....	40

## ÍNDICE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura clásica de un anticuerpo.

**Figura 2.** Clases de anticuerpos en humano.

**Figura 3.** Sinapsis entre dos neuronas.

**Figura 4.** Funciones de los astrocitos en los que la proteína GFAP está involucrada.

**Figura 5.** Diagrama de flujos del desarrollo del experimento.

**Figura 6.** Resultados del ensayo de digestión y prueba de producción de anticuerpos.

**Figura 7.** Western Blot de las proteínas del córtex.

**Figura 8.** Tinción inmunocitoquímica de cultivo neuronal.

**Figura 9.** Tinción inmunohistoquímica de tejido cortical.

**Figura 10.** Prueba de concentración del VGlut1.

**Figura 11.** Tinción inmunocitoquímica de los anticuerpos diluidos y concentrados.

## ÍNDICE TABLAS

**Tabla 1.** Reservorio de plásmidos.

**Tabla 2.** Concentración de los plásmidos purificados tras el proceso de Miniprep.

**Tabla 3.** Concentración de los plásmidos purificados tras el proceso de Maxiprep.

**Tabla 4.** Fórmula para preparar 1000  $\mu\text{L}$  de RIPA 1x.

**Tabla 5.** Condiciones de incubación con el anticuerpo primario para las membranas del segundo experimento del Western Blot.

**Tabla 6.** Anticuerpos primarios para la tinción inmunocitoquímica.

**Tabla 7.** Anticuerpos secundarios para la tinción inmunocitoquímica.

## ABREVIATURAS

APS: Persulfato de amonio

Bp: pares de bases

BSA: Albúmina de suero bovino

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

CDR: Regiones determinantes de complementariedad

C: Región constante en las inmunoglobulinas

C<sub>H</sub>: Dominio constante de cadena pesada en las inmunoglobulinas

C<sub>L</sub>: Dominio constante de cadena ligera en las inmunoglobulinas

D: Día de cultivo

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E: Día del desarrollo embrionario

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Enzimoinmunoanálisis de adsorción

ErbB: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

Fab: Fracción de unión al antígeno en inmunoglobulinas

FBS: Suero bovino fetal

Fc: Fracción cristizable en inmunoglobulinas

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glia

GFP: Proteína verde fluorescente

H: Cadena pesada en las inmunoglobulinas

HAT: Hipoxantina-aminopterin-timidina

hIgGs: Inmunoglobulinas de solo cadena pesada

HRP: Peroxidasa de rábano picante

Ig: Inmunoglobulina

IgA: Inmunoglobulina tipo A

IgD: Inmunoglobulina tipo D

IgE: Inmunoglobulina tipo E

IgG(1-4): Inmunoglobulina tipo G subclase 1, 2, 3 y 4

IgG2(a,b): Inmunoglobulina tipo G2a o G2b

IgM: Inmunoglobulina tipo M

L: Cadena ligera en las inmunoglobulinas

LB: Caldo de lisogenia  
mAb: Anticuerpo monoclonal  
Neuregulina-HBD: Dominio de unión a la heparina de la Neuregulina 1  
NRG(1-4): Gen codificante para la Neuregulina clase 1, 2, 3 y 4  
o/n: Durante la noche  
pAb: Anticuerpo policlonal  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PEI: Polietilenamina  
PFA: Paraformaldehído  
PS: Penicilina-estreptomicina  
PVDF: Polifluoruro de vinilideno  
R-mAb: Anticuerpo monoclonal recombinante  
RCF: Fuerza Centrífuga Relativa, también conocida como Fuerza G  
RIPA: Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación  
RT: Temperatura ambiente  
RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa  
SARS-CoV-2: síndrome respiratorio agudo severo causado por el coronavirus de tipo 2  
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico  
Shank3: SH3 y dominios repetidos múltiples de anquirina 3  
TE: Tampón Tris-EDTA  
TEA: Trastorno del espectro autista  
TBS-T: Tampón de solución salina con Tris y Tween  
TEMED: Tetrametiletilendiamina  
UNESCO: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura  
VGlut(1-3): Transportador vesicular de glutamato tipo 1, 2 y 3  
V: Región variable en las inmunoglobulinas  
V<sub>H</sub>: Dominio variable de la cadena pesada de moléculas de inmunoglobulina  
V<sub>L</sub>: Dominio variable de la cadena ligera de moléculas de inmunoglobulina  
WB: Western Blot

## 1. Introducción

El cuerpo se encuentra expuesto a una gran variedad de patógenos y toxinas presentes en nuestro alrededor. En condiciones normales esto no supone ningún inconveniente, pues los organismos han desarrollado mecanismos para evitar estos ataques. Estos mecanismos se conocen como “respuesta inmune” y son abordados por el sistema inmunológico, un conjunto de moléculas, células y tejidos que actúan en conjunto para asegurar el correcto funcionamiento del organismo (Reyes Martín, E. et al., 2013).

Las capacidades del sistema inmune se pueden dividir en dos vertientes: la inmunidad natural o innata, y la inmunidad específica o adquirida. En un primer contacto con un elemento externo se activa la inmunidad natural o innata, que son aquellas defensas inespecíficas de carácter genérico, como la inflamación, la fagocitosis, o la propia barrera de la piel (Murphy, K. M., 2017). Por otro lado, se induce la inmunidad específica o adquirida, una respuesta antigénica específica que se activará en futuros encuentros con el agente infeccioso (Reyes Martín, E. et al., 2013). Un antígeno es una porción de una molécula que puede provocar una respuesta inmunitaria. En el caso de la inmunidad específica o adquirida, esta respuesta será mediada por la producción de anticuerpos (Murphy, K. M., 2017).

### 1. 1. 1. El rol de los anticuerpos en el sistema inmune

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Igs), son moléculas producidas por los linfocitos B y células plasmáticas (inmunidad específica o adquirida) (Murphy, K. M., 2017). La superficie de unión de los anticuerpos tiene la capacidad para enlazarse de forma no covalente con una amplia gama de estructuras, desde el rango de pequeñas moléculas (o haptenos), hasta moléculas de gran complejidad, como proteínas y polisacáridos. Además, esta unión es tan selectiva que son capaces de unirse de forma estrecha y específica contra los epítopos (porción de reconocimiento de un antígeno) dentro de una mezcla de moléculas distintas (Weis-García, F., & Carnahan, R. H., 2017). Como se encuentran en la sangre y en el líquido extracelular, forman la llamada “inmunidad humoral”, permitiéndoles libre acceso a los patógenos y toxinas que puedan detectar en este medio y evitando su difusión por el interior de las células y el resto del cuerpo. No obstante, su gran tamaño les impide atravesar la membrana plasmática de las células ya infectadas. Como alternativa, el sistema inmune cuenta con otro tipo de inmunidad adquirida mediada por los linfocitos T, la “inmunidad celular”. Los linfocitos T reconocerán las células infectadas por virus y por microorganismos intracelulares para orquestar la eliminación de estas células (Abbas, A. K., 2020; Murphy, K. M., 2017).

La respuesta mediada por anticuerpos precisa de la maduración de los linfocitos B. Estas células cuentan con una serie de receptores de membrana que son afines a un mismo epítipo. Si se produce un contacto estrecho entre este epítipo y el receptor de membrana, se inducirá la maduración del linfocito B (Murphy, K. M., 2017). A continuación, estos linfocitos B producirán grandes cantidades de anticuerpos, que serán secretados en el medio extracelular y tendrán una vida media de tres semanas en el organismo. Estos anticuerpos presentan la misma afinidad que los receptores de membrana de su linfocito B productor. En otras palabras, todos los anticuerpos producidos por un mismo linfocito B reconocerán el mismo epítipo (Abbas, A. K., 2020).

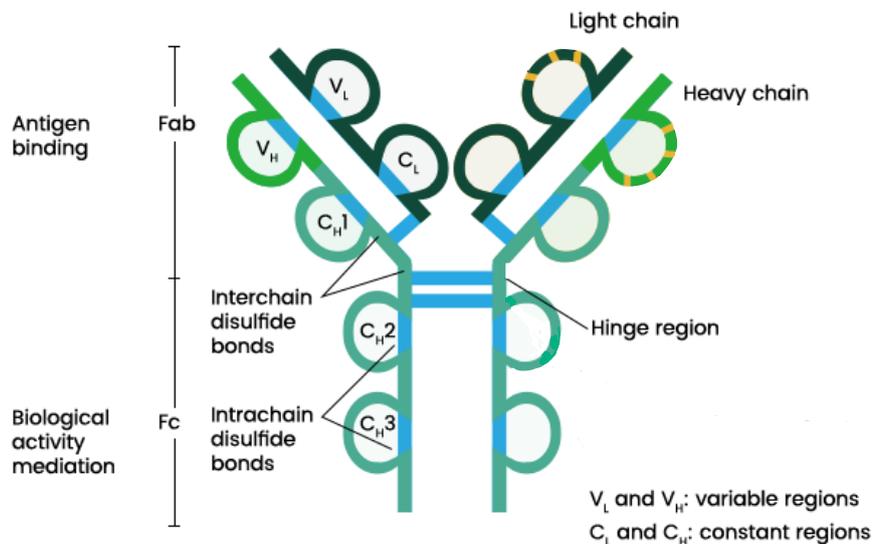
Los mecanismos de acción de los anticuerpos en el organismo son muy amplios. (1) Juegan un papel fundamental en la “neutralización”, un proceso que consiste en la unión de las inmunoglobulinas a los receptores celulares de los patógenos y sus productos. De esta forma, se bloquean sus mecanismos de entrada al interior de las células. Este proceso es muy

importante para combatir infecciones víricas, ya que evita la entrada de los viriones y su replicación en el interior de las células (Abbas, A. K., 2020). (2) La neutralización no impide la replicación bacteriana, tarea abarcada por el proceso de “opsonización”. Este mecanismo consiste en el marcaje de un patógeno para su ingestión por las células fagocíticas. El marcaje es realizado por los anticuerpos, uniéndose a la capa externa bacteriana. Finalmente, los receptores Fc de los fagocitos reconocerán la fracción constante de los anticuerpos y se dará lugar a la fagocitosis (Murphy, K. M., 2017). (3) También intervienen en la activación del complemento. El sistema del complemento es un grupo formado por treinta tipos distintos de proteínas plasmáticas que actúan en conjunto depositándose en la superficie celular de los patógenos. Los anticuerpos facilitan este tipo de adhesión, derivada en la lisis celular o en la fagocitosis. En este caso, la fagocitosis es mediada por los receptores del complemento (Reyes Martín, E. et al., 2013).

## 1. 1. 2. Estructura y tipos de anticuerpos

Los anticuerpos son moléculas pertenecientes a la familia de las glucoproteínas de tipo gamma globulina. Poseen una forma de “Y” en la que se distinguen dos regiones variables (V) idénticas, y una región constante (C) (Murphy, K. M., 2017). Tienen un gran peso molecular (150-180 kDa de media), que se distribuye en dos cadenas pesadas (H) de 55 a 70 kDa y otras dos cadenas ligeras (L) de 24 kDa (**Figura 1**) (Abbas, A. K., 2020). Las cadenas están constituidas por la repetición de dominios similares de una longitud cercana a los 110 aminoácidos, formando plegamientos discretos llamados “dominio de inmunoglobulina” (Murphy, K. M., 2017; Chiu M. L. et al., 2019).

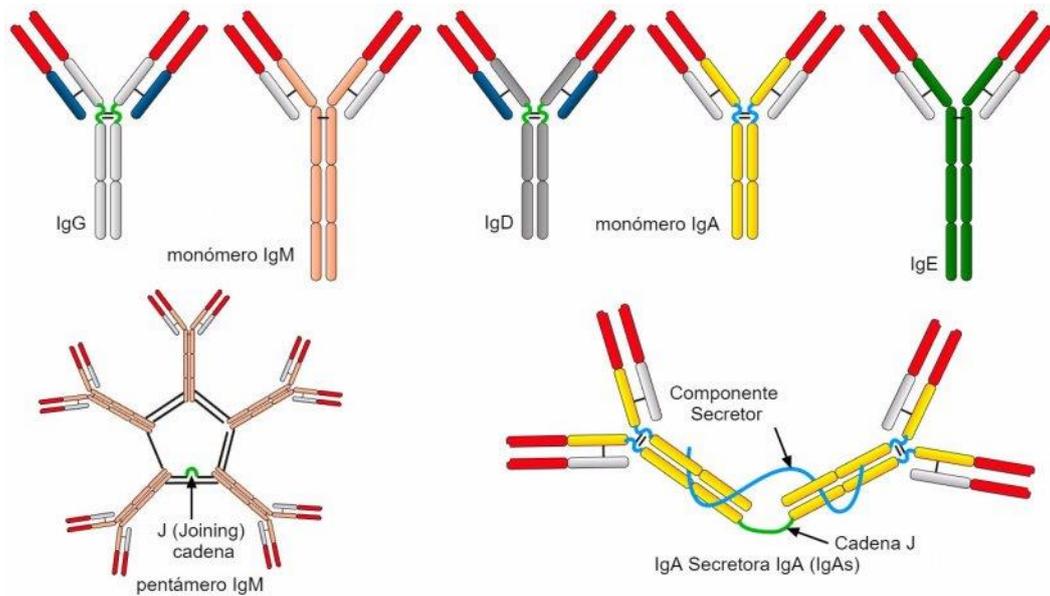
Las cadenas pesadas contienen cuatro dominios secuenciales ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $V_H$ ), mientras que las cadenas ligeras solo tienen dos ( $C_L$  y  $V_L$ ). Estas secciones se disponen de tal forma que podemos diferenciar tres dominios estructurales en un anticuerpo: una región Fc (fracción cristalizable) compuesta por  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ , y dos regiones Fab (fracción de unión al antígeno) formadas por  $C_L$  y  $V_L$  junto a  $C_{H1}$  y  $V_H$  (**Figura 1**) (Chiu M. L. et al., 2019). Cada par de cadenas es idéntico entre sí, donde las cadenas pesadas están unidas recíprocamente por puentes disulfuro y, a su vez, cada cadena pesada se une a una cadena ligera por otro puente disulfuro (Murphy, K. M., 2017). La zona en la que se encuentran las Fabs y la Fc se conoce como “dominio de bisagra”, y es una región rica en los aminoácidos prolina, treonina y serina. Esta región proporciona a la estructura movimiento lateral y rotación, favoreciendo la capacidad del anticuerpo para unirse a los antígenos en un plano tridimensional (Lipman, N. S. et al., 2005).



**Figura 1. Estructura clásica de un anticuerpo.** La estructura del anticuerpo se divide en la región Fab, destinada a la unión del antígeno, y la región Fc, mediadora de la actividad biológica. Se distinguen las cadenas pesadas (H) en verde claro, de las cadenas ligeras (L) en verde oscuro, con sus regiones variables (V) y constantes (C). Cada cadena está compuesta por sus respectivos dominios:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $V_H$  en la cadena pesada, y  $C_L$  y  $V_L$  en la cadena ligera. Los puentes disulfuro orquestan la formación de estos dominios de cadena, así como la unión de la cadena ligera con la cadena pesada. Así mismo, los puentes disulfuro también forman el dominio de bisagra (“Hinge región”), donde se encuentran las dos cadenas pesadas (Chiu M. L. et al., 2019). Imagen modificada de la web “Antibody Structure” (ANTIBODY STRUCTURE AND FUNCTION | SINO BIOLOGICAL, 2021)

Los anticuerpos presentan disparidades estructurales entre sí. Para empezar, se pueden diferenciar dos tipos de cadena ligera, lambda ( $\lambda$ ) y kappa ( $\kappa$ ). Los anticuerpos con cadena ligera de tipo lambda son levemente más flexibles. Esta propiedad viene dada por la presencia en su cadena de un aminoácido de más. No obstante, no se han encontrado diferencias significativas entre la funcionalidad de ambos (Chiu M. L. et al., 2019). Su ratio de expresión es característico de cada especie, presentándose, por ejemplo, con una proporción  $20\kappa:1\lambda$  en ratones y  $2\kappa:1\lambda$  en humanos (Murphy, K. M., 2017). Por otro lado, los diferentes tipos de cadena pesada dan lugar a la gama de isotipos de los anticuerpos, diferenciándose en cinco clases en humanos (entre paréntesis, el nombre que recibe su cadena pesada): IgM ( $\mu$ ), IgD ( $\delta$ ), IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), and IgE ( $\epsilon$ ). Cada uno tiene un rol específico en la respuesta inmune adaptativa (**Figura suplementaria 1**) (Chiu M. L. et al., 2019).

Previamente se ha descrito la estructura del anticuerpo más común en el cuerpo humano, las IgGs, pero ciertos isotipos presentan cambios respecto a la estructura “estándar”. Las IgMs y las IgEs contienen un dominio constante de más. Así mismo, las IgMs y las IgAs presentan una glicoproteína adicional llamada “cadena J”. Esta glicoproteína les permite adoptar una disposición cuaternaria, formando dímeros y pentámeros entre ellas (**Figura 2**) (Abbas, A. K., 2020; Chiu M. L. et al., 2019). Las propiedades funcionales de las clases principales dependen de la disposición del extremo carboxilo terminal de la cadena pesada, donde no está asociada a la cadena ligera. Una vez reconocido este segmento, se inducirá una cascada metabólica específica (Murphy, K. M., 2017).



