



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS

INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de
Ingeniera Biotecnóloga

**Generación y caracterización de nanobodies
recombinantes dirigidos contra las proteínas IL-17 y
MIF, relevantes en la fisiopatología de la sepsis.**

Estudiante

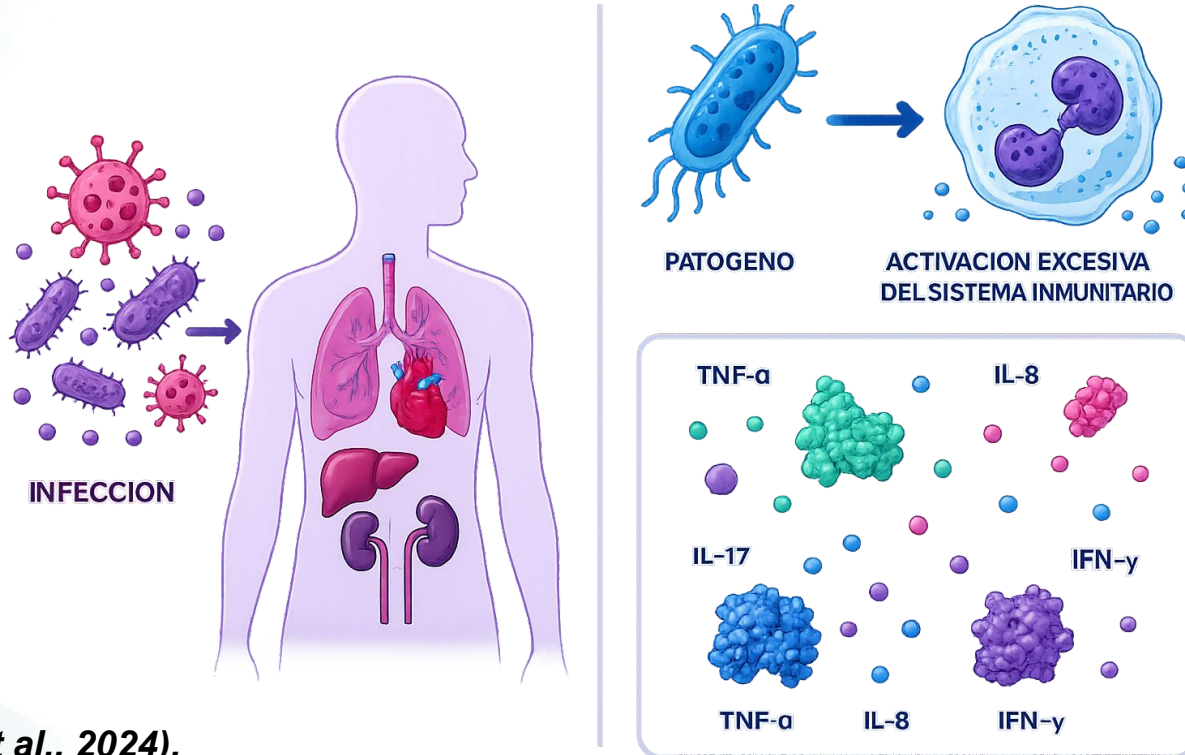
Villacís Aguirre, Patricia Denisse

Tutor ESPE:

Thelvia Ramos Gomez PhD.

INTRODUCCIÓN

FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS



(Cicchinelli et al., 2024).

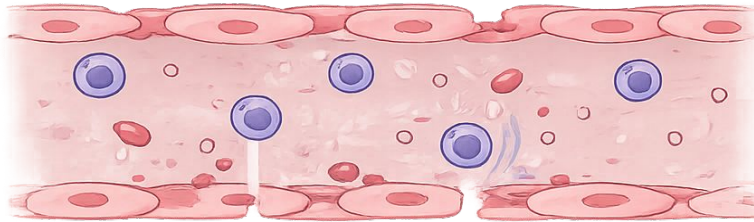
INTRODUCCIÓN



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

FISIOPATOLOGÍA DE LA SEPSIS

Daño endotelial y aumento de la permeabilidad vascular



- Vasodilatación
- Fuga capilar
- Microtrombosis
- Hipoperfusión tisular

Hipoperfusión y daño celular multiorgánico



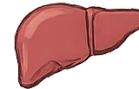
Pulmones
(SDRA)



Corazón
(disfunción)



Riñones
(lesión renal aguda)



Hígado
(disfunción hepática)



Cerebro
(encefalopatía)

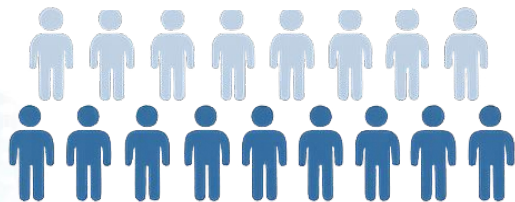


INTRODUCCIÓN

CASOS POR AÑO

48,9

MILLONES



DE CASOS

MUERTES POR AÑO

11

MILLONES



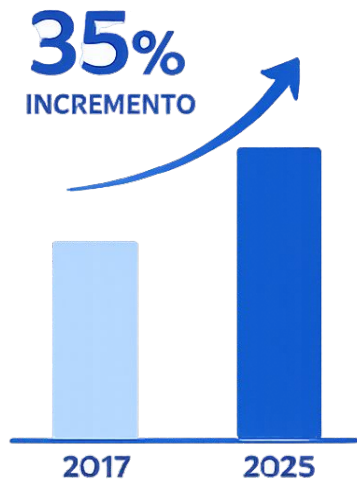
DE MUERTES



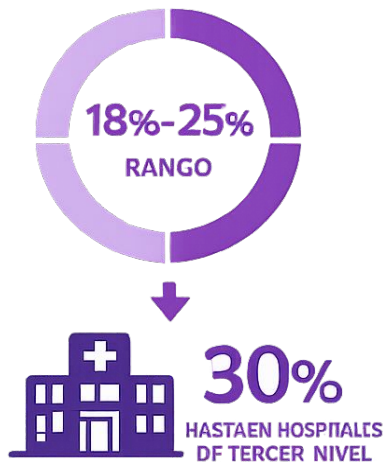
EQUIVALE AL 20% DE
MUERTES GLOBALES

INCIDENCIA DE SEPSIS EN ECUADOR

HOSPITALIZACIONES POR SEPSIS EN ECUADOR



MORTALIDAD HOSPITALARIA



GRUPOS MAS AFECTADOS



ADULTOS
MAVORES



PACIENTES CON
ENFERMEDADE
CRONICAS



NEONATOS

INTRODUCCIÓN

INCIDENCIA DE SEPSIS EN CHILE

Tendencia ascendente desde 2017



110-130 casos por cada
100.000 habitantes



25%-30% mortalidad
hospitalaria
en pacientes críticos

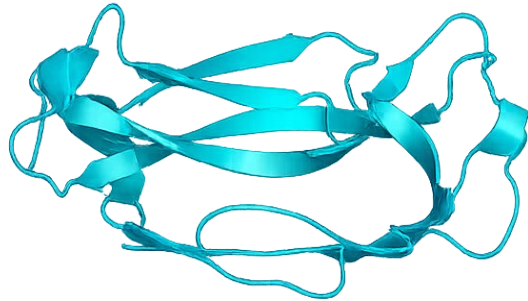
3^a

CAUSA PRINCIPAL DE MUERTE EN CHILE
después de enfermedades cardiovasculares y cáncer

INTRODUCCIÓN

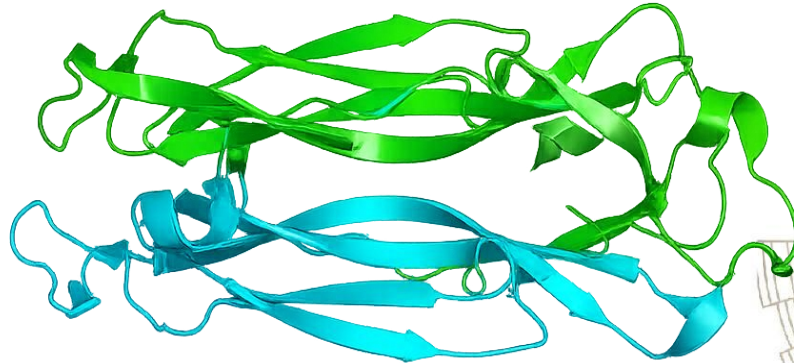
INTERLEUCINA 17A (IL-17A)

MONÓMERO



≈ 17 kDa

HOMODÍMERO

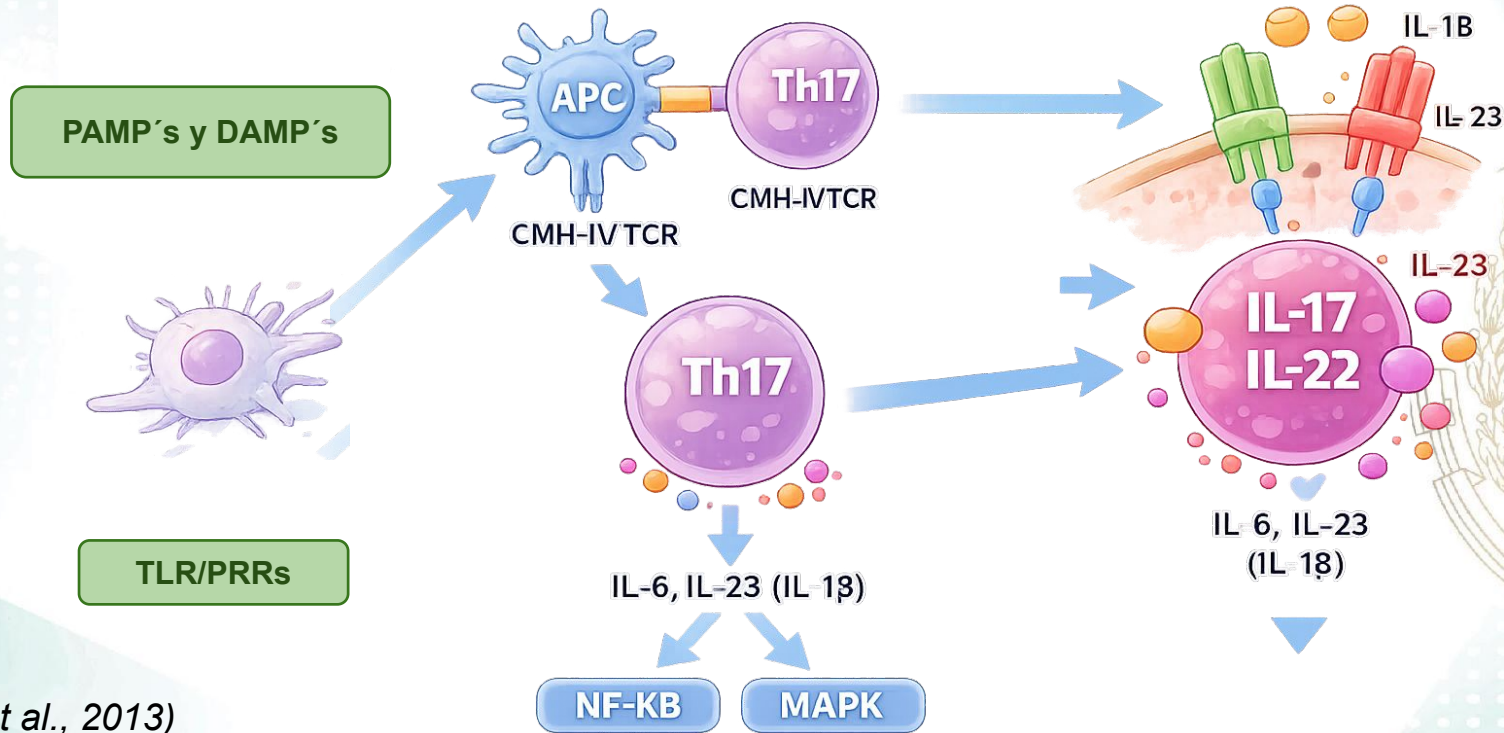


≈ 30 - 35 kDa

pI:8.82

INTRODUCCIÓN

Mecanismo de reconocimiento y señalización de IL-17A



(Liu et al., 2013)