**Figura 2. Clases de anticuerpos en humanos.** Los diferentes anticuerpos se distinguen por su estructura. Las IgGs representan el modelo estándar del anticuerpo. A partir de él, una de las diferencias más notorias se encuentra en que las IgMs y las IgEs contienen un dominio más de cadena pesada. Así mismo, también muestran una distinta longitud en sus bisagras. Finalmente, las IgMs, y las IgAs son capaces de formar estructuras cuaternarias a partir de una serie de componentes, entre los que destaca la cadena J (Murphy, K. M., 2017).

En la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera se encuentra el paratopo, la región del anticuerpo encargada de unirse al antígeno. Esta zona está formada por las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), compuestas por secuencias de aminoácidos únicas que conforman el sello de identidad de cada anticuerpo (Weis-García, F., & Carnahan, R. H., 2017). La diversidad de las regiones variables de ambas cadenas se produce por recombinación genética, denominada recombinación V(D)J para la cadena pesada y recombinación VJ para la cadena ligera. En este fenómeno intervienen los genes V, D y J (**Figura suplementaria 2**) (Abbas, A. K., 2020). La combinación de segmentos de estos genes puede dar lugar hasta un valor teórico de un millón de combinaciones de secuencias distintas. Si a este hecho se le suman las modificaciones post traducciónales como la glicosilación y la sulfatación de tirosina, o las posibles mutaciones que puedan producirse en las secuencias, entendemos que este número es aún mayor, y que el sistema inmune cuenta con una gran capacidad de especialización en su tarea de reconocimiento de antígenos (Chiu M. L. et al., 2019). Cada Fab contiene seis CDRs, tres de cada cadena ( $V_L1$ ,  $V_L2$ ,  $V_L3$ ,  $V_H1$ ,  $V_H2$  y  $V_H3$ ). El CDR  $V_H3$  es el que expresa una mayor variabilidad en secuencia, longitud y estructura. Para el reconocimiento de antígenos no siempre es necesaria la colaboración de todos los CDRs (Murphy, K. M., 2017; Chiu M. L. et al., 2019).

Es importante destacar que la descripción de estos apartados representa a los anticuerpos que se pueden encontrar en humanos, en ratones, y en la mayoría de los mamíferos. Sin embargo, se ha descubierto la capacidad de ciertos mamíferos para producir anticuerpos carentes de cadena ligera. Estos anticuerpos son totalmente capaces de reconocer antígenos y de generar una respuesta inmunológica (Murphy, K. M., 2017). Los mamíferos en cuestión pertenecen a la familia de los camélidos y producen las llamadas inmunoglobulinas de solo cadena pesada (hclgGs) (Arbabi-Ghahroudi M. et al., 2017). El dominio de la región variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) de las hclgGs tiene una peculiaridad especial: en sí misma ya tiene la capacidad completa de unirse a antígenos. De este modo, se han desarrollado anticuerpos bautizados como *nanobodies* que se componen solo de estas  $V_{HS}$  (Jovčevska, I. et al., 2020). Los *nanobodies* presentan la misma afinidad, especificidad, termoestabilidad y solubilidad que los anticuerpos normales en una estructura más simple y de menor tamaño (4 nm de largo y en un peso

alrededor de los 15 kDa). Esto los convierte en anticuerpos baratos de producir, menos inmunogénicos y con una mayor capacidad de penetración en tejidos (Arbabi-Ghahroudi M. et al., 2017). Sus características los hacen herramientas ideales para las terapias anticancerígenas, pues actúan en tejidos tumorales que los anticuerpos normales no serían capaces de atravesar (Jovčevska, I. et al., 2020). A pesar de ello, su introducción en el mercado ha quedado bastante retrasada por razones de propiedad intelectual (Arbabi-Ghahroudi M. et al., 2017).

La gama de posibilidades que nos ofrece el uso de anticuerpos como terapias y herramientas de investigación es muy amplia. Este hecho ha movido la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que faciliten y abaraten su proceso de producción (Murphy, K. M., 2017). Dentro de la industria biomédica y biotecnológica se suele trabajar con inmunoglobulinas G por su gran versatilidad (Andrews, N. P. et al., 2019; Suryadevara, N. et al., 2021; Vidarsson, G. et al., 2014). Los subgrupos que conforman esta clase de inmunoglobulinas son capaces de desembocar una extensa respuesta inmunológica, y en humanos reciben el nombre de IgG1, IgG2, IgG3 y la IgG4 (Murphy, K. M., 2017). A pesar de que su estructura se mantiene altamente conservada, presentan diferencias en la disposición de las bisagras de unión y en los dominios CH2 de la región constante (Vidarsson, G. et al., 2014). En el caso de los ratones, cuyos anticuerpos serán de gran interés para este proyecto, las subclases se dividen en: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Andrews, N. P. et al., 2019). La ventaja de producir anticuerpos en modelos de ratón se basa en su bajo coste de manutención, así como su extendido uso como organismo modelo en el entorno científico (Abbas, A. K., 2020).

## **1. 2. 1. Anticuerpos policlonales y monoclonales**

En presencia de un elemento externo, los linfocitos B generan un cóctel de anticuerpos destinados a reconocer sus zonas antigénicas. Dentro de este cóctel se pueden clasificar los anticuerpos en dos grupos: anticuerpos monoclonales (mAb) y policlonales (pAb) (Murphy, K. M., 2017). Los anticuerpos monoclonales se producen en un mismo linfocito B y son uniformes a la hora de reconocer el mismo epítipo. Por el contrario, los anticuerpos policlonales son la mezcla de anticuerpos producidos por distintos linfocitos con distinta especificidad para una misma molécula (Nutt, S. L. et al., 2015).

La producción a escala industrial de los anticuerpos es posible. De este modo, la elección entre producir anticuerpos monoclonales o policlonales debe tomarse considerando los siguientes puntos:

(1) La funcionalidad de un anticuerpo depende directamente de la disponibilidad del epítipo, que podría encontrarse en una zona de difícil acceso si consideramos la tridimensionalidad de las moléculas (Chiu M. L. et al., 2019). Los anticuerpos policlonales promueven encuentros eficientes entre anticuerpo y epítipo, pero podrían producir reactividad cruzada y unirse a regiones inesperadas. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales reconocen la misma región de forma específica, pero esta región podría encontrarse en una zona de acceso restringido (Weis-García, F., & Carnahan, R. H., 2017).

(2) El mecanismo de producción a gran escala de los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales es distinto, y requerirá de un instrumental específico para cada caso. Tradicionalmente, la producción de los anticuerpos monoclonales en ratones comienza con la fusión de células tumorales de mieloma con linfocitos B. Estos linfocitos provienen de un animal inmunizado repetidamente con el antígeno deseado. Las células híbridas se seleccionan con medio HAT, y se inyectan en la cavidad intraperitoneal para inducir una ascitis. Finalmente, la población de hibridomas aumenta mientras produce un mismo anticuerpo de forma ilimitada (García Merino, A., 2011). En el caso de los anticuerpos policlonales, se introduce directamente

la molécula a la que se pretende generar inmunidad en el cuerpo del animal y se aíslan los anticuerpos de interés del suero (Morales, L. et al., 2017).

(3) Ambos métodos presentan una clara diferencia en cuanto al ritmo y coste de producción. Los anticuerpos policlonales se generan de forma más rápida, barata y sencilla, pues los anticuerpos se pueden empezar a recoger tras un par de meses de la inmunización del animal. Por el contrario, la producción de anticuerpos monoclonales puede retrasarse hasta un año completo, ya que la generación de hibridomas es una técnica muy compleja que requiere una mayor inversión monetaria y de tiempo (Lipman, N. S. et al., 2005).

(4) Finalmente, los anticuerpos monoclonales presentan una cualidad concreta que le da gran valor como elemento industrial: su homogeneidad. A pesar de que son menos resistentes a los cambios de pH, sal y variaciones en los epítomos, muestran unas propiedades uniformes que los anticuerpos policlonales no pueden ofrecer. Esto los convierte en elementos ideales a la hora de desarrollar fármacos dirigidos y marcadores celulares (Lipman, N. S. et al., 2005).

Un ejemplo actual del uso de los anticuerpos monoclonales como terapia se muestra en las infecciones por SARS-CoV-2. Mayoritariamente, los anticuerpos neutralizan el virus mediante el reconocimiento del dominio de unión de las proteínas Spike (S) del virus. Esta proteína interactúa con un receptor celular, la enzima convertidora de angiotensina 2, para fusionar sus membranas e infectar las células. Analizando la capacidad neutralizadora de ciertos anticuerpos que reconocen epítomos del dominio N-terminal de la proteína S, se planteó el diseño de anticuerpos monoclonales dirigidos como terapias frente a la infección (Suryadevara, N. et al., 2021).

## **1. 2. 2. Aspectos éticos y propuesta de mejora**

Como se ha explicado anteriormente, queda explícita la necesidad de un mediador animal a la hora de producir anticuerpos. El uso de animales en la experimentación ha sido un elemento clave para la mejora del bienestar del ser humano y de los animales en sí mismos. No obstante, es una situación que pone en entredicho nuestra moralidad y abre un gran debate cada vez más presente tanto en el mundo científico, como en la sociedad en general.

La primera legislación que tomó en cuenta el bienestar animal fue aprobada en el Parlamento británico en 1822, la cual pretendía “prevenir el trato cruel e inapropiado del ganado”. En el plano de la experimentación animal, no fue hasta 1860 cuando se empezaron a tener en cuenta las polémicas que entraron en auge, aunque el desarrollo de estas medidas legislativas se vio retrasado por la primera y la segunda guerra mundial (Rodríguez Yunta, E., 2007). De este modo, la primera vez que se contempló el bienestar animal dentro de la ley española fue en 1928, durante la reforma del código penal de Primo de Rivera. En su artículo 810.4º se consideraba como delito a “los que públicamente maltrataren a los animales domésticos o los obliguen a una fatiga excesiva”, pero fue eliminado en los siguientes códigos y no se volvió a contemplar hasta el año 1970 (Rey Sevilla, F. J., 2019). Finalmente, las primeras medidas legislativas sobre la experimentación animal en España empezaron a plasmarse en el REAL DECRETO 223/1988 del 14 de Marzo, las cuales fueron actualizadas de forma progresiva en los años venideros (ANIMALES DE LABORATORIO, 2021).

Es importante destacar la publicación en 1959 del libro “los Principios de la Técnica Experimental Humana” (del inglés “*The principles of humane experimental technique*”) por parte del zoólogo William Russell y del microbiólogo Rex Burch, pues fue uno de los detonantes que cambió el rumbo de la experimentación animal. En él se recoge un estudio sistemático de la ética en las técnicas de laboratorio, concluyendo con el enunciado del principio de las Tres Erres (3R) (Kirk, R. G. W., 2017):

- Reemplazar: apostar por métodos que eviten el uso de animales en la investigación.
- Reducir: usar el menor número de animales que permita obtener resultados significativos, así como sacar la máxima cantidad de información de un mismo animal.
- Refinar: minimizar o aliviar el dolor, sufrimiento o la angustia, asegurando el bienestar de los animales utilizados.

Este libro sirvió de base para que en 1978 se redactara la Declaración Universal de los Derechos del Animal, finalmente aprobada por la UNESCO y la ONU (Rodríguez Yunta, E., 2007). Hoy en día, hay una alta regulación en el uso de animales de laboratorio e industria.

Mantener las intenciones de este dogma en un plano actual es una responsabilidad, pues el desarrollo científico implica un crecimiento inversamente proporcional a la necesidad del uso de animales. Sin embargo, hoy en día es imposible eliminar por completo su participación en el mundo científico, pues somos incapaces de imitar un sistema biológico de forma artificial. A pesar de este obstáculo, pequeños cambios son posibles.

En el trabajo expuesto se propone una alternativa a la producción de anticuerpos monoclonales en modelos in vivo, reduciendo los perjuicios generados por las inyecciones, tumores inducidos, y el estrés provocado durante la reclusión de los animales sometidos a estos largos procesos de producción.

### **1. 3. 1. Anticuerpos recombinantes**

El desarrollo de la ingeniería genética ha permitido sintetizar anticuerpos a voluntad humana, siendo una propuesta más ética y eficiente. Entre sus principales avances se pueden destacar: la humanización de los anticuerpos, la modulación de su afinidad y funciones efectoras, y su fusión con moléculas de interés (Chiu M. L. et al., 2019; Langjahr, P., & Sotelo, P., 2016). Todo ello posibilita la creación de terapias dirigidas, pues al comprender la naturaleza y la diversidad de los epítomos asociados a enfermedades, se pueden desarrollar anticuerpos terapéuticos diseñados racionalmente (Chiu M. L. et al., 2019). Su uso en terapia no es la única frontera que los anticuerpos recombinantes (R-mAb) están dispuestos a abarcar, sino que forman una herramienta muy competente en el ámbito de la investigación. Muchas técnicas modernas (ensayos ELISA, ensayos de inmunofluorescencia, purificación de proteínas, etc.) usan anticuerpos para llevar a cabo sus funciones. Una de las posibilidades que ofrecen consiste en mezclar diferentes anticuerpos para detectar, de forma simultánea, un gran número de dianas en una misma muestra. En este principio se basa el etiquetado multiplex, una técnica que será empleada a lo largo de este estudio. El etiquetado multiplex sólo funciona si los anticuerpos utilizados proceden de distintas especies o son de diferentes isotipos, pues así se evita la reactividad cruzada (Weis-García, F., & Carnahan, R. H., 2017).

Los anticuerpos de ratón presentan una ventaja que los hacen elementos muy interesantes para el etiquetado múltiple: cada subclase de anticuerpo es eficientemente detectada por un anticuerpo secundario específico. No obstante, el mercado cuenta con un desequilibrio en su oferta: El 69% de los anticuerpos comercializados son anticuerpos IgG1, tal y como se refleja en el catálogo de ThermoFisher Scientific (Andrews, N. P. et al., 2019). Por esta razón, y a modo de facilitar la gama de elección en el mercado, los anticuerpos producidos en este estudio pertenecen al grupo de las IgG2a.

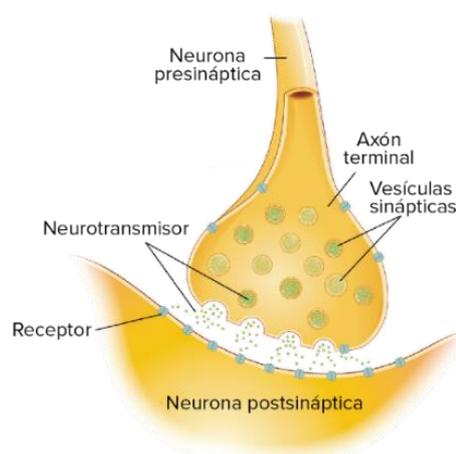
Aquí queda retratada la doble ventaja del uso de anticuerpos recombinantes en el campo científico, pues generando anticuerpos con una afinidad y estructura diseñada a conciencia se resuelven los problemas de inmunogenicidad en los pacientes y los efectos de reactividad cruzada durante el etiquetado múltiple (Andrews, N. P. et al., 2019).

Un método de producción de los anticuerpos monoclonales recombinantes parte de hibridomas ya existentes. De este modo, las colecciones de hibridomas criopreservados se immortalizan en archivos de secuencia de DNA (Langjahr, P., & Sotelo, P., 2016). Los plásmidos que se utilizarán en este estudio siguen esta metodología, generados por Andrews, N. P. et al., 2019 a partir de hibridomas usados en investigación neurológica. Inicialmente, se extrajo el RNA de los hibridomas seleccionados para sintetizar el cDNA de las cadenas que codificaban la  $V_H$  y  $V_L$  en las IgGs. Estas cadenas fueron amplificadas con un set de cebadores descritos por Crosnier C. et al. (2010). A continuación, se unieron las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  con un fragmento del plásmido P1316 para dar lugar a un único vector y, finalmente, lograr un plásmido de expresión para IgGs. Los respectivos dominios  $V_H$  y  $V_L$  de cada plásmido se seleccionaron de forma racional (Andrews, N. P. et al., 2019).

Las técnicas nombradas en esta sección también pueden ser abarcadas por anticuerpos monoclonales tradicionalmente fabricados. Sin embargo, las características que ofrecen los anticuerpos monoclonales recombinantes aseguran su futuro éxito en el mercado. En primer lugar, los hibridomas a partir de los que se producen los mAbs exigen una gran inversión económica para mantenerlos vivos, son difíciles de transportar entre laboratorios y, a pesar de que sean células “inmortales”, sus genes son inestables. La producción de R-mAb asegura su uniformidad y replicabilidad entre laboratorios bajo un mismo protocolo (Andrews, N. P. et al., 2019). Por otro lado, la producción de R-mAb entra en concordancia con el principio de las 3Rs. Esto se debe a que uno de sus postulados llama a reemplazar tanto como sea posible el uso de animales por procesos in vitro (Rodríguez Yunta, E., 2007).

### 1. 3. 1. Anticuerpos recombinantes para la neurobiología

El desarrollo de anticuerpos específicos para las estructuras cerebrales supone una herramienta de notoria importancia en la investigación neurobiológica, pues ayudan a entender los diversos mecanismos que controlan los procesos sinápticos. La sinapsis es el mecanismo de comunicación que se da entre neuronas (**Figura 3**). En este proceso, la neurona que transmite la señal es conocida como célula presináptica, y la señal será recibida por la célula postsináptica. Se pueden diferenciar dos tipos de sinapsis según el modo de transmisión de la señal: eléctrica (mediada por la liberación de iones) o química (mediada a través de la liberación de neurotransmisores). En este último caso, no existe un contacto anatómico entre las neuronas, sino que están separadas por la hendidura sináptica (Kandel, E. R. et al., 2021). Alteraciones en la funcionalidad normal de este proceso pueden dar lugar a diversas patologías neuronales, como esquizofrenia, Parkinson y Alzheimer (Fazzari, P. et al., 2010; Vigneault, É. et al., 2015).

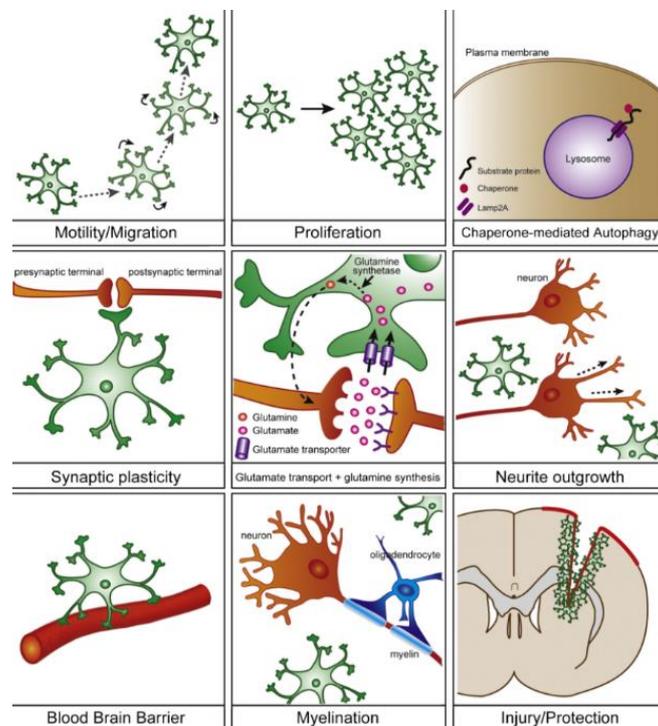


**Figura 3. Sinapsis entre dos neuronas.** En esta imagen se distingue la neurona presináptica, la que envía el mensaje, de la neurona postsináptica, que lo recibe. Como las sinapsis químicas no precisan de un contacto físico, entre estas células se sitúa la hendidura sináptica, donde se liberarán los neurotransmisores una vez alcanzado el impulso eléctrico. Los neurotransmisores están contenidos en vesículas sinápticas del axón terminal y, una vez son liberados en la hendidura sináptica, serán reconocidos por la célula postsináptica gracias a los receptores de su membrana (Kandel, E. R. et al., 2021). Imagen editada de la web OpenStax (COMMUNICATION BETWEEN NEURONS - ANATOMY AND PHYSIOLOGY | OPENSTAX., 2016).

Los anticuerpos producidos durante este proyecto detectan una serie de proteínas con un papel relevante en la sinapsis. Su desarrollo supondrá una herramienta para el estudio de las alteraciones sinápticas, así como de sus patologías. Estas proteínas de interés se pueden dividir en dos grupos: proteínas de marcaje celular (GFAP y Neuregulina 1) y proteínas sinápticas (VGlut1, VGlut2, VGlut3 y Shank3).

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es el marcador principal de los astrocitos. Los astrocitos son células altamente implicadas en las conexiones neuronales, pues no solo median estas interacciones, sino que también participan en su origen (función sinaptogénica) (Baldwin, K. T., & Eroglu, C., 2017). Así mismo, se ha descubierto su capacidad para recoger el glutamato restante tras la sinapsis y devolverlo a la neurona presináptica (Schober, A. L., & Mongin, A. A., 2015)

La proteína GFAP se expresa mayormente tras el daño cerebral, la regeneración del sistema nervioso central y en el cerebro envejecido. Es la proteína con más presencia de los filamentos intermedios en los astrocitos maduros, proporcionando resistencia mecánica a la membrana plasmática dentro del ambiente celular. Este hecho delimitó su concepción como mera proteína estructural. Sin embargo, desempeña otros papeles cruciales en el funcionamiento de los astrocitos, pues está involucrada en su actividad durante procesos como la regeneración, la plasticidad sináptica y la glicólisis reactiva (**Figura 4**) (Middeldorp, J. et al., 2011).



**Figura 4. Funciones de los astrocitos en los que la proteína GFAP está involucrada.** En la imagen se enumeran diferentes funciones de los astrocitos que los hacen elementos indispensables para el correcto funcionamiento neurológico (Middeldorp, J. et al., 2011).

Por otro lado, están las neuregulinas (NRGs), una familia de factores de crecimiento expresadas de forma pleiotrópica. Actúan a lo largo de todo el cuerpo a través de sus interacciones con los receptores tirosina kinasa de la familia ErbB (Kim B. et al., 2013). Median procesos relacionados con la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y organogénesis tanto en el sistema neuronal, como en el resto del cuerpo. Cuatro genes codifican estas proteínas señalizadoras (NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4), siendo NRG1 es el gen más caracterizado (Shi, L., & Bergson, C. M., 2020). El gen codificante de Neuregulina 1, la proteína diana en este proyecto, se presenta con más de 30 isoformas distintas. Este estudio se centra en su isoforma I y II, altamente expresadas en humanos (Fazzari, P. et al., 2014; Liu, X et al., 2011). La Neuregulina 1 se encuentra principalmente en el sistema nervioso, alcanzan su mayor nivel de expresión en el tronco encefálico y los núcleos sensoriales, neuronas motoras de la espina dorsal y los ganglios sensoriales (Kim B. et al., 2013). Un incorrecto funcionamiento de la Neuregulina 1 está relacionado con el desarrollo de cánceres y trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia o la bipolaridad (Fazzari, P. et al., 2010; Talmage D. A., 2008). El anticuerpo a producir es específico al dominio de unión a la heparina de la Neuregulina 1 tipo I y II.

Las proteínas transportadoras de glutamato vesicular (VGluts) son una familia de proteínas de localización presináptica (Liguz-Leczna, M. et al., 2007). El glutamato es un aminoácido que actúa como neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso. Las VGluts son portadores dependientes de protones cuya finalidad es la carga del neurotransmisor en las vesículas sinápticas. Finalmente, estas vesículas se fusionarán con la membrana axonal para liberar su contenido y dar lugar a la sinapsis excitatoria (Malet, M. et al., 2015). Presentan un gran interés científico debido a su implicación en numerosas patologías cerebrales, como la sordera, la enfermedad de Parkinson o el Alzheimer (Vigneault, É. et al., 2015). Un alto nivel de glutamato induce daños por neurotoxicidad, por lo que el desarrollo de terapias que afecten al funcionamiento de las VGluts propondría una posible estrategia terapéutica (Liguz-Leczna, M. et al., 2007).

VGlut1 es una de las proteínas involucradas en la carga del neurotransmisor glutamato en las vesículas sinápticas. Se encuentra principalmente en el hipocampo, neocorteza, amígdala, subículo y corteza entorrinal y piriforme. La distribución de VGlut2 se focaliza en el bulbo olfativo, la capa IV del córtex cerebral, la capa granular del giro dentado, el tálamo, el hipotálamo y en el tronco encefálico (Liguz-Leczna, M. et al., 2007). VGlut3 se concentra en el neocórtex, hipocampo, bulbo olfatorio, hipotálamo, sustancia negra y en los núcleos del rafe, aunque también tiene un rol principal en las poblaciones neuronales que forman sinapsis de tipo simétrico (Vigneault, É. et al., 2015). A excepción de los otros componentes de esta familia, VGlut3 también se puede encontrar en las dendritas y cuerpos celulares (Liguz-Leczna, M. et al., 2007). Tanto VGlut1 como VGlut2 se expresan principalmente en neuronas glutamatérgicas canónicas, mientras que VGlut3 se puede encontrar en neuronas que usan otros neurotransmisores diferentes al glutamato (Vigneault, É. et al., 2015).

Finalmente se presenta la familia de las Shanks. Estas proteínas estructurales orquestan el complejo de señalización postsináptico de las sinapsis glutamatérgicas (Peça, J. et al., 2011). La proteína postsináptica Shank3 tiene un rol crítico en el desarrollo normal de las conexiones neuronales y su disrupción causa comportamientos autistas: incremento en las conductas repetitivas, alteraciones en las conductas sociales y aumento en los patrones de ansiedad (Peça, J. et al., 2011). De este modo, se ha encontrado una estrecha relación entre la presencia de mutaciones que codifican la proteína Shank3 y el trastorno del espectro autista (TEA). Sin embargo, es difícil conectar estas condiciones como causa-efecto, porque el TEA es un fenotipo resultado de la interacción entre diversos factores (Qiu, S. et al., 2018).

## **2. Objetivos e hipótesis**

En el siguiente trabajo se llevará a cabo la caracterización y validación de cinco anticuerpos recombinantes cuyas proteínas diana están involucradas en los procesos formación, mantenimiento y función de la sinapsis. Estos anticuerpos son específicos a las siguientes proteínas: VGlut2, VGlut3, GFAP, Shank3 y Neuregulina 1 tipo I y II. Finalmente, los anticuerpos serán concentrados. Así pues, se plantean diferentes objetivos:

1. Desarrollar un protocolo de producción de estos anticuerpos en la línea celular HEK 293T.
2. Caracterizar su eficacia en distintos procesos de interés neurocientífico: western blot, inmunofluorescencia de células e inmunofluorescencia de tejido.
3. Comprobar si la efectividad de los anticuerpos se mantiene una vez son concentrados.

### 3. Materiales y métodos

#### 3. 1. 1. Reservorio de los plásmidos

Los plásmidos producidos y utilizados a lo largo del experimento proceden de la web Addgene® (Watertown, Massachusetts, EEUU), donde fueron donados por James Trimmer (Andrews, N. P. et al., 2019).

Células *E. Coli* de la cepa DH5-alpha se transformaron con los plásmidos tal y como queda reflejado en la **Tabla 1**. Las bacterias eficientemente transformadas se pudieron seleccionar gracias a la resistencia a la ampicilina que confieren estos plásmidos. Para su conservación, se almacenaron glicerizadas a -80 °C.

**Tabla 1. Reservorio de plásmidos.** Características de los plásmidos utilizados para producir los anticuerpos. Se muestra el inserto que contienen, la especie de la que provienen, su gen de resistencia y la temperatura óptima para su crecimiento

Plásmido	Inserto	Referencia	Especie	Resistencia	T° de crecimiento
N34/34.2R	anti-VGlut3	Addgene_114494	mslgG2a ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Ampicilina	37°C
N29/29R	anti-VGlut2	Addgene_114501	mslgG2a ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Ampicilina	37°C
N120A/9.1R	anti-Neuregulina-HBD	Addgene_114507	mslgG2a ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Ampicilina	37°C
N206B/9R	anti-GFAP R416WT	Addgene_114536	mslgG2a ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Ampicilina	37°C
N69/46R	anti-Shank3	Addgene_140078	mslgG2a ( <i>Rattus norvegicus</i> )	Ampicilina	37°C

#### 3. 1. 2. Miniprep: amplificación y extracción de plásmidos a pequeña escala.

La producción y purificación del plásmido a pequeña escala fue realizada a través de un kit conocido como NZYMiniprep® (MBO10, NZYTech Lda., Lisboa, Portugal). El medio utilizado para la preparación del cultivo fue caldo de lisogenia (también llamado medio LB, o *Lysogeny broth* en inglés) (10 g de NaCl/L, 10 g de triptona/L, 5 g de extracto de levadura/L y agua milli Q). En un matraz de 50 mL se añadió 10 mL de este medio y ampicilina en una dilución 1:1000 del stock (100 mg/mL).

Las bacterias se almacenaron en glicerizado dentro de la sala de ultracongelado a -80°C. Rascando con la punta de una pipeta el tubo de microcentrífuga del cultivo correspondiente, se pudo introducir cada cultivo en un matraz distinto con medio LB. Es crucial mantener las condiciones de esterilidad. Se incubaron los 5 matraces en agitación durante la noche (o/n) a 37°C.

A la mañana siguiente, se centrifugó el contenido de los matraces a 4000 RCF durante 8 minutos a temperatura ambiente (RT) para recoger todas las bacterias en un pellet y continuar con el protocolo ofrecido por el kit NZYMiniprep®.

La concentración del DNA purificado se realizó con el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EEUU) (**Tabla 2**), y se almacenaron las muestras resultantes a -20°C.

**Tabla 2. Concentración de los plásmidos purificados tras el proceso de Miniprep.**

Plásmido	Inserto	Referencia	Concentración (µg/ µL)
N34/34.2R	anti-VGlut3	Addgene_114494	0,675
N29/29R	anti-VGlut2	Addgene_114501	0,742
N120A/9.1R	anti-Neuregulina-HBD	Addgene_114507	0,612
N206B/9R	anti-GFAP R416WT	Addgene_114536	0,080
N69/46R	anti-Shank3	Addgene_140078	0,107

### 3. 1. 3. Maxiprep: amplificación y extracción de plásmidos a media escala.

De forma similar al proceso de miniprep, la producción y purificación del plásmido a media escala se realizó a través del kit NZYMaxiprep® (MB051, NZYTech Lda.). El medio utilizado para la preparación del cultivo también fue medio LB. En esta ocasión, se usó un matraz de 2 L para contener 1 L de medio de cultivo, al que se añadió ampicilina en una dilución 1:1000. Para optimizar la producción de los plásmidos, se realizó un preinóculo de las bacterias rascando el glicerinado donde se conservaban. Este preinóculo se incubó durante 3 horas en un tubo de microcentrífuga de 1 mL con medio de cultivo suplementado con ampicilina 37°C. Posteriormente, los preinóculos fueron añadidos a sus correspondientes matraces. En el caso de los plásmidos N206B/9R (anti-GFAP R416WT) y N69/46R (anti-Shank3), se dividió el contenido de sus preinóculos en dos matraces distintos para duplicar su producción, a modo de compensar el bajo rendimiento visto tras la purificación a pequeña escala (**Tabla 2**). Los 7 matraces fueron incubados o/n en agitación a 37°C.

A la mañana siguiente, se centrifugó el contenido de los matraces a 4000 RCF durante 10 minutos a 4°C para concentrar las bacterias en un precipitado y continuar con el protocolo ofrecido por el kit NZYMaxiprep®.

La concentración del DNA purificado se realizó con el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EE. UU.) (**Tabla 3**), y se almacenaron las muestras resultantes a -20°C.

**Tabla 3. Concentración de los plásmidos purificados tras el proceso de Maxiprep.**

Plásmido	Inserto	Referencia	Concentración (µg/ µL)
N34/34.2R	anti-VGlut3	Addgene_114494	0,369
N29/29R	anti-VGlut2	Addgene_114501	0,393
N120A/9.1R	anti-Neuregulin-HBD	Addgene_114507	0,696
N206B/9R	anti-GFAP R416WT	Addgene_114536	0,285
N69/46R	anti-Shank3	Addgene_140078	0,767

### **3. 1. 4. Digestión de los plásmidos y electroforesis.**

Para comprobar la integridad de los plásmidos, se desarrolló un ensayo de digestión enzimática. El diseño de las enzimas de restricción a usar se planificó a través de un estudio *in silico*, cuya estrategia consistió en buscar enzimas que cortasen dentro del inserto del plásmido y en el propio andamio donde estaban integrados. Este análisis se condujo con la información de la web Addgene® y la aplicación NEBcutter® V2.0 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.).

A continuación, cada mix de digestión se elaboró con el buffer más adecuado para su respectiva enzima: NEBuffer®3.1 para el mix de BamHI y ECORV, y NEBuffer®2.1 para el mix de BsrGI (los buffers proceden de New England Biolabs). La proporción de enzima/plásmido fue 1:1, es decir, 0.5 µL de enzima para digerir 0.5 µg de plásmido. Cada muestra se preparó en un volumen total de 50 µL, compuesto por 5 µL del buffer, 0.5 µL de la enzima, 0.5 µg de plásmido y agua libre de RNAsa para enrasar hasta el volumen final. Los 0.5 µg de plásmido se suministraron a partir de las soluciones resultantes de la miniprep, ajustadas en concordancia a su concentración. Las muestras se incubaron durante 1h a 37°C.

Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa al 1%, donde se cargaron las nueve muestras. Este se elaboró a partir de tampón TE (10 mM de Tris y 1 mM de EDTA) al 10% y agarosa (801900, Sumilab S.L., Valencia, España). Una vez disuelta la agarosa en el tampón TE, se añadió 1 µL de GelRed® (Biotium Inc., Hayward, CA, EE. UU.). Tras la gelificación, se pipetearon en los pocillos 15 µL de las muestras digeridas en tampón de carga y 5 µL del marcador NZYDNA Ladder III® (MB04401, NZYTech Lda.) para tener referencia del tamaño en pares de bases de las bandas. El gel corrió durante 45 minutos a 90V.