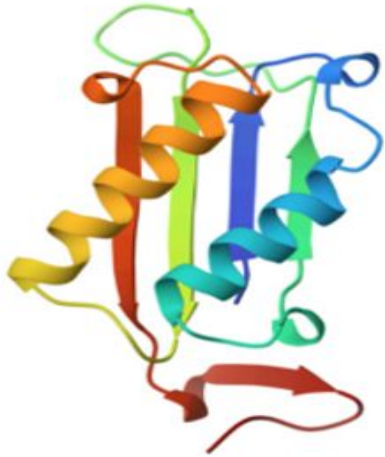
INTRODUCCIÓN



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

FACTOR DE INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)

MONÓMERO



≈ 11-12,5 kDa

HOMOTRÍMERO



≈ 35 - 40 kDa

pI:7.73

INTRODUCCIÓN

1. DESENCADENANTES



Bacterias



Virus



Hongos



Daño Tisular
(DAMPs)

2. RECONOCIMIENTO por PRRS (TLR2, TLR4, NLRs, etc.)



TLR2



TLR4



NLRs

3. ACTIVACIÓN DE CELULAS INNATAS



Macrófagos

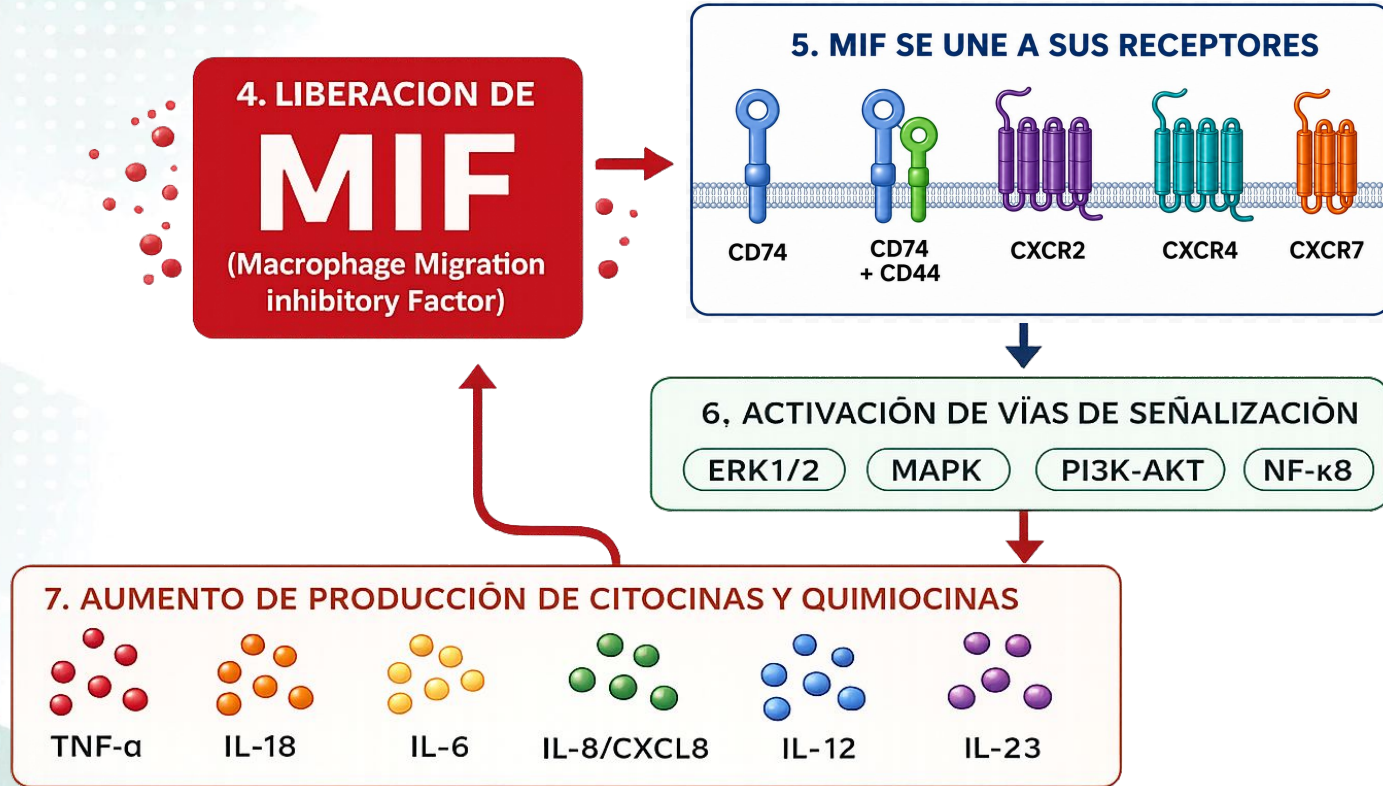


Monocitos



Células
dendríticas

**Mecanismos de
reconocimiento
y señalización
de MIF**

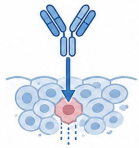
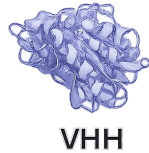


INTRODUCCIÓN

NANOANTICUERPO (VHH)

Nb
~15 kD

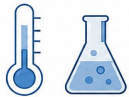
VHH



Mayor penetración tisular



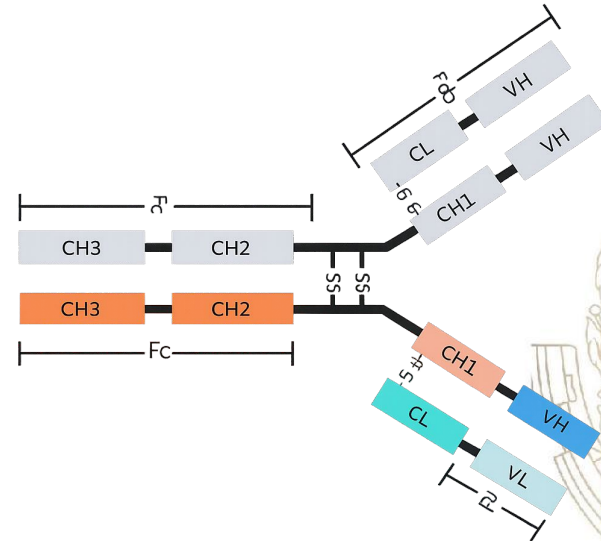
Acceso a epítopos crípticos



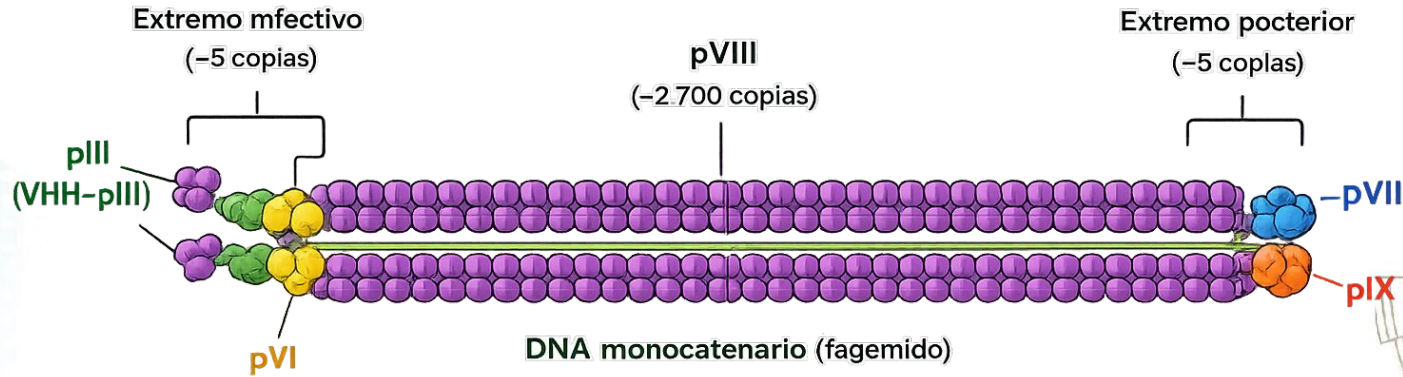
Estabilidad fisicoquímica

ANTICUERPO CONVENCIONAL (IgG)

IgG
~150 kD



TECNOLOGÍA PHAGE DISPLAY



OBJETIVO GENERAL

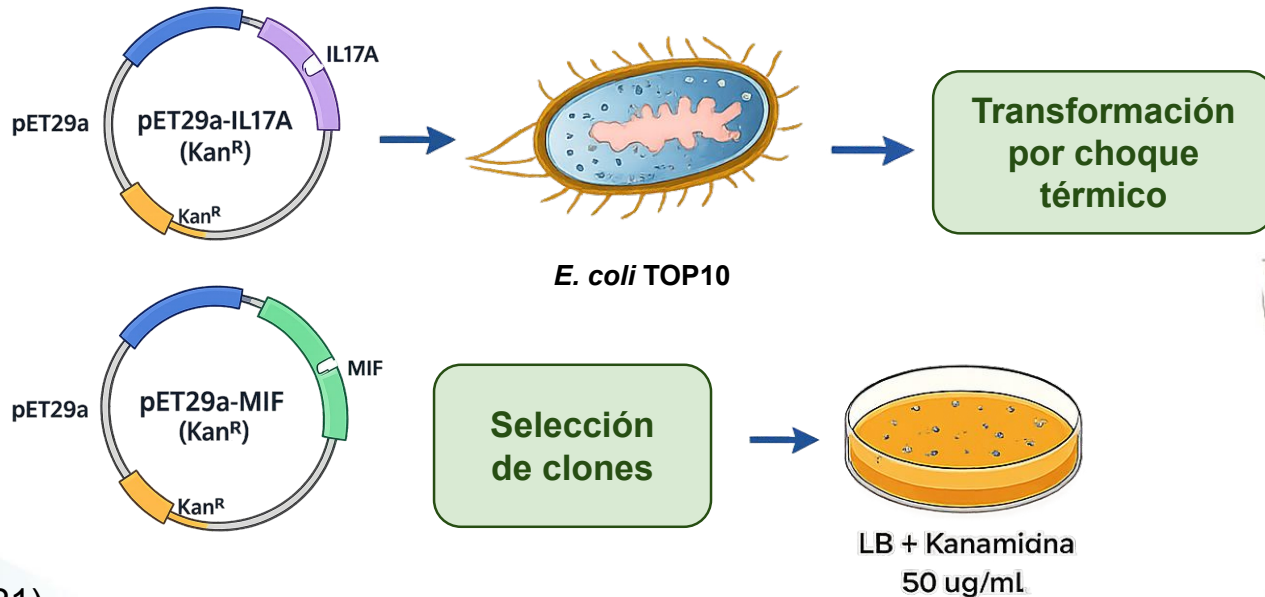
Seleccionar nanoanticuerpos específicos para las proteínas IL-17 y MIF.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante
 - Act. 1.1:** Clonar las secuencias de IL-17 y MIF en vectores de expresión recombinante.
 - Act. 1.2:** Expresar y purificar las proteínas mediante IMAC.
2. Seleccionar nanoanticuerpos específicos contra IL-17 y MIF
 - Act. 2.1:** Seleccionar nanoanticuerpos mediante phage display.
 - Act. 2.2:** Evaluar el reconocimiento de los nanoanticuerpos mediante phage -ELISA



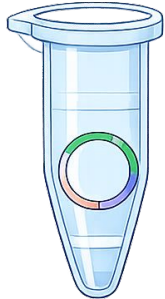
VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LOS CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS



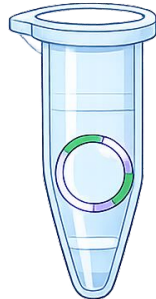
OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

VERIFICACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LOS CONSTRUCTOS PLASMÍDICOS

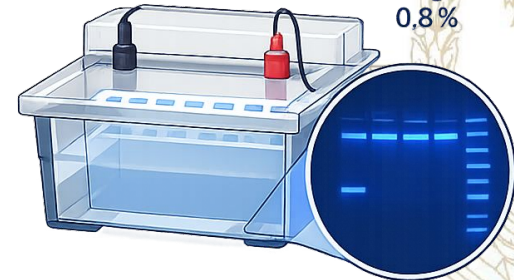
Extracción de ADN:
Lisis alcalina



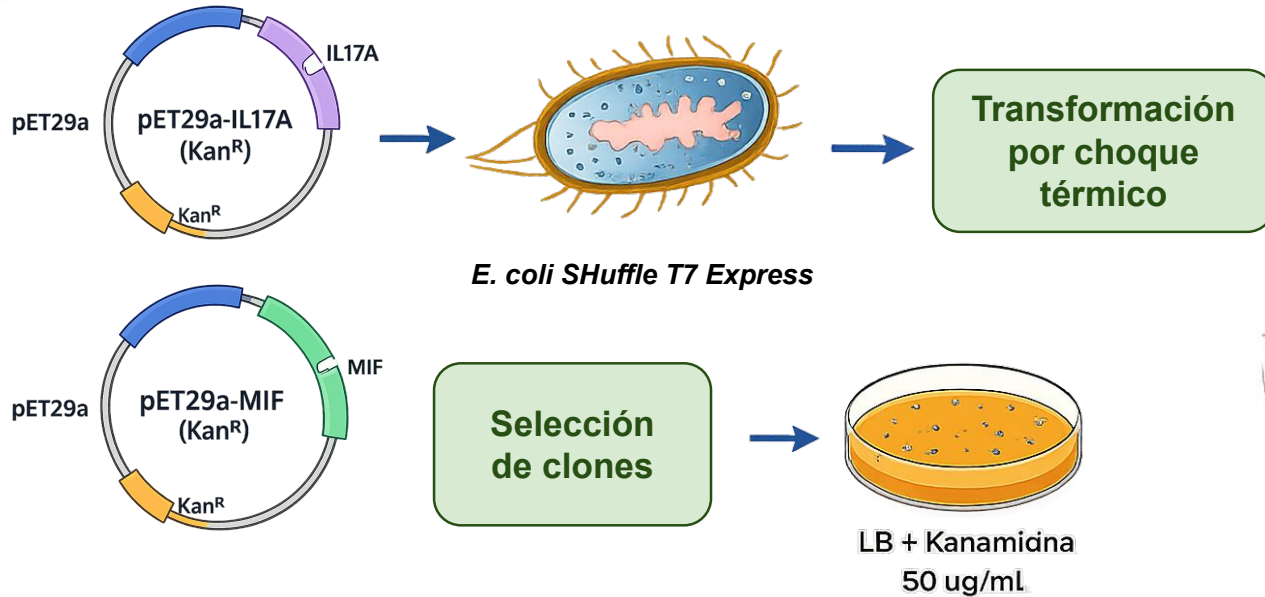
Digestión
enzimática



PvuII
(endonucleasa
de restricción)



PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES



EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE IL-17A Y MIF



Ensayos preliminares (20 mL)



- 25 °C, 7 h, IPTG 0.02 mM
- 16.°C, 16 h, IPTG 0.1–0.2 mM

Escalamiento (1 L)



- 37 °C, 3 h, IPTG 0.5 mM



PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES



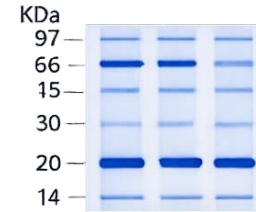
Perlas de zirconia 5 mm



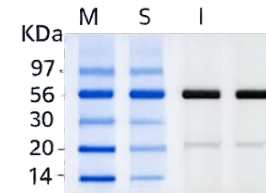
Sobrenadante
(fracción soluble)

Pellet
(fracción insoluble /
cuerpos de inducción)

SDS-PAGE (15%)



Western blot

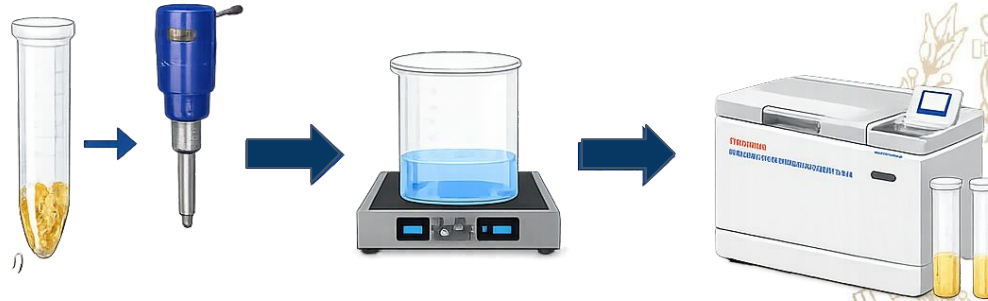


TRATAMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN

Lavados

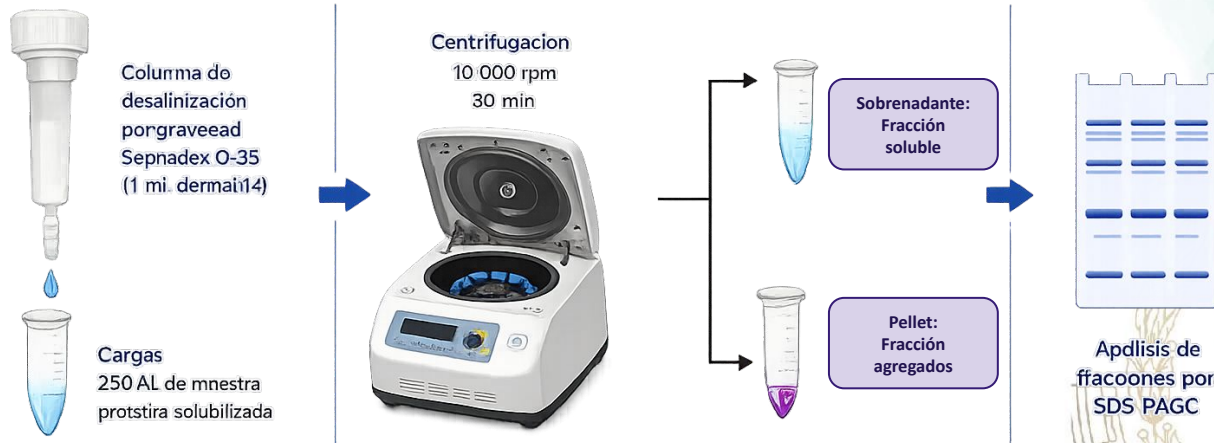


Solubilización de cuerpos de inclusión



RENATURALIZACIÓN POR SEC, CON FORMULACIONES CON BUFFER FOSFATO

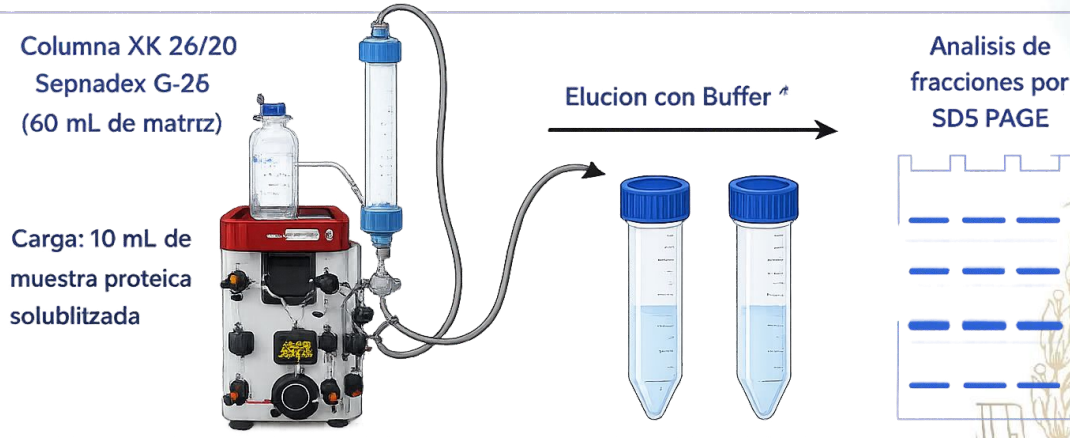
ESTRATEGIA 1 DE INTERCAMBIO DE BUFFER A pH 6



Buffer / Condición	B1	B2	B3	B4
Buffer fosfato 50 mM pH 6	✓	✓	✓	✓
NaCl 300 mM	✓	✓	✓	✓
Sacarosa 400 mM		✓		
Tween 0,02%	✓		✓	✓
GSSG 0,1 mM	✓	✓		✓

MONITOREO: RENATURALIZACIÓN POR SEC CON FORMULACIÓN B1

ESTRATEGIA 1 DE INTERCAMBIO DE BUFFER A pH 6



	B1
Buffer fostato 50 mM pH 6	✓
NaCl 300 mM	✓
Sacarosa 400 mM	✓
Tween 0,02%	✓
GSSG 0,1 mM	✓

RENATURALIZACIÓN Y DESALADO MEDIANTE GRADIENTES a pH 6, POR POR IMAC

10 mL dlo muestra
(IL. 17A o MIP)



Columna de
NI Sepharose[®]
High Performance
(10 mL de matriz)

BUFFER – GRADIENTE 1 (COULIBRACIÓN / CARGA)

- Buffer fosfato (pH 6)-50 mM
- NaCl 300 mM
- L-arginina 0.7 M
- Tween 20 0.05 %

BUFFER – GRADIENTE 2 (ELUCION)

- Buffer fosfato (pH 6) 50 mM
- NaCl 300 mM
- Sacarosa 25 mg/mL
- Tween 20 0.05 %

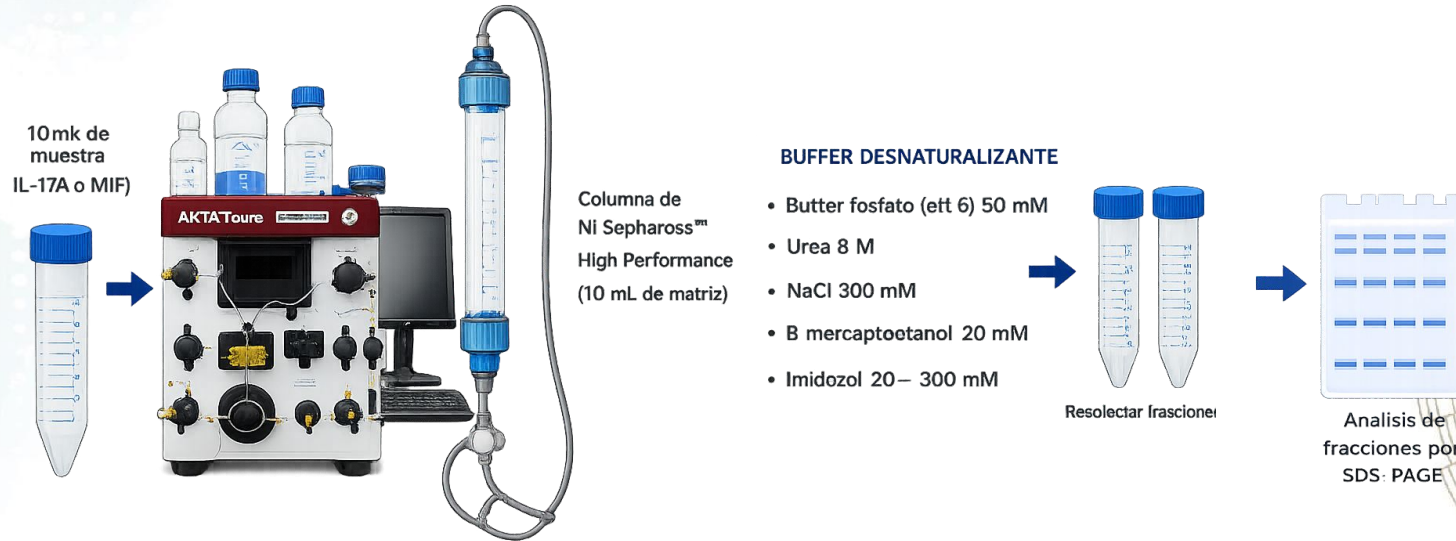


Reodectar frac

ESTRATEGIA 2 - INTERCAMBIO DE BUFFER A pH 6

(Islam et al., 2025).