### **3. 2. Cultivos celulares**

#### **3. 2. 1. Línea celular HEK 293T**

Durante el proceso de producción del plásmido se trabajó con la línea celular HEK 293T (ATCC® CRL-3216™, American Type Culture Collection), una variación fácilmente transfectable de las células 293 de riñón embrionario humano. Estas células contienen el antígeno T del virus SV40, una oncoproteína comúnmente utilizada para la inmortalización de células adherentes (Freshney, 2015).

El medio de cultivo para las HEK293T es Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de Fisher Scientific™ (31600083, Thermo Fisher Scientific) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS o *Fetal Bovine Serum* en inglés) (FBS, 10735086001, Sigma-Aldrich™, Darmstadt, Alemania), L-glutamina al 1% (31095029, Fisher Scientific™) y penicilina-estreptomicina (PS) al 1% (Penicillin-Streptomycin, 15140122, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, EE. UU.). El medio con antibióticos se empleó para el desarrollo de los experimentos, mientras que el medio destinado al mantenimiento celular no se suplementó con ellos.

Del stock de células congeladas en nitrógeno líquido, se tomó una alícuota para proseguir con el cultivo. Para ello, se atemperaron las células en un baño de agua desionizada (tipo II) a 37°C. A continuación, se tomó 1 mL de células junto a 9 mL de medio DMEM. Con el propósito de eliminar el medio de congelación, las células se centrifugaron (100 g durante 10 minutos a RT) y resuspendieron en 1 mL de medio DMEM. Finalmente, el volumen resultante de células se sembró en una placa petri p100 de 55 cm<sup>2</sup> con 9 mL de medio DMEM atemperado.

La rutina de mantenimiento se programaba en intervalos de 3 días siguiendo estos pasos: se iniciaba con un lavado de tampón fosfato salino (PBS, 18912014, Fisher Scientific™). A continuación, se levantaban las células con tripsina (tripsina-EDTA Gibco®, 25300054, Fisher Scientific™) durante 30 segundos. La tripsina permite desarmar a las células de sus proteínas de anclaje y facilitar, finalmente, su dilución. El lavado del cultivo con PBS lo desprovee de los iones del medio que inactivan la acción de la tripsina. Por último, las células se resuspendían en medio de cultivo nuevo.

La dilución en la que las células se sembraban dependía de su concentración inicial y del volumen final deseado, procurando que no alcanzaran la máxima confluencia antes del siguiente día de mantenimiento. Mantener esta periodicidad es de suma importancia porque evita la acumulación de productos de desecho y el agotamiento de nutrientes (visiblemente perceptible por el amarillamiento del medio). Junto a la sobrecarga celular (superior al 90% de confluencia), son las principales razones que producen el desprendimiento y muerte de las células.

### **3. 2. 2. Transfección de las células HEK 293T**

El protocolo de transfección celular consiste en la introducción de un plásmido en el interior de las células, de modo que se sintetice su contenido con la propia maquinaria celular. Para ello, se utilizó polietilenamina (PEI, 23966-1, Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Alemania) en una proporción DNA:PEI de 1:6  $\mu\text{g}$  (1  $\mu\text{g}$  de PEI equivale a 1  $\mu\text{L}$  de PEI). La PEI es un polímero catiónico estable que condensa el DNA en una carga positiva, esto facilita su unión a membranas aniónicas como la membrana plasmática y, como resultado, las células endocitan este complejo DNA:PEI hacia el citoplasma (Longo, P. A. et al., 2013). Es crucial que las células se encuentren en una confluencia del 30% para que la transfección discurra con éxito.

Las células fueron transfectadas con dos propósitos distintos: comprobar su capacidad de producción de anticuerpos y, una vez confirmada, producirlos a media escala. Para el primer propósito se sembró una placa de 6 pocillos de 9.5 cm<sup>2</sup> por pocillo con células HEK 293T. Cinco de los seis pocillos de esta placa se destinaron para transfectar las células con cada uno de los plásmidos purificados en la maxiprep, y el restante se usó como control positivo de la transfección. Las células del control positivo se transfectaron con un plásmido cuya secuencia codifica la proteína GFP (plásmido CMV-GFP-IRES-CRE; KASPAR et al., 2002), pudiendo así monitorizar la eficiencia de la transfección en un microscopio de fluorescencia.

Cuando las células de la placa de 6 pocillos se encontraban el 30% de confluencia, se procedió a la transfección. Para cada plásmido se preparó por separado 125  $\mu\text{L}$  de DMEM sin suplementar con 1  $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico (mix A), y 125  $\mu\text{L}$  de DMEM sin suplementar con 6  $\mu\text{g}$  de PEI (mix B). El mix con DNA se añadió gota a gota en el mix B y, tras un toque de vortex, se dejó incubar 20 minutos a RT. Se añadió el contenido del mix en cada pocillo y 4 horas después se eliminó el medio de cultivo para sustituirlo con 1.5 mL de medio DMEM suplementado. Es necesario no excederse de este tiempo porque una larga exposición al PEI puede resultar tóxica para las células.

El medio de cultivo se recolectó a las 48h y 72h tras la transfección, gracias a que las células expulsan los anticuerpos sintetizados al entorno extracelular (Murphy, K. M., 2017). Cada medio se almacenó por separado añadiendo 0.02% azida con respecto al volumen total.

A la hora de producir los anticuerpos en media escala, se busca transfectar un mayor número de células. Por este motivo, se transfectaron las células contenidas en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. El proceso de transfección discurrió igual al descrito previamente, pero cambiando las cantidades:

por cada cultivo se preparó una proporción 1:6 en un volumen de 2 mL, el cual fue añadido en cada frasco hasta un volumen final de 10 mL.

Para la producción a media escala de cada anticuerpo se utilizaron 8 frascos de células, menos en el caso del N69/46R (anti-Shank3), que solo contó con dos frascos. Todo el medio recolectado fue pasado por un filtro de 0.20µm (431229, Corning, Nueva York, EE. UU.), suplementándose con azida hasta una concentración del 0.02%.

### **3. 2. 3. Cultivos neuronales primarios**

Los cultivos neuronales primarios se realizaron tal y como se describe en trabajos previos del laboratorio (Navarro-González, et al. 2019). De forma esquemática, se diseccionaron las cortezas cerebrales de embriones de ratón (E15.5) y se disgregaron enzimáticamente (tripsina-EDTA Gibco®, 25300054, Fisher Scientific™) y mecánicamente. Seguidamente, se pasaron por un filtro de 0.25 µm y se resuspendieron en medio de plaqueo (Medio Esencial Mínimo (MEM), FBS al 10%, Glucosa 30% y PS al 1%). A continuación, 110000 células/pocillo se sembraron sobre cubreobjetos de 15 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (P2636, Sigma-Aldrich™) en una placa de 12 pocillos (3.8 cm<sup>2</sup>/pocillo). A las 3h, se cambió el medio de plaqueo por medio neurobasal (21103049, Fisher Scientific™) suplementado con Glutamax 200 mM al 0.5% (35050038, Fisher Scientific™), B27 al 2% (17504044, Fisher Scientific™) y PS al 1%.

La renovación del medio asegura la accesibilidad de los nutrientes y la eliminación de los productos de desecho. Para no alterar de forma drástica las condiciones de crecimiento de las neuronas, se añadió 1 mL de medio de cultivo fresco en el día 7. A partir del día 10, la renovación del medio se hacía cada 48h con medio no suplementado con Glutamax, pues las células ya son capaces de sintetizar glutamina por sí mismas. Esta renovación se realiza eliminando 1 mL del medio antiguo y añadiendo 1 mL del medio nuevo.

### **3. 2. 4. Fijación de los cultivos neuronales primarios**

El proceso de fijación permite paralizar el metabolismo celular. Inicialmente, se aspiró el medio en el que estaban sumergidas y se lavaron con 1 mL de PBS 1x (cantidad descrita para una placa de 12 pocillos), siempre procurando deslizar el líquido por la pared del pocillo. A continuación, se aspiró el PBS y, dentro de una campana de extracción de gases, se añadió 1 mL de paraformaldehído al 4% (PFA, 158127, Sigma-Aldrich™). Tras diez minutos, se reabsorbió el PFA. Finalmente, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS 1x de diez minutos cada uno.

Los cultivos neuronales destinados a los ensayos de marcadores sinápticos fueron fijados al día 14. En el caso de las pruebas con GFAP y Neuregulina 1, se fijaron cultivos tanto al día 7 *in vitro* como en el día 14. La diferente planificación entre ambos surge por la tardía expresión de las proteínas sinápticas de las células en el cultivo, al contrario de las proteínas GFAP y Neuregulina 1, que siempre se encuentran presentes.

### 3. 3. Procesado de las proteínas

#### 3. 3. 1. Extracción de proteínas de corteza cerebral

Las proteínas se obtuvieron de la corteza de ratón adulto (tres meses de edad). Las cortezas se diseccionaron en PBS 1x frío a partir del cerebro de ratón adulto, separando la corteza izquierda y la corteza derecha para su posterior almacenaje y procesado. El tejido puede almacenarse a -80°C durante largos periodos de tiempo. Se utilizaron 500 µL de tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) 1x por corteza.

La solución RIPA se basa en un reactivo que extrae y lisa las proteínas de un tejido a través de detergentes iónicos y no iónicos. Es crucial añadir inhibidores de proteasas y fosfatasas a esta solución para evitar la ruptura de las proteínas. La fórmula para preparar 1000 µL de buffer RIPA 1x queda indicada en la **Tabla 4**. Así mismo, el RIPA 10x se compone de 50mM de NaCl, 1% Nonidet P40, 50mM Tris, 0.5% deoxicolato de sodio y 0.1% SDS.

Tabla 4. Fórmula para preparar 1000 µL de RIPA 1x.

	RIPA 10x	PMSF	Leu	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	NaF	Na <sub>4</sub> PO <sub>7</sub>	H <sub>2</sub> O
Volumen	100 µL	10 µL	10 µL	4 µL	200 µL	160 µL	516 µL

Inicialmente, se usaron microesferas de vidrio para disgregar el tejido de forma mecánica en el homogenizador FastPrep-24 (ThermoFisher Scientific™, Waltham, Ma, EEUU). Seguidamente, se incubaron durante 30 en agitación min con 500 µL de RIPA 1x en la cámara fría. Por último, las muestras se terminaron de disgregar en el sonicador (Microson™ ultrasonic cell disruptor) hasta la aparición de espuma (10-15 segundos), y se centrifugaron a 16000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C dejando una pequeña alícuota para su posterior uso.

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo en una placa de noventa y seis pocillos mediante el método Bradford. En ella se creó una curva patrón a partir de concentraciones conocidas de BSA (0 µg/mL, 25 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL y 1000 µg/mL). Tras añadir el reactivo Bradford (B6916, Sigma) a las muestras de BSA y a las muestras de corteza, se midió la absorbancia (595 nm) con el espectrofotómetro (PERKINS Wallac Victor3) para interpolar la concentración de proteínas.

#### 3. 3. 2. Western Blot

Con motivo de estudiar la presencia y eficacia de nuestros anticuerpos, se recurrió a la técnica de Western Blot siguiendo el protocolo de la compañía BioRad. Los geles utilizados eran de poliacrilamida-SDS al 10% (H<sub>2</sub>O milli Q; Tris 1.5M pH 8.8; APS 10%; SDS 10%; TEMED). Esta técnica se empleó para el desarrollo de dos experimentos: en uno se comprobaba la presencia de anticuerpos en el medio de cultivo de las células productoras, por lo que solo se incubó con el anticuerpo secundario; y en otro se probó la eficacia de estos anticuerpos a la hora de reconocer proteínas procedentes de la corteza cerebral de ratón adulto. El diseño del primer experimento analizaba 5 muestras de los diferentes medios de cultivo de las células productoras de anticuerpos, junto al medio de las células transfectadas con el plásmido codificante de GFP

actuando como blanco. Para el segundo experimento, se usaron 2 réplicas de la muestra de tejido y un blanco (agua + tampón de carga) por cada anticuerpo a probar.

Los geles se cargaron añadiendo 20  $\mu$ L de muestra y 7  $\mu$ L del tampón de migración (25mM Tris; 190mM glicina; 0.1% SDS; pH 8.3). El tamaño de las proteínas se comprobó cargando 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (26623, ThermoFisher Scientific™). Posteriormente, se inició la electroforesis a un amperaje constante de 35 mA y al máximo voltaje durante 2 horas y media a RT. El siguiente paso se basó en transferir las proteínas resultantes del gel de acrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol. Esta transferencia gel-membrana se realizó en medio húmedo. El montaje tipo sándwich se logra intercalando la membrana y el gel entre papel absorbente Whatman® (Fisher Scientific™) y esponjas. Al fijar esta estructura se evita su desplazamiento, y esta se sumerge en un recipiente repleto de tampón de transferencia (25mM Tris, 190mM Glicina). La transferencia se realizó o/n a un voltaje constante de 30V y máximo amperaje dentro de la cámara fría (4°C). Tras haber completado la transferencia, se pudo comprobar la presencia de proteínas en las membranas con la tinción Ponceau S (23966-1, Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße, Alemania). A continuación, se lavaron con TBS-T (mezcla de Tris Buffered Saline (TBS), un tampón compuesto por Tris y NaCl; y Tween (T) al 0.05%) para eliminar el Ponceau S. Seguidamente, se bloquearon las membranas con BSA al 3% (albúmina de suero bovino) durante 2 horas a RT.

Las membranas del segundo experimento se incubaron con 5 mL de anticuerpo en solución de bloqueo, cuyas diluciones quedan indicadas en la **Tabla 5**. La diferencia entre las diluciones del VGlut1 fueron planteadas para equilibrar la cantidad de anticuerpo añadida, pues los anticuerpos se concentraron 10 veces por el método de liofilización y 16 veces mediante el uso de un centricon. Esta incubación concurre o/n en agitación y a 4°C.

**Tabla 5. Condiciones de incubación con el anticuerpo primario para las membranas del segundo experimento del Western Blot.**

Anticuerpo Primario Producido	Dilución	Referencia
anti-VGlut1	1:10, 1:100 del liofilizado y 1:160 del centricon	Addgene_128638
anti-VGlut2	1:10	Addgene_114501
anti-VGlut3	1:10	Addgene_114494
anti-Neuregulin-HBD	1:10	Addgene_114507
anti-GFAP R416WT	1:10	Addgene_114536
anti-Shank3	1:10	Addgene_140078

A partir de este punto, ambos experimentos se sometieron al mismo proceso. Las membranas fueron incubadas a RT con una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-ratón HRP (en castellano, peroxidasa de rábano picante) (62-6520 de Fisher Scientific™) durante 1 h y en agitación. Una vez finalizada la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T a RT también en agitación. Se añadió a la membrana 1 mL de ELC durante 10 minutos en oscuridad (25006262, ACEFE, S.A.U. RPN2232, Gavá, España) y se reveló en la máquina de revelado Uvitec Q9 Alliance.

### 3. 3. 3. Concentración de anticuerpos

Para el concentrado de proteínas se recurrieron a dos métodos distintos: la concentración por liofilización, y la concentración usando un centricon de 30K MWCO (UFC5010, Amicon Ultra, Sigma-Aldrich™). La concentración por liofilización se apoya en la sublimación al vacío de un líquido congelado, donde el solvente es eliminado de la parte sólida. La concentración con un centricon consiste en retener los sólidos de un líquido en el filtro del centricon, por el cual pasará el líquido al ser centrifugado. Inicialmente, se concentró el anticuerpo anti-Vglut1 (previamente producido en el laboratorio a partir del plásmido plásmido N28/9R, Addgene\_128638, por el estudiante Adrián Torres) por ambos métodos a modo de comparar su rendimiento (Torres Villasante, A., 2020).

Un volumen de 10 mL del anticuerpo producido se introdujo en el bote de liofilización tras haberlos sacado de -80°C. Es importante que el contenido se mantenga congelado. El proceso duró o/n. El polvo resultante se resuspendió en un volumen final de 1ml de PBS 1x con glicerol al 50% (Sigma-Aldrich™, química SL) para favorecer su conservación.

Por otro lado, se concentraron otros 10 mL del anticuerpo producido con el centricon 30K MWCO. Se fue añadiendo poco a poco el volumen en un centricon para hacer centrifugaciones sucesivas a 2500g durante 10 minutos, continuando hasta haber filtrado todo el volumen inicial. El eludido de cada centrifugación fue recogido para comprobar si había rastro de proteínas. Por último, se centrifugó el centricon con PBS 1x hasta alcanzar un volumen final de 300 µL. Se recogió este volumen resultante de proteína y se añadieron 300 µL de glicerol y azida a una concentración final del 0.02%.

### 3. 4. Tinción y procesado de imágenes

#### 3. 4. 1. Tinción inmunocitoquímica

Los cultivos neuronales fijados fueron permeabilizados con PBS 1x y Tritón al 0.01% durante 10 minutos a RT. A continuación, se realizó un lavado instantáneo de PBS 1x, otro de 10 minutos, y se bloquearon las muestras con BSA al 3% en PBS durante 30 min a RT, previniendo las uniones inespecíficas. Cada cubre con células fue incubado toda la noche en la cámara fría con 80 µL de anticuerpo primario en base de solución de bloqueo a una dilución indicada en la **Tabla 6**. El experimento se diseñó a modo de que se pudiera estudiar la colocalización o cercanía de las proteínas contra las que los anticuerpos hibridan, así como la señal que ofrecen a diferentes diluciones, y la eficacia de estos tras ser concentrados por liofilización. A la mañana siguiente, se realizaron tres lavados de PBS 1x durante 10 minutos en los cubres y se añadieron los anticuerpos secundarios en una disolución descrita en la **Tabla 7** junto con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich™) en una dilución 1:2000, una tinción que nos permite localizar los núcleos celulares. Para comprobar también la especificidad de los anticuerpos secundarios, algunas muestras no fueron incubadas con ningún anticuerpo primario, por lo que actuaron de blanco. Se realizaron tantos ensayos de blanco como anticuerpos secundarios fueron utilizados.

**Tabla 6. Anticuerpos primarios para la tinción inmunocitoquímica.** La planificación del experimento se divide en 6 condiciones distintas, numeradas en la columna "Nº". Cada condición está caracterizada por el uso de un tipo de anticuerpo, que se administró a diferentes diluciones. Por lo tanto, en cada tinción inmunocitoquímica se añadió el anticuerpo producido a una de las diluciones indicadas y el anticuerpo comercial, que siempre se añadió a una dilución constante. De este modo, de la condición 1 se obtienen 3 tinciones distintas; de la condición 2, 6; y así de forma sucesiva. En total, se obtuvieron 21 tipo de tinciones distintas.

Nº	Anticuerpo Primario Producido	Dilución	Referencia	Anticuerpo Primario Comercial	Dilución	Referencia
1	anti-GFAP R416WT	1:50, 1:5, 1:50 del liofilizado	Addgene_114536	Anti-GFAP	1:1000	PA1-10004, Thermofisher
2	anti-VGlut1	1:50, 1:5; 1:50 y 1:500 del liofilizado; 1:80 y 1:800 del centricon	Addgene_128638	Anti-VGlut1 145	1:250	135304, Synaptic Systems
3	anti-VGlut3	1:50, 1:5, 1:50 del liofilizado	Addgene_114494	Anti-CB1	1:400	CB1-Go-Af450, AB_2571592, Frontier Institute
4	anti-Neuregulin-HBD	1:50, 1:5, 1:50 del liofilizado	Addgene_114507	Anti-Nrg 174	1:500	ANR-111, Alomone Labs
5	anti-VGlut2	1:50, 1:5, 1:50 del liofilizado	Addgene_114501	Anti-Homer1	1:250	160003, Synaptic Systems
6	anti-Shank3	1:50, 1:5, 1:50 del liofilizado	Addgene_140078			

**Tabla 7. Anticuerpos secundarios para la tinción inmunocitoquímica.** En la columna "Nº" se muestran las mismas condiciones de la **Tabla 6**. En este caso, cada condición será incubada con unos anticuerpos secundarios distintos, que serán administrados a la vez: uno reconocerá el anticuerpo producido, y otro el anticuerpo comercial. Sus diluciones son constantes.

Nº	Anticuerpo Secundario del Producido	Dilución	Referencia	Anticuerpo Secundario del Comercial	Dilución	Referencia
1	anti-ratón 555	1:500	A31570, Invitrogen	anti-pollo 488	1:500	A-11039, Thermofisher
2	anti-ratón 488	1:500	A-21202, Thermofisher	anti-cobaya 647	1:500	A21450, Invitrogen
3				anti-cabra 647	1:400	A-21447, Alexa Fluor
4				anti-conejo 555	1:500	A-31573, Life Technologies
5						
6						

### **3. 4. 2. Tinción inmunohistoquímica**

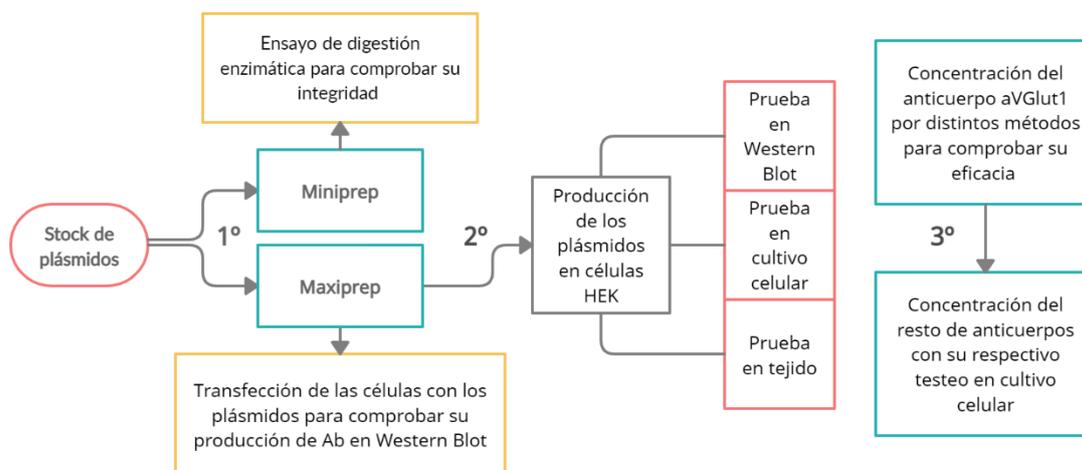
Inicialmente se cortaron unos cortes de cerebro de ratón adulto en el criostato (Microm HM 550) de 40 µm de grosor. Estos cortes fueron lavados tres veces con PBS 1x durante 15 minutos y bloqueados en solución de BSA al 3% durante 1 h y media. A continuación, los cortes se introdujeron en 150 µl de RIPA 1x con el anticuerpo primario para mantenerse en agitación y a 4°C en un periodo de dos días. Tras volver a lavar con PBS 1x, se repitió el paso anterior incubándolos solo una noche con el anticuerpo secundario. Finalmente, se concluyó con otros tres lavados de PBS 1x. El primero y el último lavado con una duración de 15 minutos, mientras que en el segundo lavado se añadió DAPI a una dilución 1:2000 y se dejó incubar durante una hora. Las muestras se preservaron fijándolas en un portaobjetos con medio de montaje Mowiol (81381-250G SIGMA-ALDRICH QUIMICA, S.L.).

Las diluciones utilizadas de los anticuerpos primarios producidos fueron 1:50 y 1:5, mientras que del anticuerpo anti-VGlut1 se incubó con una dilución 1:5, 1:50 del concentrado por liofilización, y 1:80 del concentrado por centricon. El resto de anticuerpos comerciales y secundarios se añadieron tal y como quedan expuestos en la **Tabla 6 y 7**.

### **3. 4. 3. Procesado de imágenes**

Se tomaron imágenes de los ensayos de inmunofluorescencia con el microscopio Invertido Leica DMI8 M/C/A (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y del microscopio ApoTome.2 (Zeiss, Jena, Alemania). Se ha utilizado el software de ImageJ (NIH y LOCI, University of Wisconsin, EEUU) para su procesamiento, modificando el contraste de las imágenes y aumentando la nitidez. Las imágenes de un mismo experimento se editaron con los mismos parámetros para poder comparar la efectividad del marcaje entre ellas. Finalmente, el montaje de las figuras se realizó con la aplicación Inkscape.

## 4. Resultados



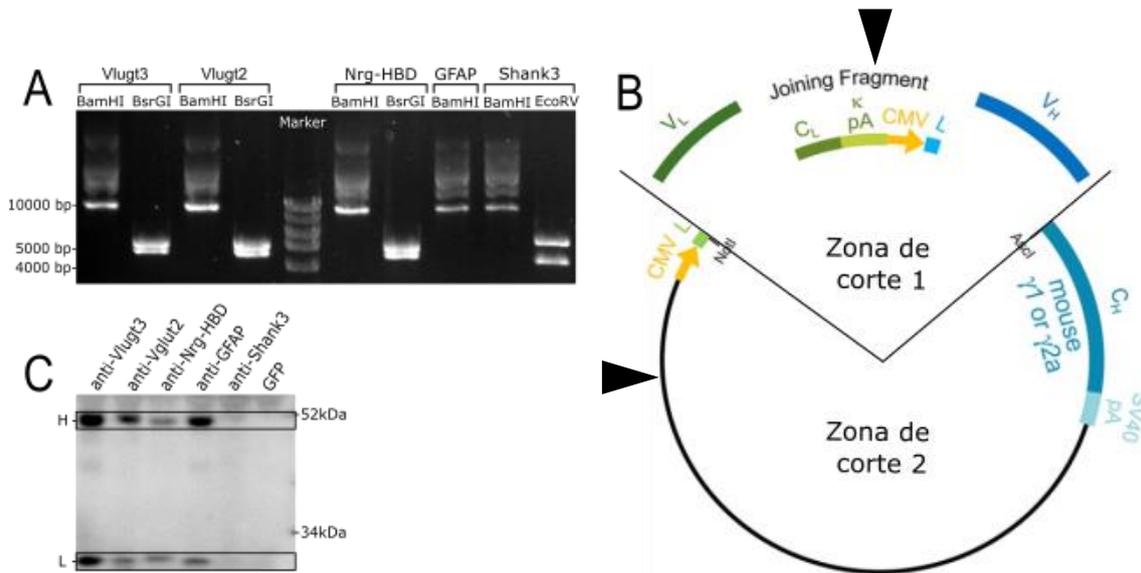
**Figura 5. Diagrama de flujos del desarrollo del experimento.** Se presenta el trabajo dividido en tres secciones. La primera corresponde a los resultados del ensayo de digestión enzimática de los plásmidos y al Western Blot del sobrenadante de los cultivos transfectados. A continuación, se probó la eficacia de los anticuerpos en un Western Blot, en una tinción inmunocitoquímica, y en una tinción inmunohistoquímica. Finalmente, se analizó cuál era el mejor método de concentración de los anticuerpos usando el anticuerpo anti-VGlut1 previamente producido por Adrián Torres (Torres Villasante, A., 2020). Se concentraron todos los anticuerpos producidos, y se comprobó su eficacia en una tinción inmunocitoquímica.

### 4. 1. Validación de la estructura del plásmido y su productividad

Los cinco plásmidos se amplificaron a pequeña escala para probar su integridad en un ensayo de enzimas de restricción. La planificación de este ensayo, tal y como se muestra en la **Tabla 8**, fue planteada con un análisis *in silico*. El análisis se realizó con la ayuda de la web Addgene y la herramienta NEBcutter V2.0, de las cuales se obtuvieron las bandas teóricas de la digestión (**Tabla 8**) a comparar con las resultantes en el gel de electroforesis (**Figura 6A**). Las enzimas escogidas cortaban doblemente el plásmido. De esta forma, se buscaba que uno de los cortes sucediera dentro de la región de inserto (“Zona de corte 1” en la **Figura 6B**), y otro en el propio andamio que lo contenía (“Zona de corte 2” en la **Figura 6B**).

**Tabla 8. Planificación del ensayo de digestión enzimática.** Los plásmidos son acompañados de las enzimas de restricción utilizadas para comprobar la integridad de su estructura, indicando en la columna “Bandas (pb)” el tamaño teórico de los fragmentos resultantes en pares de bases (pb).

Plásmido	Inserto	Tamaño (bp)	Enzima	Bandas (pb)
N34/34.2R	anti-VGlut3	9388	BamHI	885, 8503
			BsrGI	4481, 4907
N29/29R	anti-VGlut2	9364	BamHI	885, 8470
			BsrGI	4367, 4997
N120A/9.1R	anti-Neuregulin-HBD	9370	BamHI	885, 8485
			BsrGI	4463, 4907
N206B/9R	anti-GFAP R416WT	9397	BamHI	885, 8485
N69/46R	anti-Shank3	9388	BamHI	885, 8503
			EcoRV	4120, 5268



**Figura 6. Resultados del ensayo de digestión y prueba de producción de anticuerpos.** **A)** Resultado de la electroforesis tras digerir los plásmidos correspondientes con las enzimas de digestión. En la parte superior se muestra la proteína que reconoce el anticuerpo de cada plásmido. Se procuró cortar cada plásmido con dos enzimas distintas, precaviéndose de que una de las digestiones fallara. Se puede observar el mal funcionamiento de la enzima BamHI, pues el plásmido no ha sido digerido. La enzima BsrGI produce dos bandas alrededor de 5000 pb y 4000 pb respectivamente. **B)** Imagen extraída de Andrews, N. P. et al., 2019 con modificaciones. Se representa la estructura general de los plásmidos contenedores de los R-mAbs. Dos promotores CMV (amarillo) conducen la expresión de la cadena ligera (verde) y la cadena pesada (azul). Inicialmente, los productos resultantes de la PCR de los dominios variables ( $V_L$  y  $V_H$ ) se fusionaron con una región de unión que contiene un dominio constante de cadena ligera  $\kappa$  ( $C_L$ ), la secuencia de cola poliA de cadena ligera  $\kappa$  ( $\kappa$  pA), un promotor CMV destinado a la expresión de la cadena pesada, y una secuencia líder (L) para inducir la translocación de la cadena pesada por la membrana del retículo endoplasmático. Una vez fusionados estos elementos a través de una PCR, se insertaron en el plásmido p1316 que presenta un promotor CMV upstream (dirección 5') para la cadena ligera y una secuencia líder (L), que también translocará esta secuencia a través de la membrana del retículo endoplasmático. Al lado opuesto con respecto a la región de inserto (dirección 3'), hay un dominio constante de cadena pesada ( $C_H$ ) que, dependiendo del plásmido, puede ser  $\gamma_1$  o  $\gamma_2a$ . Finalmente se encuentra la cola poliA SV40 (SV40 pA) (Andrews, N. P. et al., 2019). Para el ensayo de digestión, la estrategia seguida tenía como objetivo encontrar una enzima que cortara en la "Zona de corte 1" (región del inserto) y en la "Zona de corte 2" (andamio del plásmido). Las puntas de flecha representan los lugares de corte de las enzimas de restricción. **C)** Resultado del Western Blot donde se comprobó la producción de anticuerpos en cultivo. Cada pocillo se cargó con medio de un cultivo de células HEK transfectado con el plásmido correspondiente (indicado en la parte superior de la imagen). Se puede ver la presencia de dos bandas en la mayoría de los casos, que corresponden a la cadena pesada (H) y a la cadena ligera (L), mientras que las células transfectadas con el plásmido productor de GFP actuaron como blanco.

Tras la electroforesis (**Figura 6A**) se pudo comprobar la integridad de los plásmidos anti-VLglut3, anti-VLglut2, anti-Neuregulin-HBD y anti-Shank3, pero no del anti-GFAP. La enzima BamHI no funcionó correctamente y, en este único caso, no se contaba con un replicado donde el plásmido se cortara con una enzima distinta. En el resto de digestiones, las bandas resultantes concordaron con las esperadas en la **Tabla 8**. La posible causa que justifica la inactividad de la enzima BamHI viene dada por su antigüedad, ya que pierden funcionalidad con el tiempo.

Una vez asegurada la integridad de los plásmidos, se probó su capacidad de expresión en la propia maquinaria celular. Los cinco plásmidos están diseñados para ser expresados en células de mamíferos, por lo que se seleccionó la línea celular HEK 293 (células 293 de riñón embrionario humano) debido a su alta capacidad de producción de proteínas (Freshney, 2015). El experimento se planteó de forma que, en una placa de 6 pocillos con cultivo neuronal, cada pocillo fuera transfectado con un plásmido distinto. La transfección se llevó a cabo con PEI, un polímero catiónico que facilita la introducción del DNA a través de la membrana plasmática de las células (Longo, P. A. et al., 2013). En la placa de 6 pocillos, 5 se transfectaron con los anticuerpos a producir, y el último con un plásmido productor de GFP. El plásmido productor de

GFP actuó como control positivo para comprobar que la transfección con PEI había ocurrido correctamente.

Dos días después de la transfección, un 30% de las células transfectadas con el plásmido GFP emitían un color verde bajo el microscopio de fluorescencia. Este hecho confirmaba que el proceso de transfección ocurrió de forma correcta, pero no aseguraba la capacidad de los plásmidos para producir anticuerpos. Para ello, se preparó un Western Blot con el medio de cultivo de las células, donde los anticuerpos son expulsados tras su producción (Andrews, N. P. et al., 2019; Murphy, K. M., 2017). Las membranas se incubaron con una dilución 1:2000 de anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y fueron reveladas. Las 4 primeras carriles de la **Figura 6C** marcan una bandas de peso molecular aproximado a 52 kDa, y otra con un peso oscilante entre 34 y 26 kDa. Estas dos bandas son casi imperceptibles en el caso de anti-Shank3. Las bandas procedentes de la producción de anti-GFAP y anti-VGlut3 son muy intensas, indicando que su producción es abundante. La especificidad del anticuerpo secundario quedó demostrada por la ausencia de bandas en el carril del GFP, actuando como control negativo en esta ocasión.