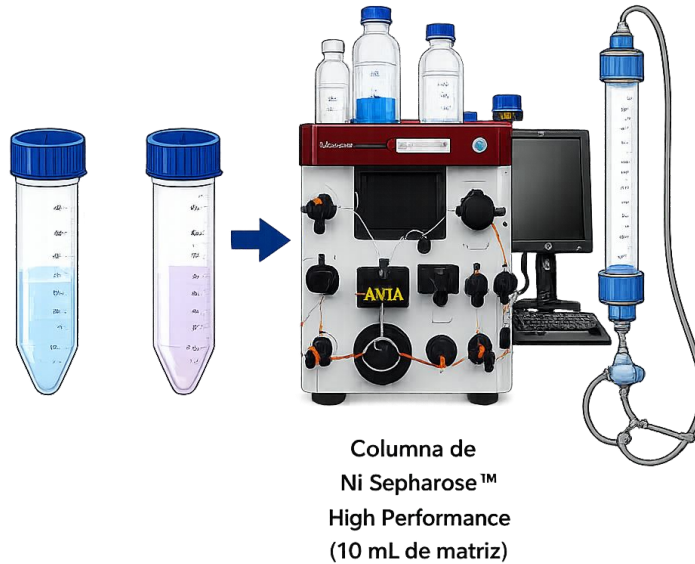
PURIFICACIÓN EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES Y REDUCTORAS POR IMAC A pH 6



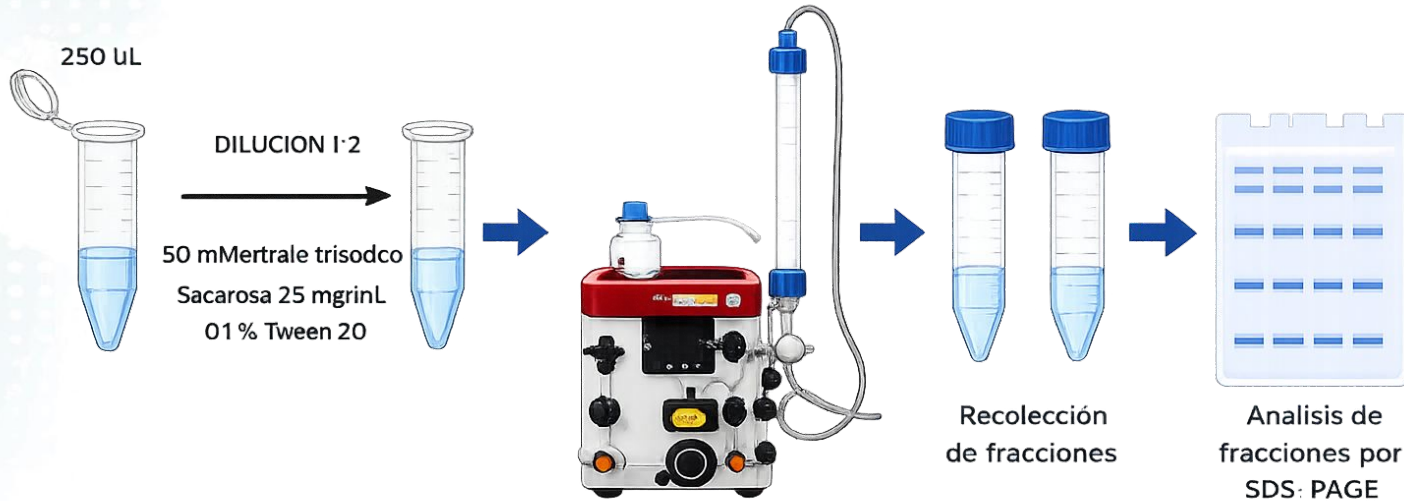
ESTRATEGIA 3 - INTERCAMBIO DE BUFFER A pH 6

PURIFICACIÓN EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES Y REDUCTORAS POR IMAC A pH 8

**ESTRATEGIA 1
DE
INTERCAMBIO
DE BUFFER A
pH 8**

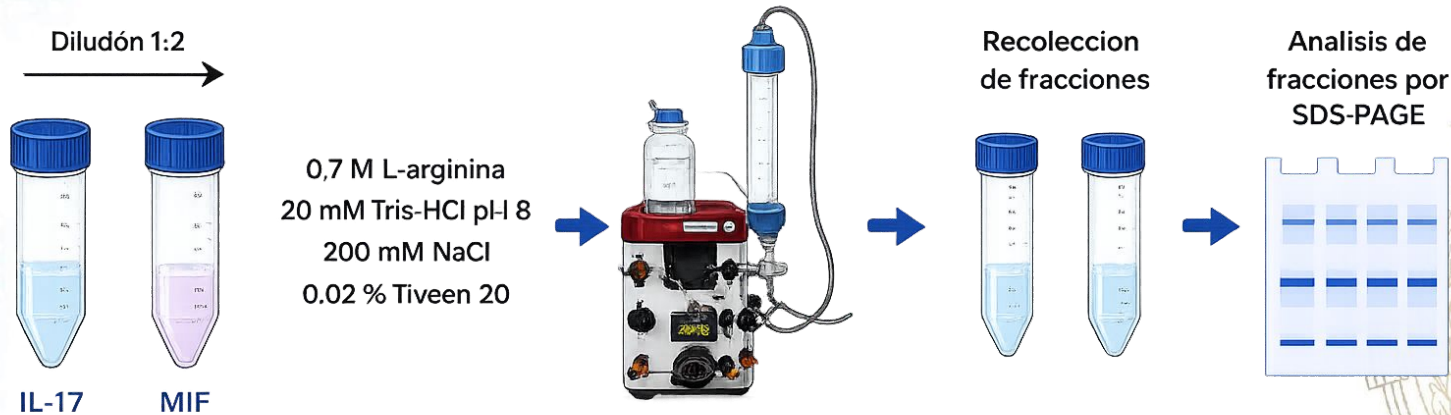


RENATURALIZACIÓN POR SEC, CON BUFFER BASADO EN CITRATO TRISÓDICO



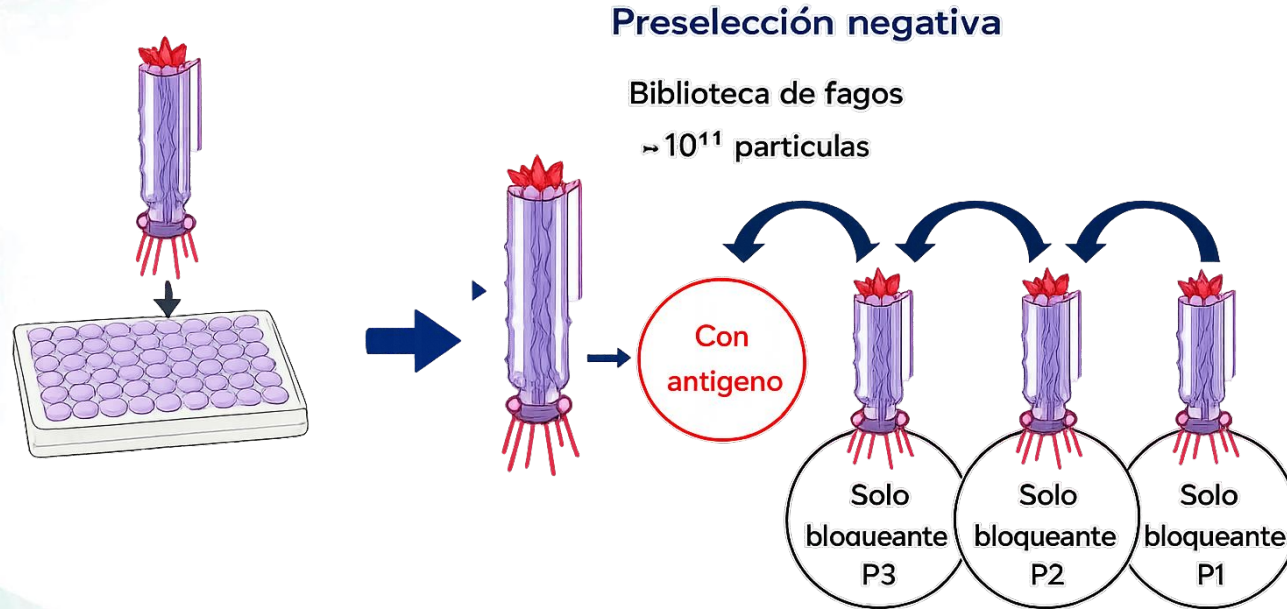
ESTRATEGIA 2 - INTERCAMBIO DE BUFFER A pH 8

RENATURALIZACIÓN POR SEC, CON BUFFER BASADO EN L-ARGININA



ESTRATEGIA 3 - INTERCAMBIO DE BUFFER A pH 8

SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS MEDIANTE BIOPANNING DE UNA RONDA



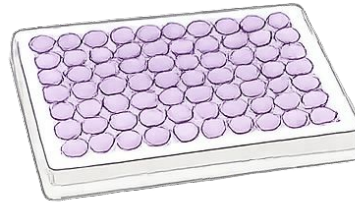
BIOPANNING DE UNA RONDA, CON ELUCIÓN COMPETITIVA

Lavados:

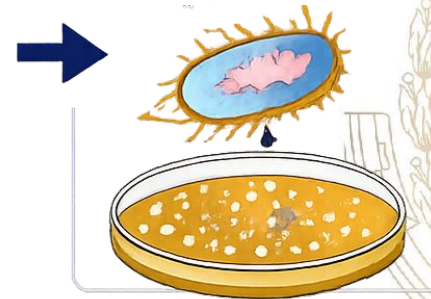
1. PBS-T 0,5% (40X)
2. Glicina HCl pH 2,2 (5X)
3. PBS-T 0,5% (40X)



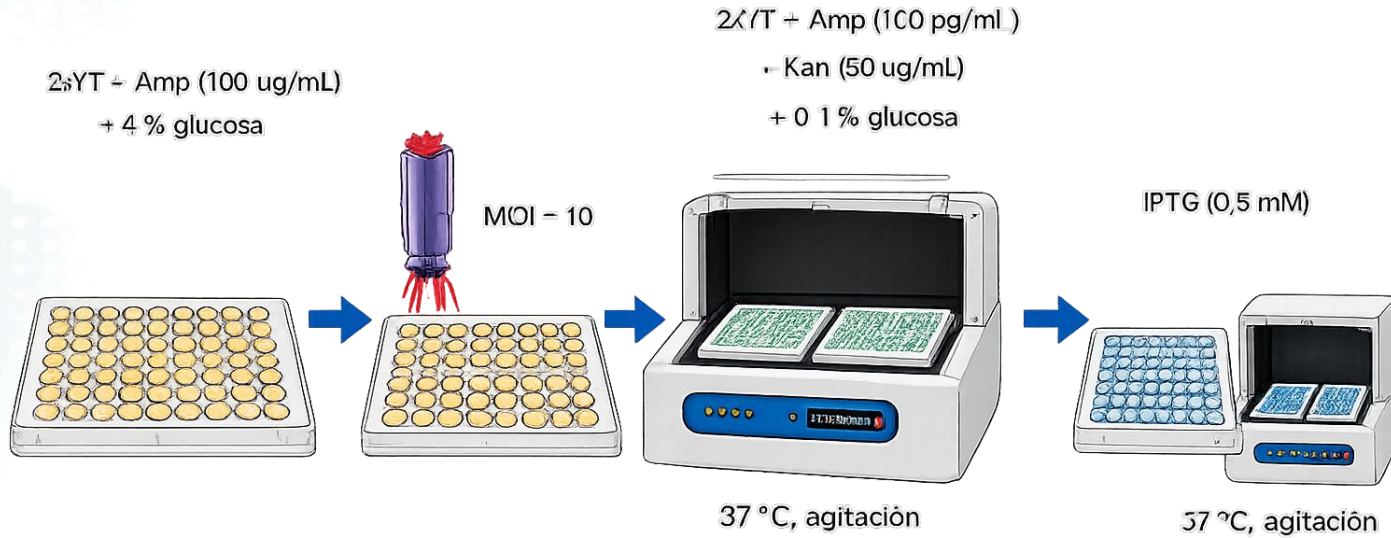
Elución competitiva



Infección de *E. coli* TG1



GENERACIÓN DE FAGÉMIDOS INDIVIDUALES



DETECCIÓN DE FAGÉMIDOS CON CAPACIDAD DE UNIRSE AL ANTÍGENO DIANA, *PHAGE-DISPLAY*

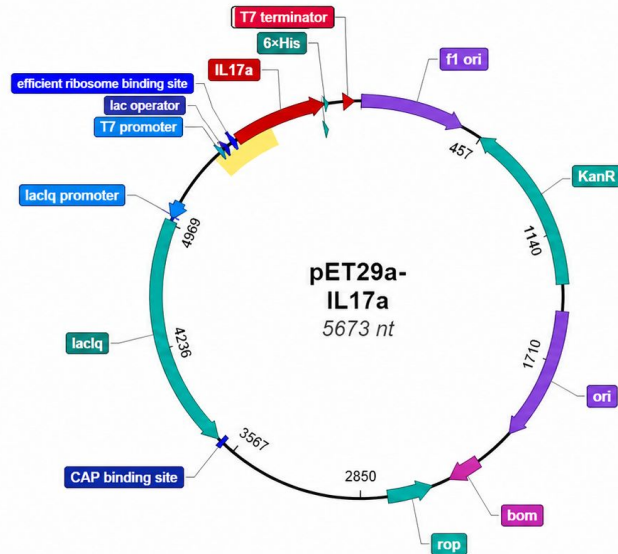


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

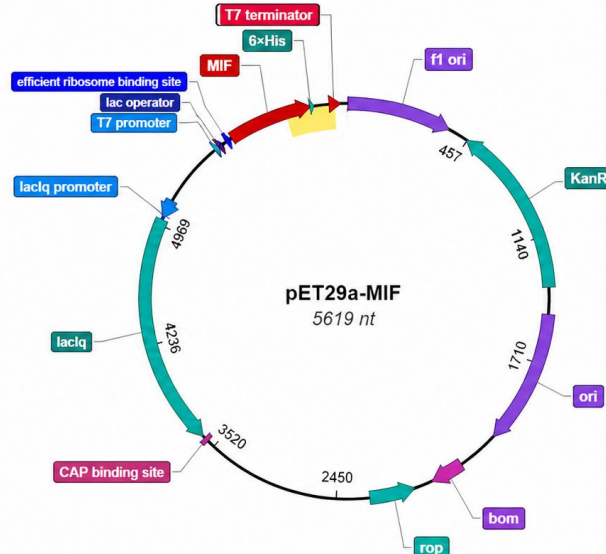
OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Verificación de la integridad de los constructos plasmídicos pET-29a-IL17A y pET-29a-MIF

A) Mapa del vector de expresión pET29a-IL17A



B) Mapa del vector de expresión pET29a-MIF



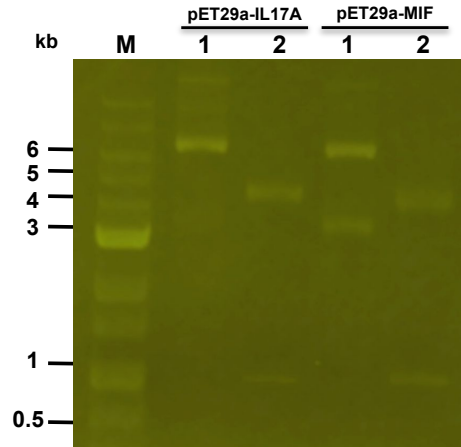
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Verificación de la integridad de los constructos plasmídicos pET-29a-IL17A y pET-29a-MIF

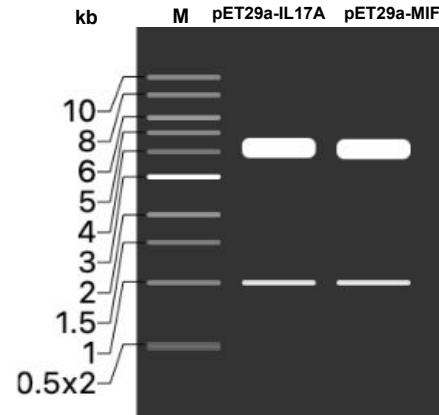
≈

A) Digestión enzimática con PvuII



1: Vector plasmídico no digerido
2: Vector plasmídico tras la
digestión enzimática con PvuII

B) Simulación in silico de la digestión enzimática con PvuLL con VectorBee

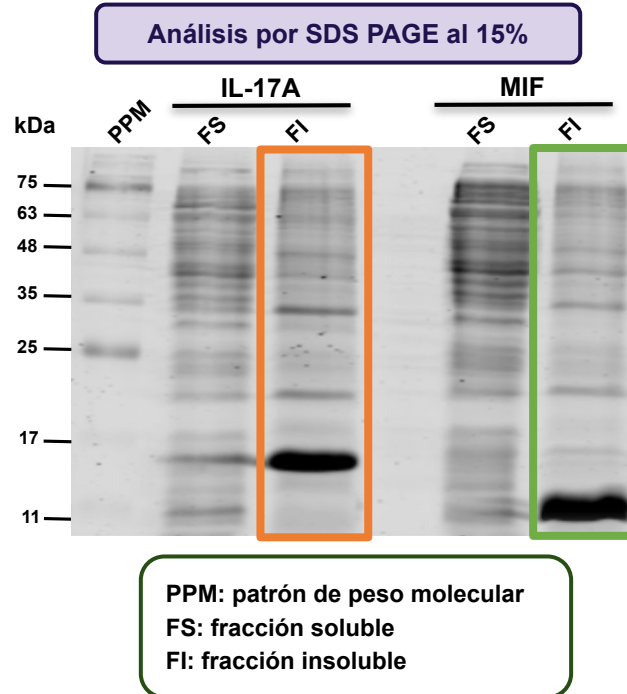


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación inicial de las condiciones de inducción de IL-17A y MIF en *E. coli* SHuffle

OD 600	0,8
IPTG	0,2 mM
Temperatura	25°C
Tiempo	7 h



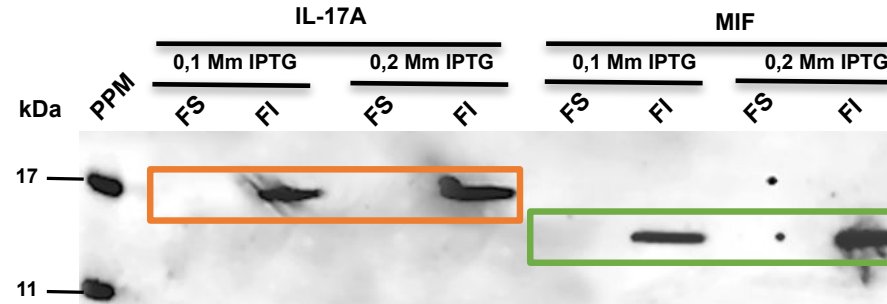
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Segunda evaluación de las condiciones de inducción de IL-17A y MIF en *E. coli* *SHuffle*

Análisis por western blot

OD 600	0,9
IPTG	0,1 mM - 0,2 mM
Temperatura	16°C
Tiempo	16 h

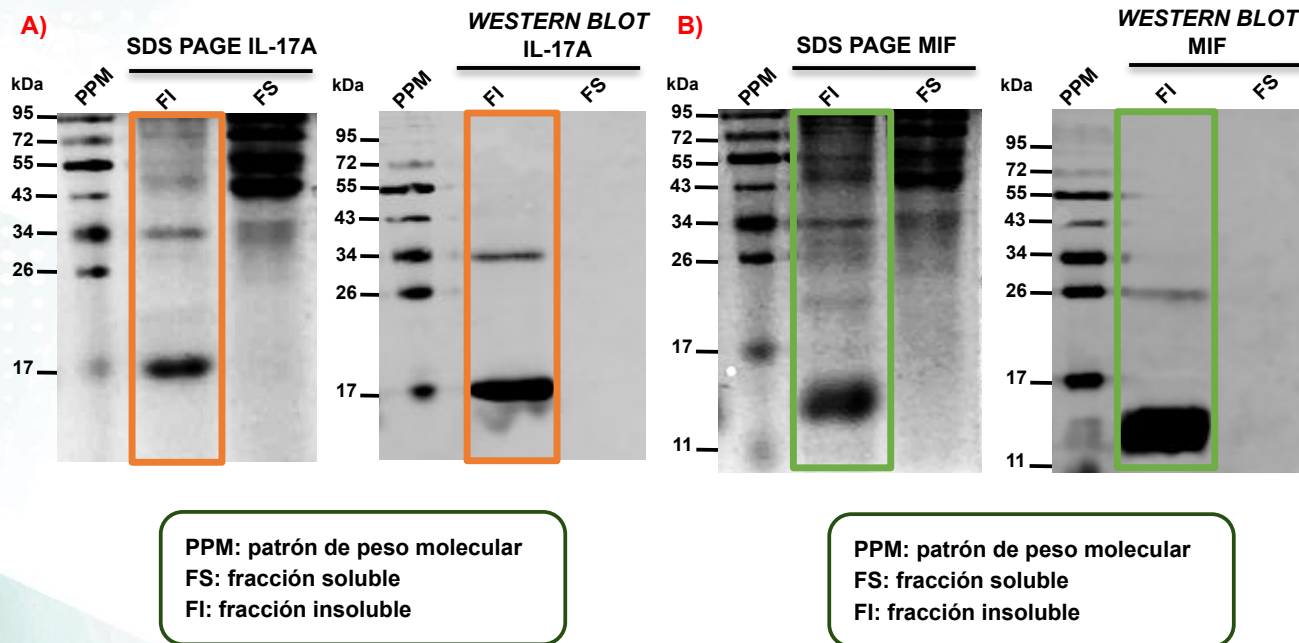


PPM: patrón de peso molecular
FS: fracción soluble
FI: fracción insoluble

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación final y escalamiento de la producción de IL-17A y MIF en *E. coli* Shuffle



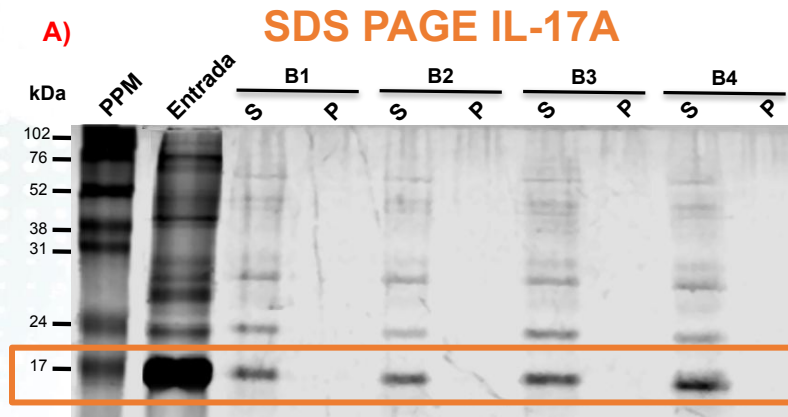
OD 600	0,6
IPTG	0,5 mM
Temperatura	37°C
Tiempo	3 h

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

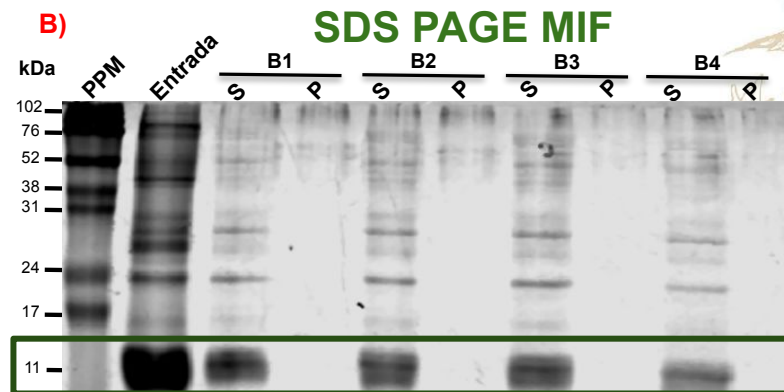
OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 1