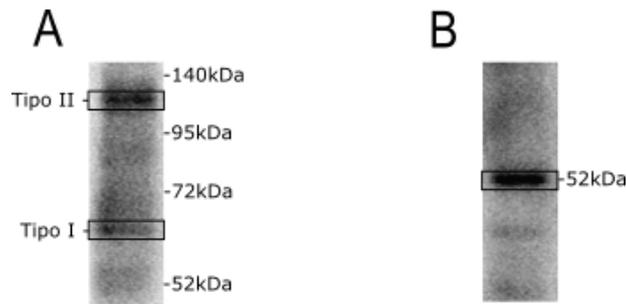
#### **4. 2. Producción del anticuerpo a media escala**

El siguiente paso del proyecto consistió en producir los anticuerpos a media escala para analizar su utilidad en tres procesos distintos: Western Blot, tinción inmunocitoquímica (cultivo neuronal) y tinción inmunohistoquímica (tinción del cortex cerebral). Es importante caracterizar su funcionalidad en estos ámbitos, pues marcan su efectividad como producto. Como previamente se ha explicado, la funcionalidad de un anticuerpo depende directamente de la disponibilidad de los epítopos (Chiu M. L. et al., 2019). Al realizar un Western Blot, las proteínas quedan denaturalizadas por el detergente SDS-PAGE, volviendo a su estructura primaria. Si el epítipo que reconoce el anticuerpo depende de la estructura secundaria y terciaria, el anticuerpo no será capaz de reconocer la proteína (Roy, S., & Kumar, V., 2014). En el caso de las tinciones inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, la eficacia del anticuerpo dependerá directamente de su capacidad para atravesar las diferentes estructuras y de su propia especificidad contra el antígeno (Abbas, A. K., 2020)

Esta fase del experimento se inició produciendo una gran cantidad de plásmido con el protocolo Maxiprep. Los plásmidos resultantes se usaron para transfectar frascos de 75 cm<sup>2</sup> de cultivo HEK 293T. Posteriormente, se recogió el medio de estos cultivos a las 48 y 72 h, concluyendo con su filtración para eliminar la mayoría de los elementos macroscópicos. Finalmente, se obtuvieron 160 mL de sobrenadante con anticuerpo para la producción anti-Vglut2, anti-VGlut3, anti-GFAP y anti-Neuregulin-HBD, y 40 mL de anti-Shank3. No se invirtió tanto material en la producción del último anticuerpo porque su funcionalidad no había sido comprobada en el Western previo (**Figura 6C**). Los productos resultantes se almacenaron a -80°C añadiendo azida al 0.02% para asegurar su esterilidad.

##### **4. 2. 1. Caracterización de la funcionalidad en Western Blot**

Para probar la eficacia de los anticuerpos producidos en un Western Blot, se usaron proteínas de corteza de ratón. Las membranas resultantes se incubaron tal y como se explica en la **Tabla 5**, junto a 1:2000 de anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP. Las imágenes tomadas del revelado de las membranas se muestran en la **Figura 7**.



**Figura 7. Western Blot de las proteínas del córtex.** Las proteínas del córtex de un ratón adulto se extrajeron para ser incubadas con los anticuerpos producidos. En la figura **A** se muestran los resultados del anticuerpo anti-Neuregulina-HBD, presentándose dos bandas de un tamaño aproximado de 110 kDa (Neuregulina1 tipo II) y 60 kDa (Neuregulina1 tipo I). La figura **B** procede de una membrana incubada con anti-GFAP. En ella se observa una única banda de 52 kDa que corresponde a la proteína GFAP.

Los únicos resultados positivos se dieron en las membranas incubadas con anti-Neuregulina-HBD (**Figura 7A**) y anti-GFAP (**Figura 7B**). En la membrana incubada con anti-Neuregulina-HBD se muestran dos bandas de un tamaño cercano a 110 kDa y 60 kDa. Estas bandas corresponden a los isotipos I y II de la Neuregulina 1 (Liu, X et al., 2011). La membrana incubada con anti-GFAP solo presenta una banda de 52 kDa, que corresponde a la proteína GFAP.

Los anticuerpos anti-VGlut2, anti-VGlut3 y anti-Shank3 no demostraron un marcaje específico, pues solo contenían bandas en el extremo superior e inferior del gel. En el caso de los anticuerpos VGluts se esperaba una banda cercana a 60 kDa que no apareció. Por otro lado, la membrana incubada con anti-Shank3 planteaba una problemática distinta: el gran peso molecular de esta proteína (en torno a 184 kDa). El gel del 10% que se ha utilizado permite la separación correcta de las bandas con un peso inferior a 100 kDa. En caso de que este anticuerpo hubiera funcionado, la proteína se marcaría en la parte superior del Western, justo donde residen las bandas inespecíficas del gel. De este modo, no es posible confirmar si la banda presente en la membrana procede de nuestro anticuerpo, o si se trata de inespecificidad.

#### 4. 2. 2. Caracterización de la funcionalidad en tinción inmunocitoquímica

El siguiente experimento probaba la eficacia y especificidad de los anticuerpos en cultivo. Para ello, se fijaron cultivos neuronales a día 14 en el caso de marcadores sinápticos (anti-VGlut3, anti-VGlut2, anti-Shank3). Para los anticuerpos anti-GFAP y anti-Neuregulina-HBD, se probaron con cultivos fijados tanto a día 7 como a día 14. La diferente planificación se debe a que los marcadores sinápticos se observan mejor en las fases tardías del cultivo, cuando las células ya son lo suficiente maduras para expresar estas proteínas. Por otro lado, anti-GFAP y anti-Neuregulina-HBD se probaron en días distintos para comprobar si su patrón de expresión cambiaba durante la maduración del cultivo.

Los cultivos se incubaron con los anticuerpos producidos en dos diluciones distintas: 1:5 y 1:50. El resto de atributos de la tinción inmunocitoquímica están explicados en la **Tabla 6 y 7**, así como el anticuerpo comercial seleccionado y su concentración. Como las muestras se incubaron con el anticuerpo producido y un respectivo anticuerpo comercial, se pudieron comparar sus patrones de expresión (**Figura 8**). Así mismo, se añadió DAPI a una disolución 1:2000 para marcar el núcleo de las células. Los anticuerpos comerciales se muestran en rojo y los producidos en verde.

Las imágenes seleccionadas para la **Figura 8** corresponden a los cultivos incubados con la dilución 1:5 del anticuerpo producido, pues los anticuerpos a una dilución 1:50 resultaron tener

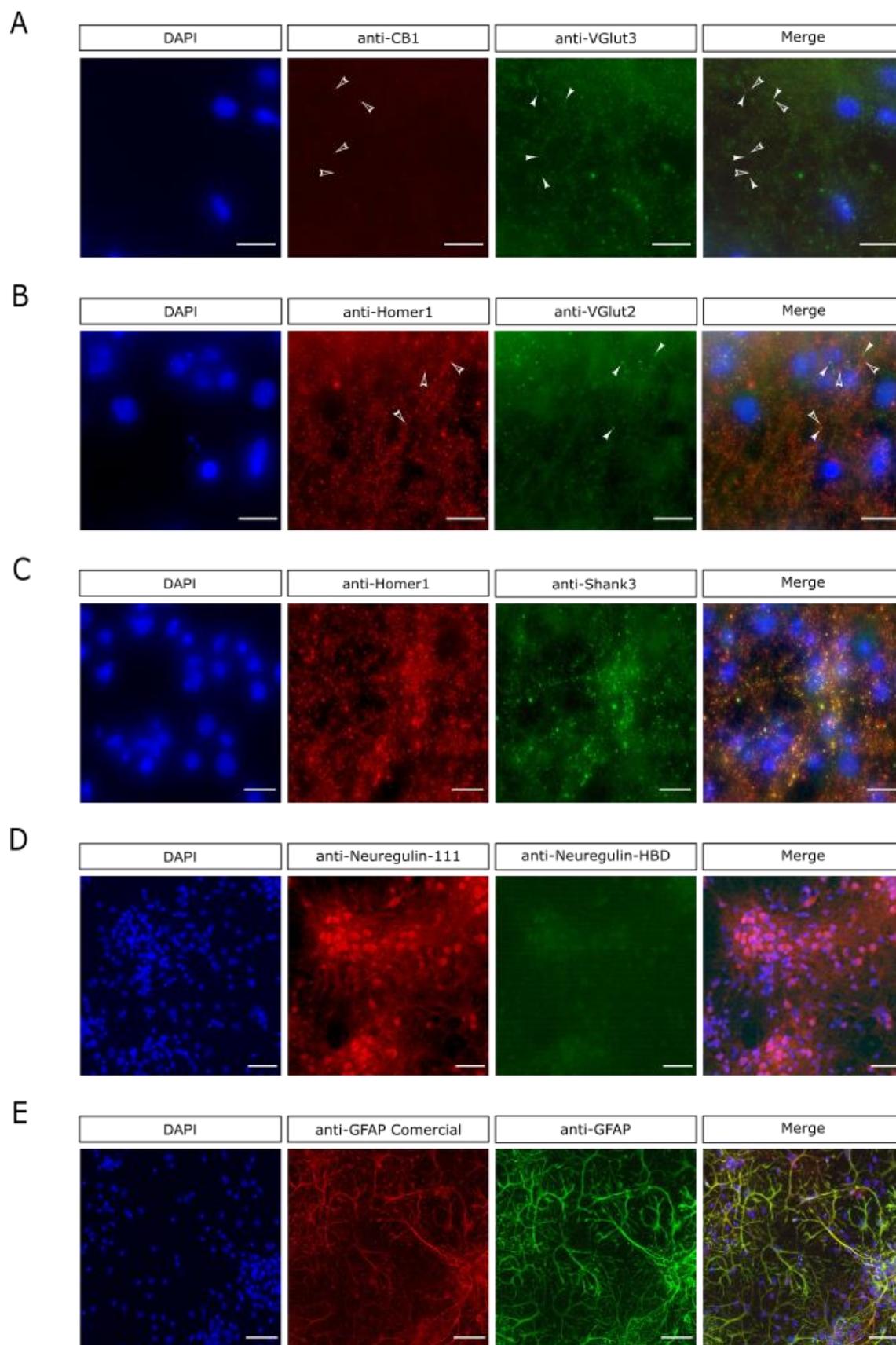
menor efectividad. Por otro lado, al no presentarse diferencia en el patrón de expresión entre los cultivos del día 7 y 14, se escogieron las imágenes del día 14 para los anticuerpos anti-GFAP y anti-Neuregulin-HBD. De esta forma, todas las imágenes muestran cultivos neuronales de la misma edad.

El anticuerpo anti-VGlut3 se expresa de forma presináptica con cierta difusión hacia las dendritas (Liguz-Leczna, M. et al., 2007). Su localización se comparó con el receptor de cannabinoides 1 (CB1), una proteína presináptica que se encarga principalmente de las sinapsis inhibitorias, aunque también tiene un papel regulador en las sinapsis excitatorias (Kawamura, Y., 2006). No se muestra gran expresión de la proteína CB1 en los cultivos, pero vemos un marcaje bien definido para la proteína VGlut3 (**Figura 8A**).

Los anticuerpos anti-VGlut2 y anti-Shank3 fueron comparados con la localización de Homer1, una proteína de andamio presente en estructuras sinápticas y estructuras postsinápticas (Luo, P. et al., 2012). VGlut2 es una proteína presináptica, como el resto de integrantes de la familia de las VGLUTs, así que no colocaliza con Homer1 (**Figura 8B**) (Vigneault, É. et al., 2015). Shank3, por el contrario, es una proteína también de andamio que se expresa en la región postsináptica y colocaliza en algunos puntos con Homer1 (**Figura 8C**) (Peça, J. et al., 2011).

Al contrario que su respectivo anticuerpo comercial, el anticuerpo anti-Neuregulin-HBD parece no haber funcionado correctamente, pues la poca fluorescencia presente podría estar producida por los propios núcleos. La Neuregulina 1 se encuentra mayormente en la membrana presináptica, tal y como se muestra en la imagen del anticuerpo comercial (**Figura 8D**) (Talmage D. A., 2008).

Finalmente, el anticuerpo anti-GFAP colocaliza a la perfección con su anticuerpo comercial. La proteína GFAP es una proteína estructural que se expresa en los filamentos intermedios de los astrocitos maduros, generando este patrón “estrellado” tan característico de los astrocitos (**Figura 8E**) (Middeldorp, J. et al., 2011).

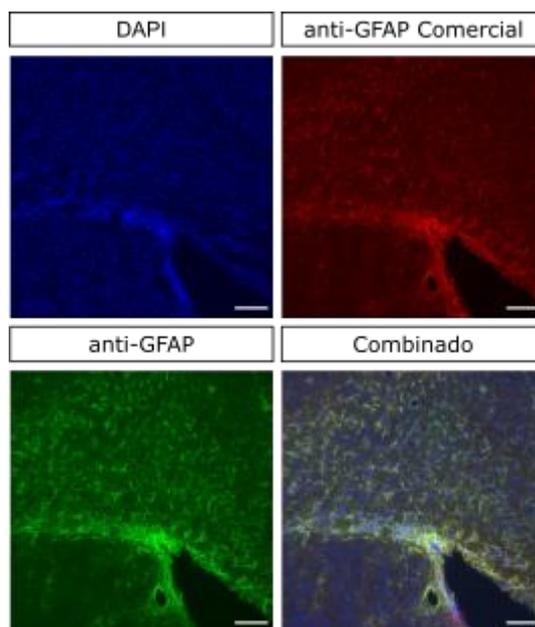


**Figura 8. Tinción inmunocitoquímica de cultivo neuronal.** Tinción de cultivo neuronal a día 14 con DAPI en azul, un anticuerpo comercial en rojo y el anticuerpo producido a una dilución 1:5 en verde. La última columna corresponde a una imagen final donde todos los canales están superpuestos. Cada fila corresponde a un experimento distinto, donde se comprobó la eficacia de los anticuerpos anti-VGlut3 (**8A**), anti-VGlut2 (**8B**), anti-Shank3 (**8C**), anti-Neuregulina-HBD (**8D**) y anti-GFAP (**8E**). En la figura **8A** y **8B** se presentan una flechas que señalan la cercanía entre los diferentes marcajes. En la figura **8C** y **8E** se puede observar la colocalización entre ambos anticuerpos. Finalmente, el anticuerpo producido en la figura **8D** parece no mostrar efectividad. Las fotografías de las figuras **8A**, **8B** y **8C** fueron tomadas a 63x en el microscopio invertido Leica DMI8 M/C/A y están a una escala de 20  $\mu\text{m}$ . La figuras **8D** y **8E** fueron tomadas en el mismo microscopio a 20x, teniendo una escala de 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. 2. 3. Caracterización de la funcionalidad en tinción inmunohistoquímica

De forma similar a la tinción inmunocitoquímica, también se probó la eficacia de los anticuerpos en tejido. El análisis en el microscopio Leica DMI8 M/C/A no permitió distinguir la tinción de los marcadores sinápticos con la propia autofluorescencia del tejido. Por esa razón, en la **Figura 9** solo se muestra el anticuerpo anti-GFAP.

Se puede apreciar como el anticuerpo GFAP colocaliza exactamente con su respectivo anticuerpo comercial. La imagen seleccionada corresponde a la dilución 1:5, pues su marcaje era más intenso que el obtenido con la dilución 1:50.



**Figura 9. Tinción inmunohistoquímica de tejido cortical.** Tinción de tejido neuronal del córtex de un ratón adulto. El marcaje con el anticuerpo producido (anti-GFAP) se llevó a cabo con una dilución 1:5. El resto de las diluciones se siguieron tal y como se muestran en la **Tabla 6** y **7**. Las imágenes se tomaron en el microscopio Leica DMI8 M/C/A a 20x de aumento, cuya escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4. 3. Concentración de los anticuerpos

La importancia de concentrar anticuerpos se plantea por sus numerosas ventajas: soluciona problemas de espacio al reducir enormemente su volumen, facilita su transporte como mercancía, incrementa la actividad de un anticuerpo con poca eficiencia de unión y minimiza el sobrenadante donde están disueltos. El sobrenadante contiene moléculas que pueden provocar reactividad en una tinción inmunológica. Reduciendo el volumen de anticuerpo necesario para

incubar una muestra, se disminuyen las probabilidades de que este hecho suceda y contamine los resultados. Además, si se concentran los anticuerpos para su almacenaje a bajas temperaturas se alarga su durabilidad (Fishman, J. B., & Berg, E. A., 2019). Un ejemplo se encuentra en los anticuerpos del catálogo de Thermo Scientific™, donde suelen ser liofilizados de forma previa a su comercialización.