Renaturalización de IL-17 y MIF por SEC con formulaciones basadas en buffer fosfato pH 6



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: Muestra previa a procesar
S: Sobrenadante (fracción soluble)
P: Pellet (fracción de agregados)
B1-B4: Formulaciones evaluadas



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: Muestra previa a procesar
S: Sobrenadante (fracción soluble)
P: Pellet (fracción de agregados)
B1-B4: Formulaciones evaluadas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

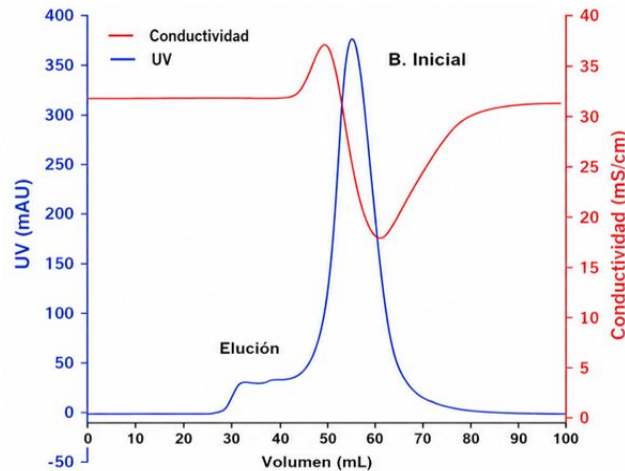
OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 1

Monitoreo: Renaturalización de IL-17A y MIF por SEC con B1 basado en buffer fosfato pH 6

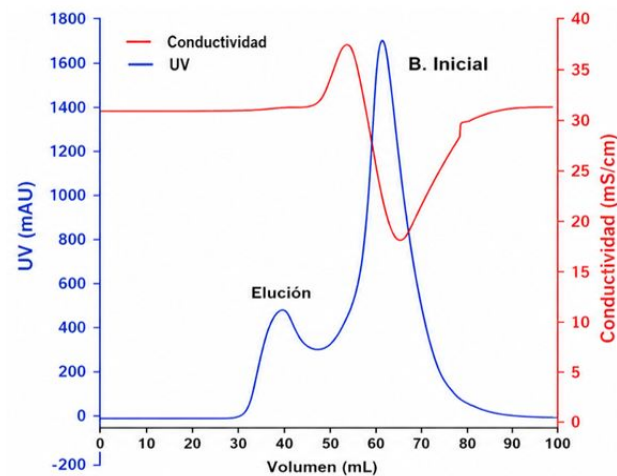
A)

CROMATOGRAMA DE IL-17A



B)

CROMATOGRAMA DE MIF



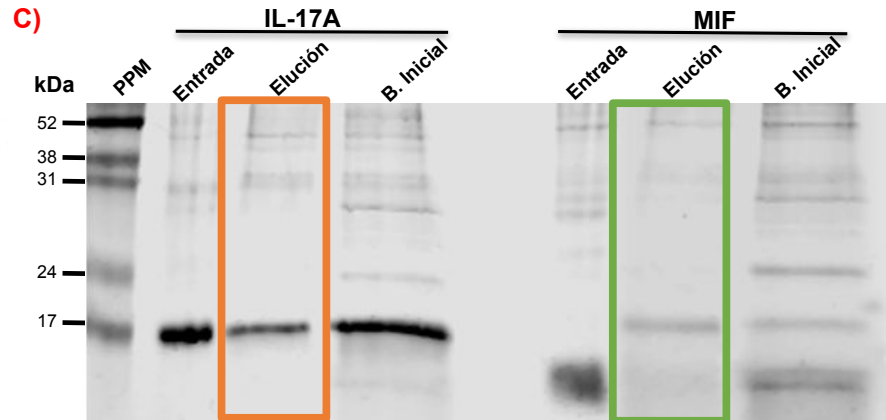
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 1

Monitoreo: Renaturalización de IL-17A y MIF, por SEC con B1 basado en buffer fosfato pH6

SDS PAGE al 15%



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
Elución
B. inicial: fracción post-elución asociada al buffer inicial.

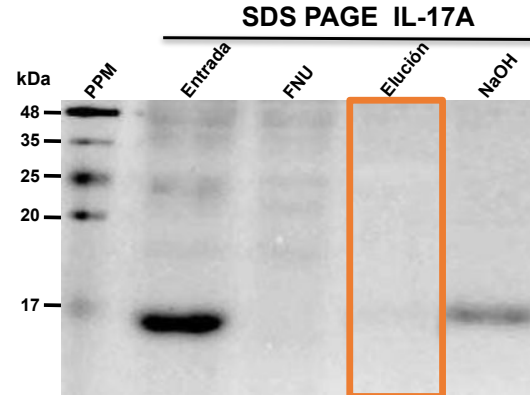
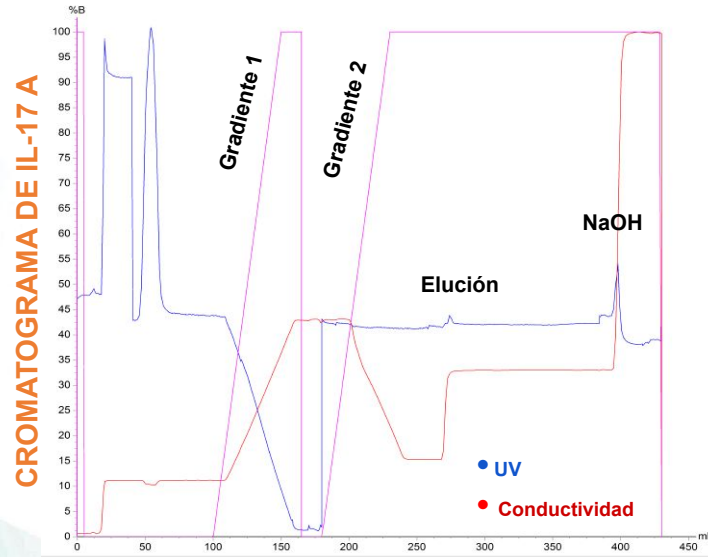


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 2

Renaturalización y desalado, por IMAC, de MIF por IMAC, mediante por gradientes a pH 6



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
FNU: fracción no unida
Elución
NaOH: fracción de limpieza de la columna

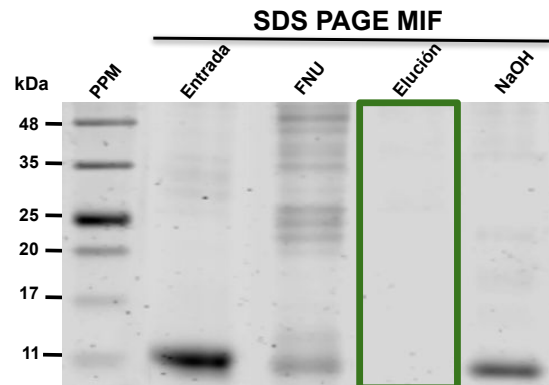
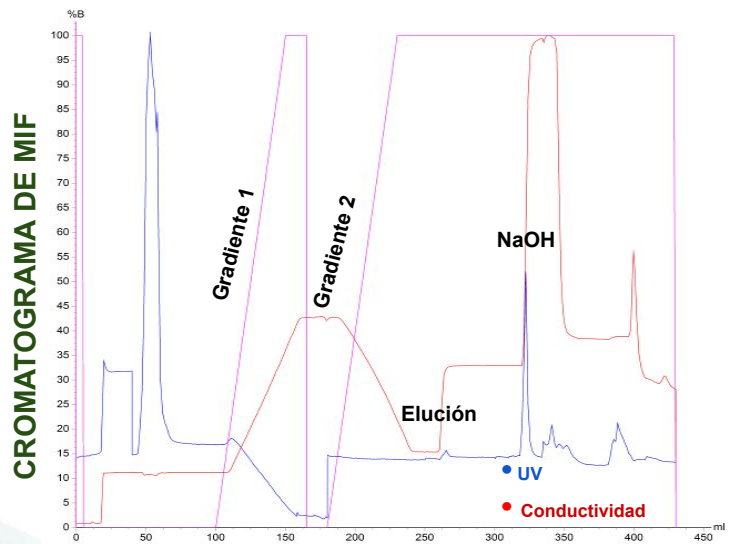
(Rigüero et al., 2020),

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 2

Renaturalización y desalado, por IMAC, de MIF por IMAC, mediante por gradientes a pH 6



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
FNU: fracción no unida
Elución
NaOH: fracción de limpieza de la columna

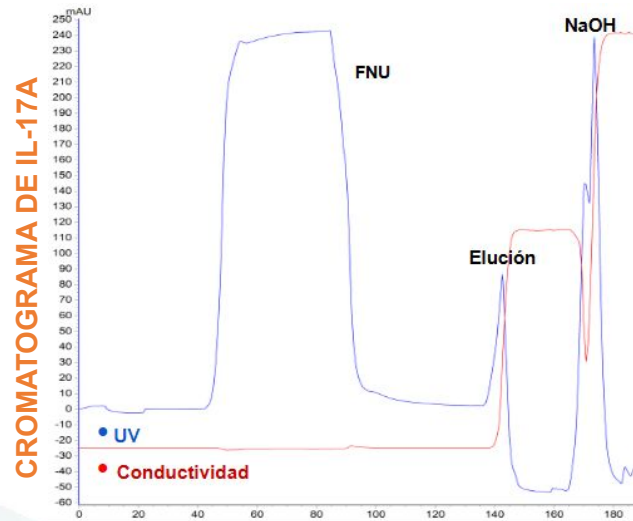


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

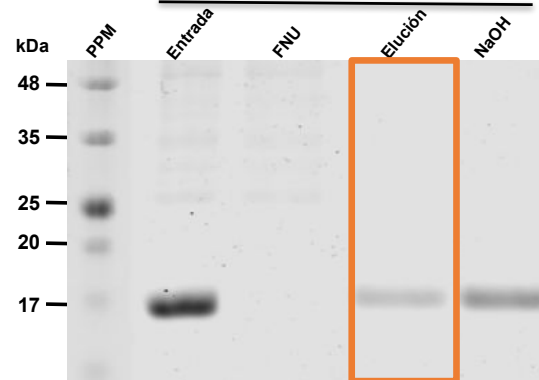
OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 3

Purificación en condiciones desnaturalizantes y reductoras por IMAC, de IL-17A a pH 6



SDS PAGE IL-17 A



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
FNU: fracción no unida
Elución
NaOH: fracción de limpieza de la columna

Buffer

Buffer fosfato (pH 6)
50 mM

Urea 8M

NaCl 300 mM

β -mercaptoetanol 20
mM

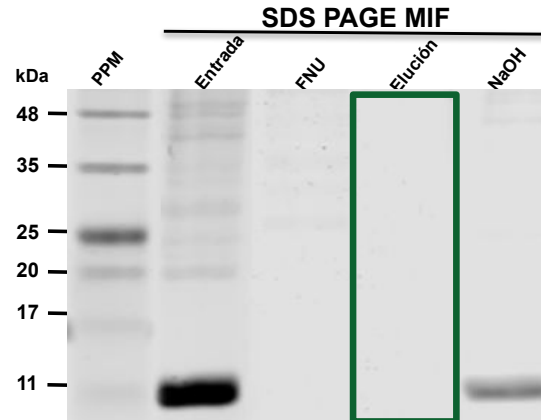
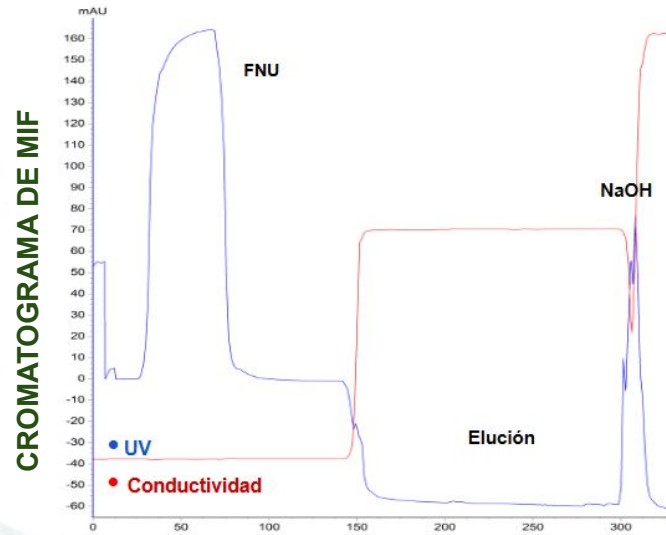
Imidazol 20 - 300 mM

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 6: Estrategia 3

Purificación en condiciones desnaturalizantes y reductoras por IMAC de MIF, a pH 6



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
FNU: fracción no unida
Elución
NaOH: fracción de limpieza de la columna

Buffer

Buffer fosfato (pH 6)
50 mM

Urea 8M

NaCl 300 mM

β -mercaptoetanol 20
mM

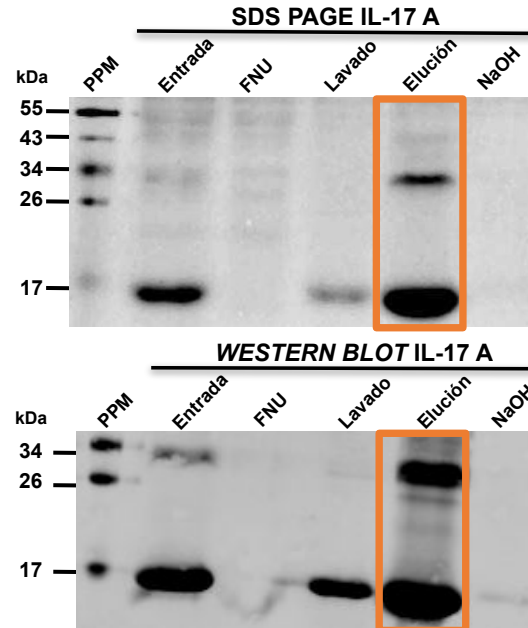
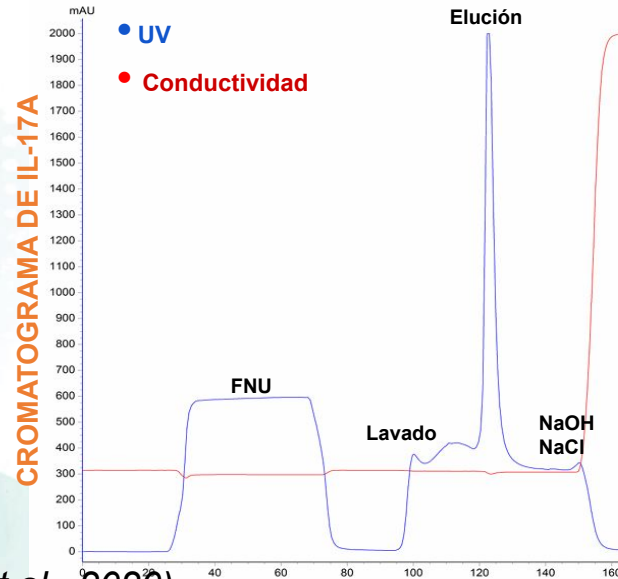
Imidazol 20 - 300 mM

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 8: Estrategia 1

Purificación en condiciones desnaturalizantes y reductoras por IMAC de IL-17A, a pH 8



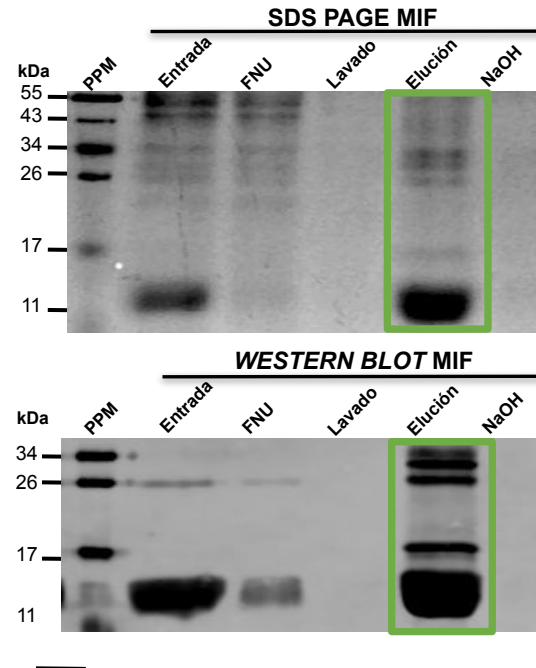
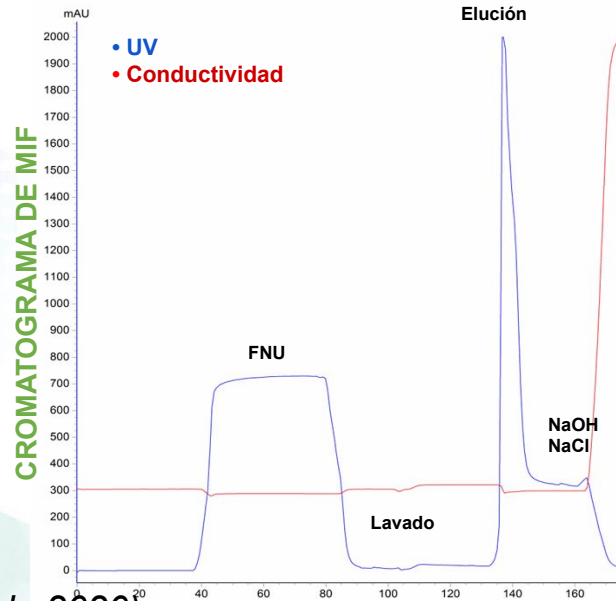
PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
FNU: fracción no unida
Lavado
Elución
NaOH: fracción de limpieza de la columna

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 8: Estrategia 1

**Purificación en condiciones desnaturalizantes
y reductoras por IMAC de MIF, a pH 8**



PPM: patrón de peso molecular
Entrada: muestra previa a procesar
FNU: fracción no unida
Lavado
Elución
NaOH: fracción de limpieza de la columna

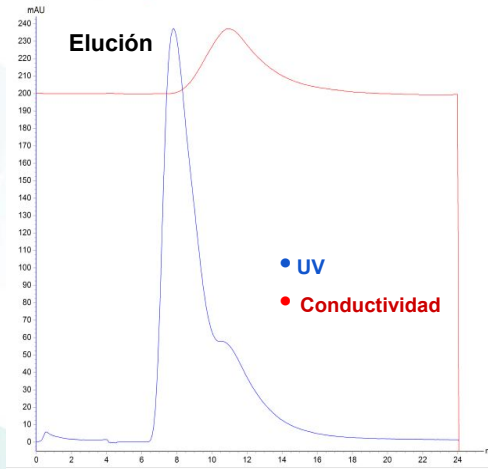
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

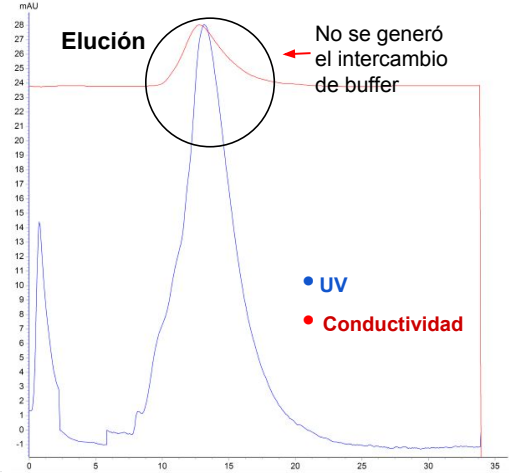
Evaluación de intercambio de buffer a pH 8: Estrategia 2

Renaturalización por SEC de IL-17A y MIF, con buffer basado en citrato trisódico a pH 8.

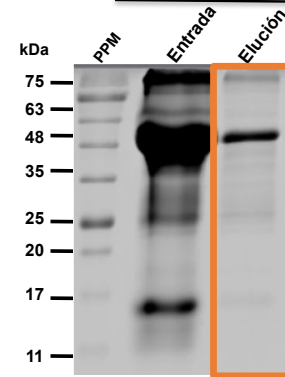
CROMATOGRAMA DE IL-17A



CROMATOGRAMA DE MIF



**SDS PAGE
IL-17A**



**SDS PAGE
MIF**



No se generó el
cambio de buffer

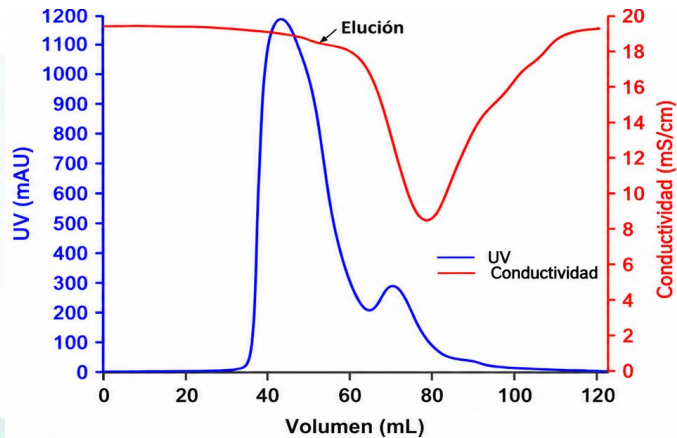
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

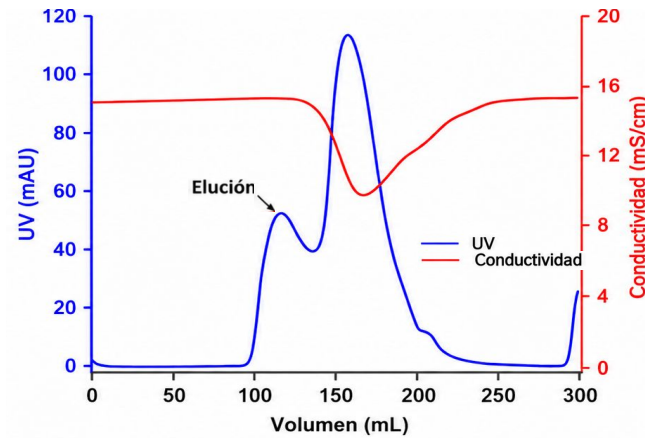
Evaluación de intercambio de buffer a pH 8: Estrategia 3

Renaturalización por SEC de IL-17A y MIF, con buffer basado en L-Arginina a pH 8

CROMATOGRAMA DE IL-17A



CROMATOGRAMA DE MIF

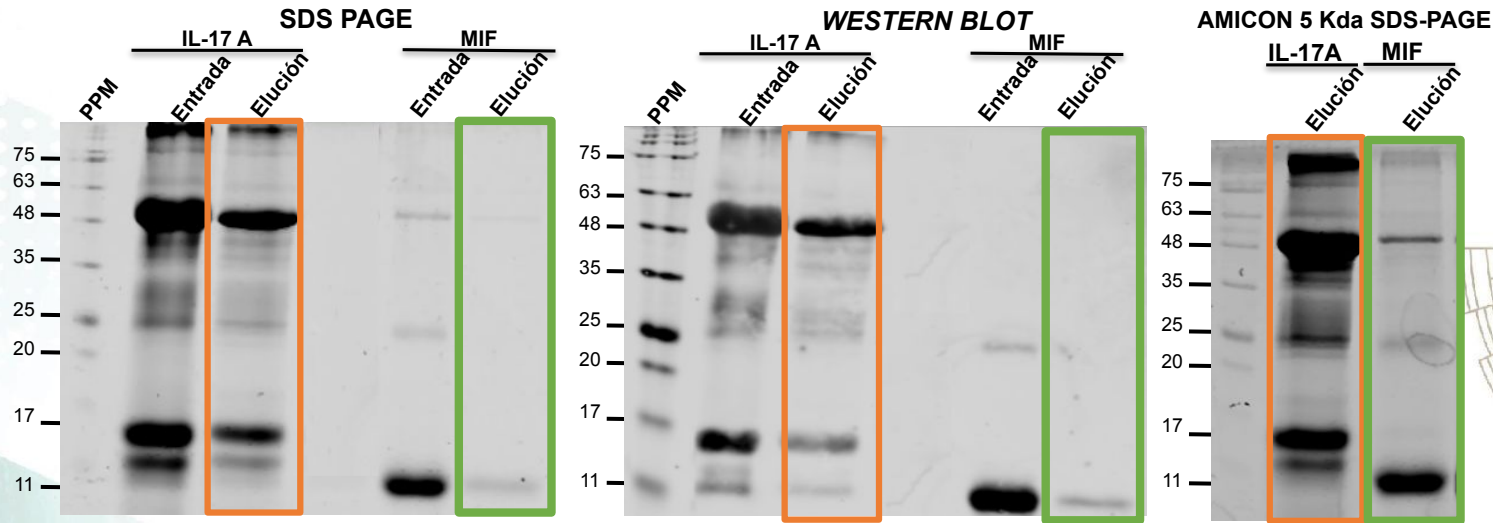


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Evaluación de intercambio de buffer a pH 8: Estrategia 3