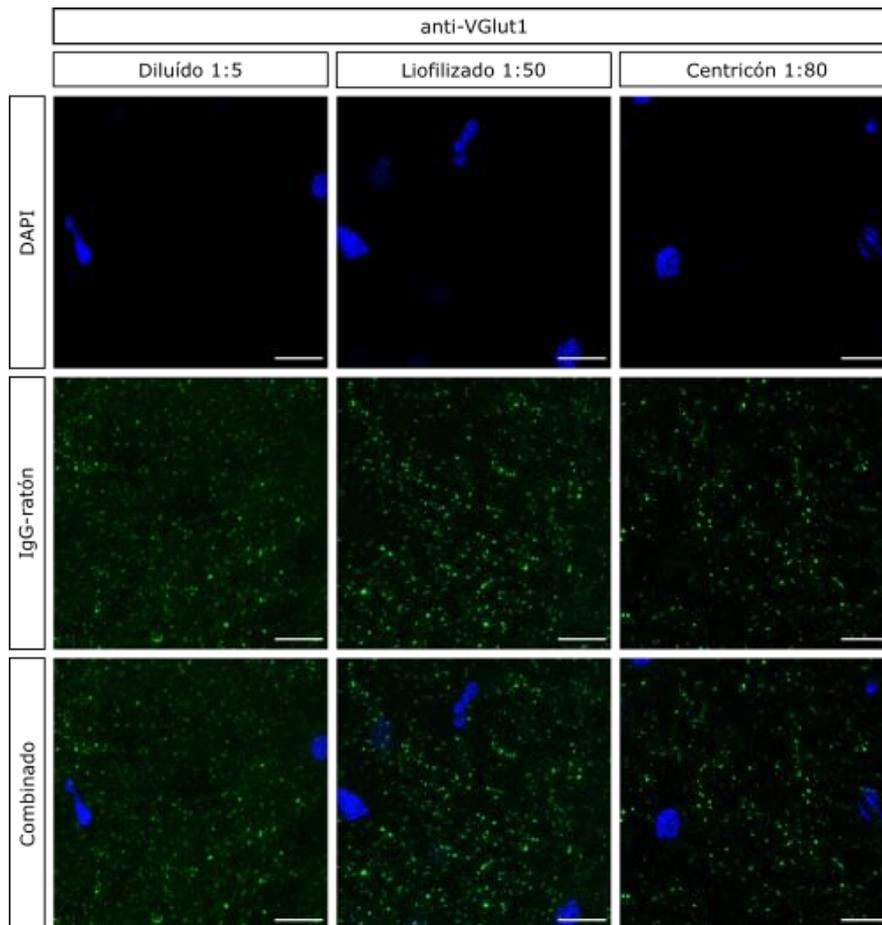
La fase final de este estudio se centró en concentrar los anticuerpos producidos, seleccionando el mejor método a partir de los recursos del laboratorio. Una vez concentrados los anticuerpos, se midió su eficacia en una tinción inmunocitoquímica de tejido neuronal.

#### **4. 3. 1. Prueba de concentración**

En esta primera prueba se utilizó el anticuerpo anti-VGlut1 previamente producido por Adrian Torres (Torres Villasante, A., 2020). Este anticuerpo se concentró por dos métodos distintos.

- a) Por un lado, diez tubos de 1 mL de medio se liofilizaron para resuspender su contenido en un volumen final de 1 mL. El medio de resuspensión estaba compuesto por una proporción 1:1 de PBS 1x y glicerol.
- b) Por otro lado, se concentró el contenido de 10 tubos a través de un centricon 30K MWCO. El centricon se lavó con 300 µL PBS 1x para recuperar los anticuerpos, y se añadieron otros 300 µL de glicerol.

A partir de estos concentrados se llevó a cabo una tinción inmunocitoquímica de cultivo neuronal, comprobando su eficacia frente al anticuerpo sin concentrar (**Figura 10**). Para que se administrara la misma cantidad de anticuerpo en cada tinción, se reajustaron las diluciones de los diferentes elementos: 1:5 para el anticuerpo diluído, 1:50 del concentrado por liofilización, y 1:80 para el concentrado por centricon. Una vez obtenido el resultado final, se pudo observar un mejor rendimiento del anticuerpo liofilizado.



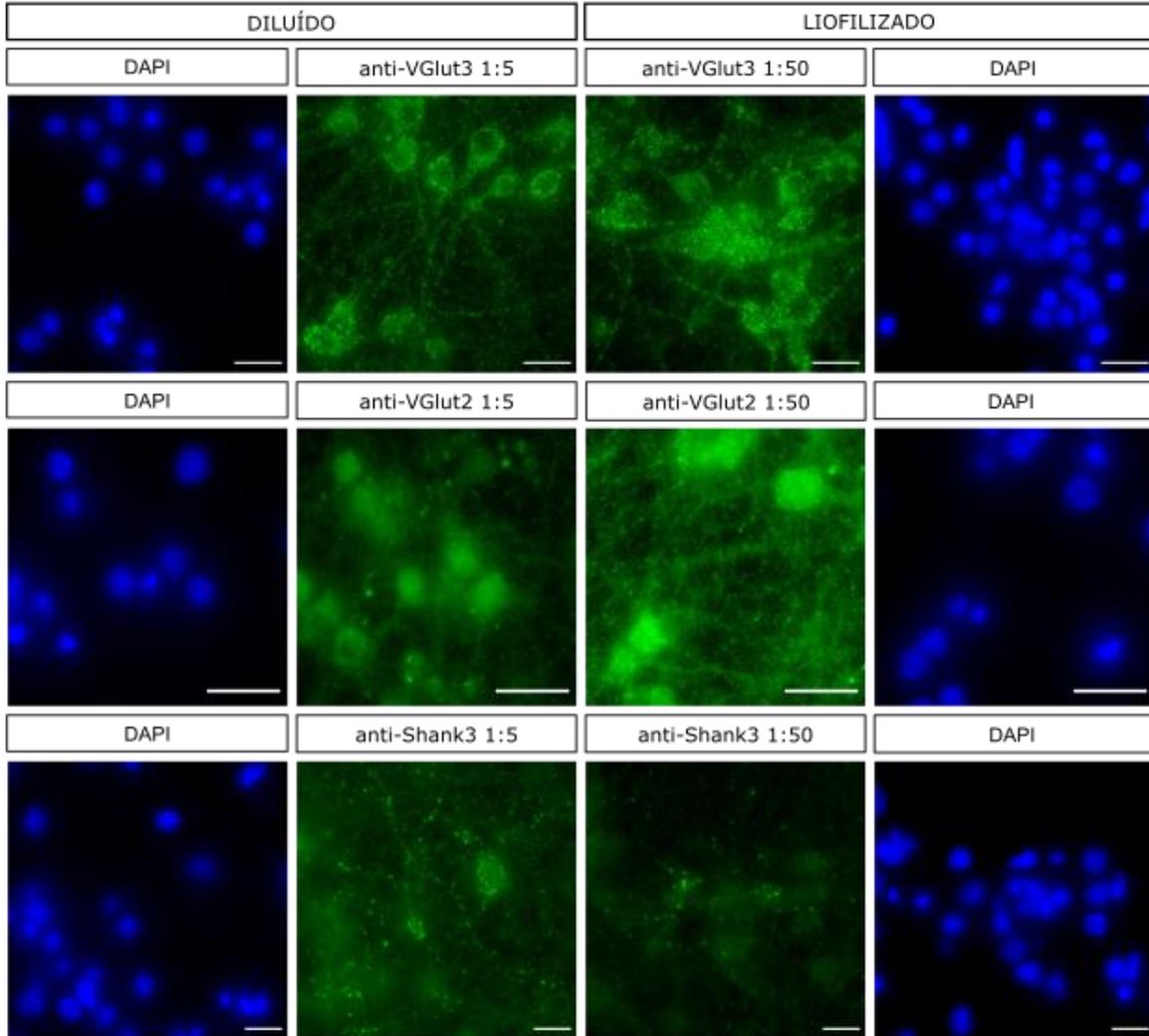
**Figura 10. Prueba de concentración del VGlut1.** Tinción inmunocitoquímica de VGlut1 en cultivos neuronales a distintas condiciones del anticuerpo anti-VGlut1, situadas de forma individual en la fila "IgG-ratón". La eficacia del anticuerpo diluido fue comprobada frente a la eficacia del anticuerpo concentrado por liofilización y por centricón. Se reajustaron las diluciones de los diferentes elementos para añadir la misma cantidad de anticuerpo en los cultivos. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio ApoTome.2 a 63x, con una escala de 15  $\mu$ m.

#### 4. 3. 2. Tinción inmunocitoquímica con los anticuerpos concentrados

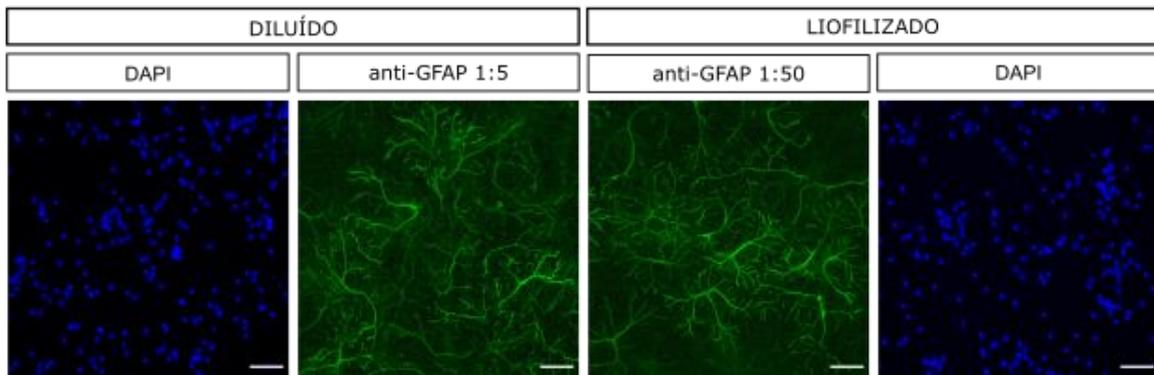
Finalmente, se concentraron el resto de los anticuerpos por el método de liofilización. La cantidad de medio de resuspensión añadida se calculó en base al volumen de anticuerpo liofilizado, manteniendo una concentración uniforme entre todos los anticuerpos concentrados.

Para comprobar su eficacia, también se comparó su rendimiento frente a su respectivo anticuerpo diluido. Como el anticuerpo estaba 10 veces más concentrado, se equilibraron las cantidades de anticuerpo añadidas, incubándose con el anticuerpo concentrado a una dilución 1:50, y del diluido a 1:5. Los resultados quedaron enfrentados en la **Figura 11**, donde se demuestra una funcionalidad uniforme entre los anticuerpos diluidos y concentrados.

A



B



**Figura 11. Tinción inmunocitoquímica de los anticuerpos diluidos y concentrados.** Se encuentran enfrentados los resultados de la tinción del anticuerpo sin concentrar contra el anticuerpo concentrado. Las diluciones fueron ajustadas para que todas las tinciones contaran con la misma cantidad de anticuerpo. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio Leica DMi8 M/C/A. Los parámetros de la figura **A** son 63x aumentos a una escala de 20  $\mu\text{m}$ , mientras que los de la figura **B** son 20x aumentos a una escala de 50  $\mu\text{m}$ .

## 5. Discusión

### 5. 1. Caracterización de la actividad de los anticuerpos

Continuando con el estudio experimental de *Andrews, N. P. et al. (2019)*, se han caracterizado y validado cinco anticuerpos recombinantes producidos en la línea celular HEK 293T. Estos anticuerpos han demostrado una versatilidad distinta entre ellos dentro del campo científico.

Por un lado, los anticuerpos anti-GFAP y anti-Neuregulina-HBD son aptos para su uso en Western Blot, pues mostraron el marcaje esperado. Para confirmar que el anticuerpo anti-Shank3 también es efectivo en este tipo de técnicas, se debería de realizar un Western Blot cuyo gel presente un porcentaje menor de acrilamida (<10%). Con este cambio se podrán diferenciar mejor las bandas de mayor tamaño, distinguiéndose de las posibles bandas inespecíficas.

La ineficiencia del resto de anticuerpos puede surgir por la posición del epítipo al que reconocen. Como se ha explicado anteriormente, es muy importante tener en cuenta la estructura tridimensional de las moléculas a la hora de diseñar un anticuerpo (*Chiu M. L. et al., 2019*). El componente SDS-PAGE de los Western Blots es un desnaturalizante que elimina la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, por lo que muchos anticuerpos pierden su funcionalidad (*Chiu M. L. et al., 2019; Roy, S., & Kumar, V., 2014*). De este modo, cambiando las secuencias  $V_L$  y  $V_H$  de los plásmidos productores por las de otros hibridomas específicos, se podrían producir anticuerpos cuya diana fuera directamente reconocible en la estructura primaria de la proteína (*Andrews, N. P. et al., 2019*).

El experimento con una mayor tasa de éxito corresponde a la tinción inmunocitoquímica. En él se observa un correcto marcaje de todos los anticuerpos, a excepción del anti-Neuregulina-HBD. La Neuregulina 1 es una proteína que presenta más de 30 isoformas distintas. El empalme alternativo de sus exones da lugar a esta gran variabilidad, complicando su estudio (*Kim B. et al., 2013*). Una solución similar al caso anterior podría ser la resíntesis del plásmido, usando unas secuencias  $V_L$  y  $V_H$  distintas que confieran una unión más eficiente a la proteína (*Andrews, N. P. et al., 2019*). Por otro lado, como las Neuregulinas son proteínas expresadas de forma pleiotrópica en el organismo, se podría comprobar si el anticuerpo producido es específico a los isotipos de otro tipo de cultivos (*Kim B. et al., 2013*).

El marcaje de los núcleos por el anticuerpo comercial anti-GFAP puede deberse a una contaminación en los reactivos. Una mala praxis en el laboratorio es capaz de derivar en la mezcla de los compuestos madre, siempre que no se asegure la esterilidad de las puntas durante el pipeteo. En acorde al color del marcaje de los núcleos, se puede deducir que la contaminación procede de una molécula de pollo, pues el anticuerpo secundario que lo detecta es el anti-pollo. Sería de interés repetir el ensayo inmunocitoquímico con un anticuerpo nuevo, confirmando así si el error se debe al reactivo usado, o por una contaminación dada durante en el manejo del cultivo.

Por último, se confirmó la efectividad del anticuerpo anti-GFAP para las tinciones inmunohistoquímicas. Las muestras observadas bajo el microscopio Leica DMi8 M/C/A generaban una alta autofluorescencia por parte del tejido. Un microscopio confocal permite obtener imágenes de mayor nitidez al focalizar su haz de luz en un solo punto (*Semwogerere, D., & Weeks, E. R., 2005*). Considerando que las proteínas sinápticas se marcan como pequeños puntos dentro del tejido, convendría comprobar la efectividad de los anticuerpos anti-VGlu2, anti-VGlu3 y anti-Shank3 en un microscopio confocal, donde la luz no difumina.

Es importante tener en cuenta que el gran tamaño de los anticuerpos dificulta su penetración en tejido (*Murphy, K. M., 2017*). Si se confirmase la ineficacia de los anticuerpos bajo el

microscopio confocal, una posible solución se centraría en el desarrollo de anticuerpos de menor tamaño. Este objetivo se puede abarcar con la adaptación de los anticuerpos a las estructuras *nanobodies*, compuestas solo de dominios variables de cadena pesada (Jovčevska, I. et al., 2020). Estas proteínas son igual de afines, específicas, solubles y termoestables que los anticuerpos normales, pero con un peso reducido a 15 kDa (Arbabi-Ghahroudi M. et al., 2017). Así mismo, la expresión de *nanobodies* en células no requiere de modificaciones post-traduccionales, permitiendo su producción en bacterias y reduciendo sus costes de manufacturación (Jovčevska, I. et al., 2020).

## **5. 2. Aplicación en el marco neurobiológico**

Los anticuerpos producidos serán una herramienta de gran utilidad para el estudio de la sinapsis, el mecanismo de comunicación común entre neuronas. Las alteraciones en la funcionalidad normal de estos procesos pueden derivar en cuadros patológicos que, a su vez, pueden ser caracterizados a partir del marcaje celular con los anticuerpos producidos (Fazzari, P. et al., 2010; Vigneault, É. et al., 2015). Un correcto funcionamiento del sistema nervioso implica la regulación del balance entre las sinapsis excitatorias e inhibitorias, mediadas por neurotransmisores. Los trastornos psiquiátricos se generan cuando este equilibrio es descompensado, ya sea por la incorrecta liberación de neurotransmisores, o por la incapacidad de la membrana postsináptica de reconocerlos (Arora, V. et al., 2018).

Concretamente, los anticuerpos escogidos en este experimento componen un marco de estudio: las proteínas que reconocen ayudan a entender el mecanismo de acción del trastorno esquizoide. La esquizofrenia es una enfermedad que afecta al 1% de la población, cuya base genética se relaciona con la proteína Neuregulina 1 (Fazzari, P. et al. 2014). De este modo, las personas con esquizofrenia presentan un fenotipo alterado en la expresión de sus isotipos en las estructuras cerebrales (Harrison, P. J., & Law, A. J., 2006). Así mismo, se ha demostrado que la ineficiente transmisión de la sinapsis glutamatérgica cumple un rol importante en el desarrollo de esta patología, sinapsis en las que intervienen la familia de proteínas VGluts, la proteína Shank3, y los astrocitos (Coyle, J. T., 2006).

No obstante, el uso de estos anticuerpos como herramienta neurobiológica no solo es útil para el estudio de la esquizofrenia. Muchos trastornos psiquiátricos presentan fenotipos coincidentes, los cuales están altamente relacionados con alteraciones en las sinapsis glutamatérgicas (Arora, V. et al., 2018). Entre ellas, podemos destacar la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, el trastorno bipolar, el trastorno de ansiedad y la depresión (Arora, V. et al., 2018; Fazzari, P. et al., 2010; Vigneault, É. et al., 2015).

## **5. 3. Validación de su actividad frente a los anticuerpos monoclonales**

Finalmente, y a pesar de las limitaciones encontradas, queda expuesta la capacidad de producir anticuerpos recombinantes en células, así como las ventajas que presentan frente al uso de anticuerpos monoclonales convencionales:

- a) En primer lugar, su coste de producción es menor. Esto se debe a que los anticuerpos monoclonales requieren de una gran inversión económica para generar hibridomas y mantener a los animales involucrados (Andrews, N. P. et al., 2019). Esta diferencia queda reflejada en los precios del mercado, donde se observa una clara

descompensación. Los anticuerpos monoclonales usados en este experimento proceden de ThermoFisher Scientific y 100  $\mu$ L de cada uno de ellos tiene un precio en torno a 400€. En contraste, los plásmidos que producen estos anticuerpos se pueden comprar en la web Addgene.org por solo 63€, pudiendo ser amplificados para aumentar su cantidad.

- b) Así mismo, el uso de plásmidos para la generación de anticuerpos asegura su uniformidad y replicabilidad entre laboratorios (Andrews, N. P. et al., 2019). Los anticuerpos recombinantes de este proyecto proceden de hibridomas ya existentes, inmortalizando su secuencia de DNA (Langjahr, P., & Sotelo, P., 2016). Por el contrario, el uso de hibridomas vivos como máquinas productoras es menos fiable: a pesar de que son células inmortales, sus genes son muy inestables (Andrews, N. P. et al., 2019).
- c) Otro aspecto a considerar es su concordancia con el principio de las 3Rs. Uno de sus postulados llama al reemplazo del uso de animales por procesos in vitro tanto como sea posible (Rodríguez Yunta, E., 2007). De este modo, se reduce el uso de animales dentro la industria.
- d) Por último, los anticuerpos recombinantes favorecen las técnicas de etiquetado multiplex, altamente usadas en neurociencia. Estas técnicas se basan en el empleo de diferentes anticuerpos para detectar distintos tipos de proteínas en una misma muestra. Para que este proceso se desarrolle correctamente, los anticuerpos escogidos deben proceder de distintas especies o isotipos, evitando la reactividad cruzada (Weis-Garcia, F., & Carnahan, R. H., 2017). Esta condición se ve comprometida por la escueta diversidad en el mercado: el 84% de los anticuerpos comercializados son de conejo, ratón y cabra (Andrews, N. P. et al., 2019). De este modo, el desarrollo de plásmidos productores de anticuerpos permite seleccionar el isotipo y especie a voluntad, abarcando esta dificultad tan común en las técnicas de etiquetado multiplex y permitiendo identificar un mayor número de proteínas por muestra (Weis-Garcia, F., & Carnahan, R. H., 2017). Las subclases de anticuerpos de ratón pueden ser eficientemente detectadas por un anticuerpo secundario específico, aumentando así la gama de elección. Como el 69% de los anticuerpos de ratón comercializados pertenecen a la subclase IgG1, los anticuerpos producidos en este experimento ofrecerán una buena alternativa en el mercado al pertenecer a la subclase IgG2a (Andrews, N. P. et al., 2019).

## 6. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. Los plásmidos codificantes de los anticuerpos anti-VGlut2, anti-VGlut3, anti-Neuregulina-HBD, anti-GFAP y anti-Shank3 son eficazmente expresados en la línea celular HEK 293T.
2. Los anticuerpos anti-Neuregulina-HBD y anti-GFAP pueden ser usados para procesos de Western Blot.
3. Los anticuerpos anti-VGlut2, anti-VGlut3, anti-GFAP y anti-Shank3 son efectivos y específicos para las tinciones inmunocitoquímicas.
4. El anticuerpo anti-GFAP funciona adecuadamente en las tinciones inmunológicas de tejido.
5. Los anticuerpos anti-VGlut2, anti-VGlut3, anti-GFAP y anti-Shank3 pueden ser concentrados sin perder sus cualidades, garantizando así su correcto almacenaje.

## 7. Referencias

- Kaspar, B. K., Vissel, B., Bengoechea, T., Crone, S., Randolph-Moore, L., Muller, R., Brandon, E. P., Schaffer, D., Verma, I. M., Lee, K. F., Heinemann, S. F., & Gage, F. H. (2002). Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2320–2325. <https://doi.org/10.1073/pnas.042678699>
- Abbas, A. K. (2020). *Inmunología básica* 6 ed. © 2020 (6.a ed.). Elsevier España, S.L.U.
- Andrews, N. P., Boeckman, J. X., Manning, C. F., Nguyen, J. T., Bechtold, H., Dumitras, C., Gong, B., Nguyen, K., van der List, D., Murray, K. D., Engebrecht, J., & Trimmer, J. S. (2019). A toolbox of IgG subclass-switched recombinant monoclonal antibodies for enhanced multiplex immunolabeling of brain. *eLife*, 8, e43322. <https://doi.org/10.7554/eLife.43322>
- Animales de laboratorio. (2021). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Del Gobierno de España. <https://www.mapa.gob.es/en/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/animales-de-laboratorio/>
- Antibody Structure and Function | Sino Biological. (2021). SinoBiological. <https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/antibody-structure-function>
- Arbabi-Ghahroudi, M. (2017). Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01589>
- Arora, V., Pecoraro, V., Aller, M. I., Román, C., Paternain, A. V., & Lerma, J. (2018). Increased Grik4 Gene Dosage Causes Imbalanced Circuit Output and Human Disease-Related Behaviors. *Cell Reports*, 23(13), 3827–3838. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.086>
- Baldwin, K. T., & Eroglu, C. (2017). Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current opinion in neurobiology*, 45, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.006>
- Communication Between Neurons - Anatomy and Physiology | OpenStax. (2016). OpenStax. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/12-5-communication-between-neurons>
- Crosnier C., Staudt N., Wright GJ. (2010). A rapid and scalable method for selecting recombinant mouse monoclonal antibodies BMC Biology 8:76. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-76>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies* (Basel, Switzerland), 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Coyle, J. T. (2006). Glutamate and Schizophrenia: Beyond the Dopamine Hypothesis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(4–6), 363–382. <https://doi.org/10.1007/s10571-006-9062-8>
- Fazzari, P., Paternain, A. V., Valiente, M., Pla, R., Luján, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marín, O., & Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature*, 464(7293), 1376–1380. <https://doi.org/10.1038/nature08928>
- Fazzari, P., Penachioni, J., Gianola, S. et al. Plexin-B1 plays a redundant role during mouse development and in tumour angiogenesis. *BMC Dev Biol* 7, 55 (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-55>

- Fazzari, P., Snellinx, A., Sabanov, V., Ahmed, T., Serneels, L., Gartner, A., Shariati, S. A. M., Balschun, D., & De Strooper, B. (2014). Cell autonomous regulation of hippocampal circuitry via Aph1b- $\gamma$ -secretase/neuregulin 1 signalling. *eLife*, 3, e02196. <https://doi.org/10.7554/eLife.02196>
- Fishman, J. B., & Berg, E. A. (2019). Antibody Purification and Storage. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(5), pdb.top099101. <https://doi.org/10.1101/pdb.top099101>
- Freshney, R. I. (2015). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. Wiley. <https://books.google.es/books?id=NSJcWAAQBAJ>
- García Merino, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>
- Harrison, P. J., & Law, A. J. (2006). Neuregulin 1 and Schizophrenia: Genetics, Gene Expression, and Neurobiology. *Biological Psychiatry*, 60(2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.11.002>
- Jovčevska, I., & Muyldermans, S. (2020). The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*, 34(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>
- Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., & Siegelbaum, S. A. (2021). Principles of Neural Science, Sixth Edition (English Edition) (6.a ed.). McGraw-Hill Education / Medical.
- Kawamura, Y. (2006). The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 26(11), 2991–3001. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4872-05.2006>
- Kim B. Seroogy, Jonathan W. Dickerson, Sarah N. Cassella, Lixin Zhang-Auberson. (2013). *Handbook of Biologically Active Peptides (Second Edition)*. Chapter 223 - Neuregulins, 1633-1638. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00223-2>
- Kirk, R. G. W. (2017). Recovering The Principles of Humane Experimental Technique. *Science, Technology, & Human Values*, 43(4), 622–648. <https://doi.org/10.1177/0162243917726579>
- Langjahr, P. & Sotelo, P. (2016). Presente y futuro de los anticuerpos recombinantes terapéuticos. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(2), 110-121. [https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(02\)110-121](https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(02)110-121)
- Liguz-Lecznar, M., & Skangiel-Kramska, J. (2007). Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 67(3), 207–218. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17957901/>
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, 46(3), 258–268. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- Liu, X., Bates, R., Yin, D. M., Shen, C., Wang, F., Su, N., Kirov, S. A., Luo, Y., Wang, J. Z., Xiong, W. C., & Mei, L. (2011). Specific Regulation of NRG1 Isoform Expression by Neuronal Activity. *Journal of Neuroscience*, 31(23), 8491–8501. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5317-10.2011>
- Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S., & Leahy, D. J. (2013). Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods in enzymology*, 529, 227–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5>

- Luo, P., Li, X., Fei, Z., & Poon, W. (2012). Scaffold protein Homer 1: Implications for neurological diseases. *Neurochemistry International*, 61(5), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.014>
- Malet, M., & Brumovsky, P. R. (2015). VGLUTs and Glutamate Synthesis-Focus on DRG Neurons and Pain. *Biomolecules*, 5(4), 3416–3437. <https://doi.org/10.3390/biom5043416>
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 421-443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
- Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(3), 147–157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
- Morales, L., Velandia, M. L., Calderon, M. A., Castellanos, J. E., & Chaparro-Olaya, J. (2017). Polyclonal antibodies against recombinant dengue virus NS3 protein. *Biomédica*, 37(1), 131. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249>
- Murphy, K. M., & Weaver, C. (2017). Janeway's Immunobiology (9th ed.). W. W. Norton & Company.
- Navarro-González, C., Huerga-Gómez, A., & Fazzari, P. (2019). Nrg1 Intracellular Signaling Is Neuroprotective upon Stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/3930186>
- Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews. Immunology*, 15(3), 160–171. <https://doi.org/10.1038/nri3795>
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J. T., Wang, W., Wells, M. F., Venkatraman, T. N., Lascola, C. D., Fu, Z., & Feng, G. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*, 472(7344), 437–442. <https://doi.org/10.1038/nature09965>
- Qiu, S., Li, Y., Li, Y., Zhong, W., Shi, M., Zhao, Q., Zhang, K., Wang, Y., Lu, M., Zhu, X., Jiang, H., Yu, Y., Cheng, Y., & Liu, Y. (2018). Association between SHANK3 polymorphisms and susceptibility to autism spectrum disorder. *Gene*, 651, 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.07>
- Recombinación V(D)J. (2008). Wikipedia Commons. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Recombinaci%C3%B3n\\_VDJ.PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Recombinaci%C3%B3n_VDJ.PNG)
- Rey Sevilla, F. J. (2019). Los derechos de los animales. especial atención a la regulación del maltrato animal en la legislación española
- Reyes Martín, E., Prieto Martín, A., Díaz Martín, D., & Álvarez-Mon Soto, M. (2013). Inmunidad innata e inmunidad adaptativa. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1760–1767. [https://doi.org/10.1016/s0304-5412\(13\)70553-5](https://doi.org/10.1016/s0304-5412(13)70553-5)
- Rodríguez Yunta, E. (2007). ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDADES HUMANAS. *Acta bioética*, 13(1), 25-40. <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2007000100004>
- Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. [https://www.researchgate.net/publication/264742594\\_A\\_Practical\\_Approach\\_on\\_SDS\\_PAGE\\_for\\_Separation\\_of\\_Protein](https://www.researchgate.net/publication/264742594_A_Practical_Approach_on_SDS_PAGE_for_Separation_of_Protein)

- Schober, A. L., & Mongin, A. A. (2015). Intracellular levels of glutamate in swollen astrocytes are preserved via neurotransmitter reuptake and de novo synthesis: implications for hyponatremia. *Journal of Neurochemistry*, 135(1), 176–185. <https://doi.org/10.1111/jnc.13229>
- Semwogerere, D., & Weeks, E. R. (2005). Confocal microscopy. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, 23, 1-10.
- Shi, L., & Bergson, C. M. (2020). Neuregulin 1: an intriguing therapeutic target for neurodevelopmental disorders. *Translational Psychiatry*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-00868-5>
- Suryadevara, N., Shrihari, S., Gilchuk, P., VanBlargan, L. A., Binshtein, E., Zost, S. J., Nargi, R. S., Sutton, R. E., Winkler, E. S., Chen, E. C., Fouch, M. E., Davidson, E., Doranz, B. J., Chen, R. E., Shi, P. Y., Carnahan, R. H., Thackray, L. B., Diamond, M. S., & Crowe, J. E. (2021). Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Cell*, 184(9), 2316–2331.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.029>
- Talmage D. A. (2008). Mechanisms of neuregulin action. *Novartis Foundation symposium*, 289, 74–93. <https://doi.org/10.1002/9780470751251.ch6>
- Torres Villasante, A. (2020). Anticuerpos recombinantes como herramientas en neurobiología: producción y caracterización de anticuerpos monoclonales recombinantes para detectar proteínas sinápticas
- Types of antibodies | MBL Life Science -JAPAN-. (2017). MBL Life Science. <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/antibody-isotype.html>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vigneault, É., Poirel, O., Riad, M., Prud'homme, J., Dumas, S., Turecki, G., Fasano, C., Mechawar, N., & El Mestikawy, S. (2015). Distribution of vesicular glutamate transporters in the human brain. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00023>
- Weis-Garcia, F., & Carnahan, R. H. (2017). Characterizing Antibodies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(11), pdb.top093823. <https://doi.org/10.1101/pdb.top093823>

## 8. Anexo

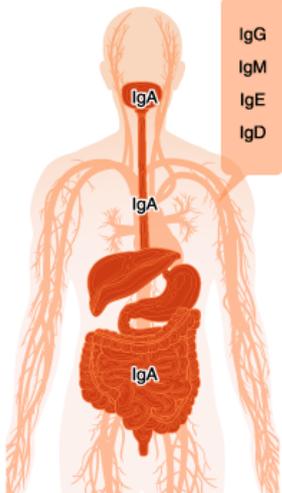
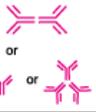
Types and characteristics of antibodies		Distribution in the body
IgG		
IgM		
IgA		
IgD		
IgE		

Figura suplementaria 1. Función principal de las diferentes clases de anticuerpos y su distribución en el cuerpo humano. Imagen obtenida de la web TYPES OF ANTIBODIES | MBL LIFE SCIENCE -JAPAN-, 2017.

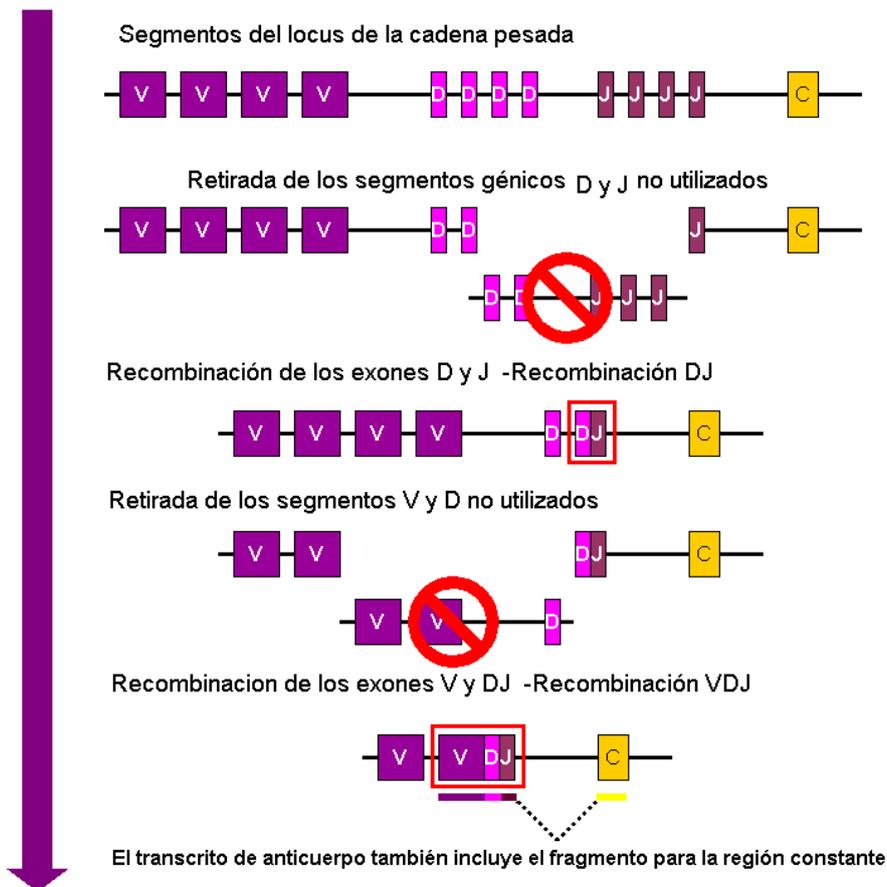


Figura suplementaria 2. Recombinación V(D)J de las cadenas pesadas en las inmunoglobulinas. Los genes V (segmento genérico variable), D (segmento de diversidad) y J (segmento de unión) se someterán a un proceso de recombinación genética, denominada recombinación V(D)J, para dar lugar a las diferentes cadenas pesadas en las inmunoglobulinas. La región constante (C) de la cadena pesada se muestra en amarillo (Abbas, A. K., 2020). Imagen original del repositorio "Wikipedia Commons" (RECOMBINACIÓN V(D)J., 2008).