Renaturalización por SEC de IL-17A y MIF, con buffer basado en L-Arginina a pH 8

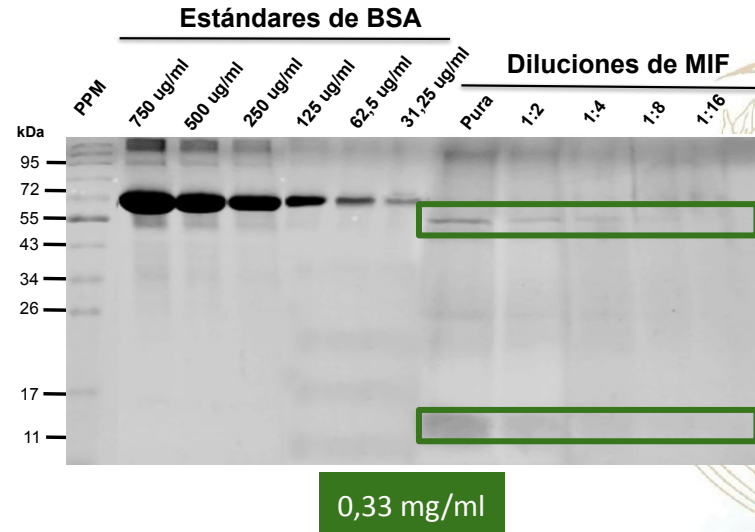
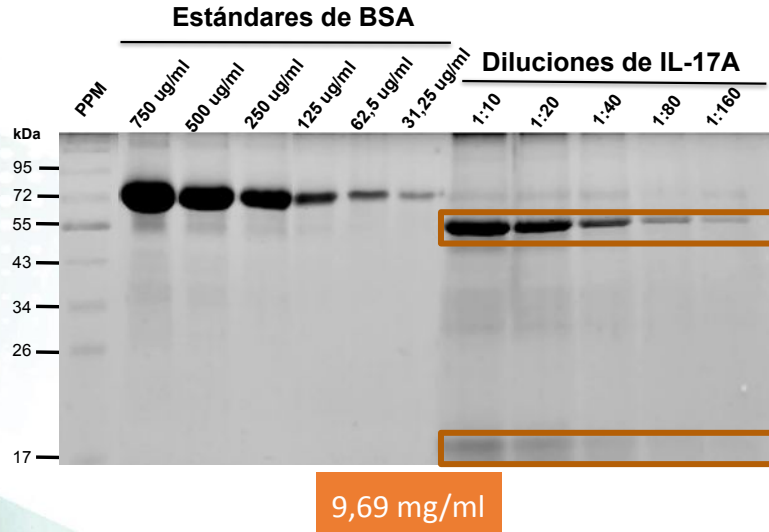


(Udupa et al., 2023).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 1: Expresar y purificar las proteínas por vía recombinante

Semi-cuantificación mediante densitometría de bandas en SDS-PAGE de las proteínas recombinantes IL-17A y MIF



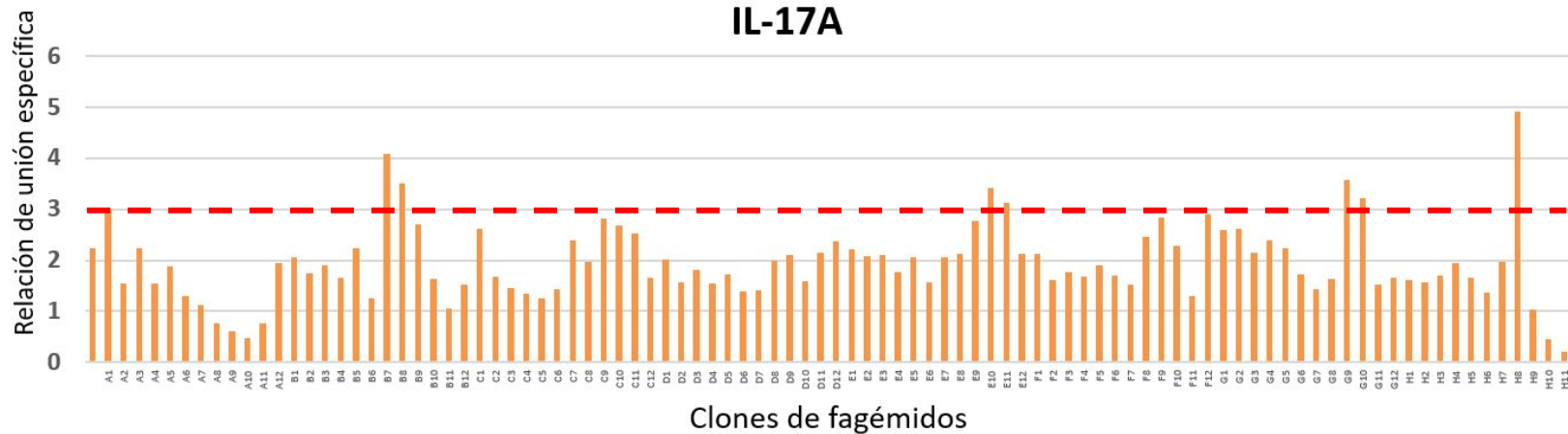
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 2: Seleccionar nanoanticuerpos específicos contra IL-17A y MIF



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Cribado de clones fagémicos mediante *phage*-ELISA

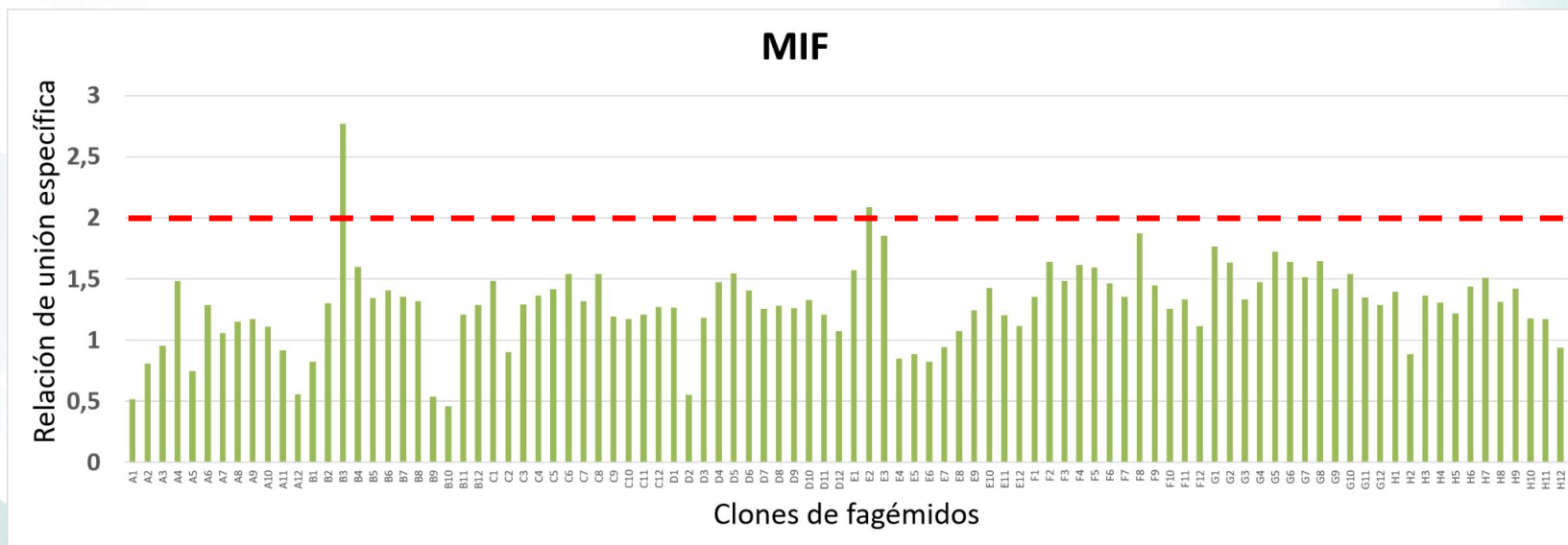


(Guilliams et al., 2020)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 2: Seleccionar nanoanticuerpos específicos contra IL-17A y MIF

Cribado de clones fagémicos mediante *phage*-ELISA



(Guilliams et al., 2020)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBJ. 2: Seleccionar nanoanticuerpos específicos contra IL-17 y MIF

Clones fagémicos que presentan VHH específicos contra IL-17A y MIF

IL-17A

Clon	Relación de unión específica
H9	4,908
B8	4,076
G10	3,565
B9	3,513
E11	3,424
G11	3,217
E12	3,121
A2	3,012

MIF

Clon	Relación de unión específica
B3	2,770
E2	2,089

CONCLUSIONES

Se obtuvo la expresión recombinante de IL-17A y MIF en cuerpos de inclusión y se estableció un protocolo de solubilización y purificación mediante IMAC.

Las estrategias de renaturalización evaluadas no permitieron obtener IL-17A y MIF recombinantes estables en solución.

El biopanning se realizó con proteínas purificadas en condiciones desnaturalizantes y reductoras (pH 8), condición que presentó la mayor recuperación proteica.

La selección por phage display permitió identificar ocho clones fagemídicos frente a IL-17A y dos frente a MIF con reconocimiento específico de sus antígenos.

Los clones fagemídicos seleccionados reconocen regiones accesibles de IL-17A y MIF con potencial conservación en la conformación nativa.

RECOMENDACIONES

Evaluar la afinidad de los clones seleccionados mediante técnicas de interacción molecular para identificar los candidatos con mayor capacidad de reconocimiento.

Secuenciar los clones fagémicos seleccionados para identificar VHH únicos y seleccionar candidatos para producción recombinante.

Expresar y purificar los nanobodies seleccionados para caracterizar sus propiedades estructurales e inmunológicas.

Validar el reconocimiento de los nanobodies frente a IL-17A y MIF en muestras biológicas que conserven la conformación nativa de las proteínas.

Implementar estrategias de maduración de afinidad para optimizar la unión y evaluar su potencial terapéutico.

AGRADECIMIENTOS



Universidad
de Concepción



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Agradezco a mi tutora, Dra. Thelvia Ramos Gómez, y a mi co-tutor, Dr. Oliberto Sánchez Ramos, por su guía, conocimientos y apoyo durante el desarrollo de esta investigación. A mi familia, por su amor, confianza y respaldo incondicional en cada etapa de este camino. Y a mis amigos, por su compañía, motivación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abulmagd, S., Khattab, A. E. A., & Zedan, H. (2022). Expression of full and fragment-B of diphtheria toxin genes in *Escherichia coli* for generating of recombinant diphtheria vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*, 11(1), 12-29. <https://doi.org/10.7774/cevr.2022.11.1.12>
- Akuta, T., Ura, T., Oikawa, T., Shibata, T., Shiraki, K., & Arakawa, T. (2025). Non-ionic Detergent-Assisted Refolding of Protein from Protein-SDS Complex. *The Protein Journal*, 45(1), 185-196. <https://doi.org/10.1007/s10930-025-10305-5>
- Baltà-Foix, R., Garcia-Fruitós, E., & Arís, A. (2024). Time to consider ruling out inclusion bodies denaturing protocols for spontaneous solubilization of biologically active proteins. *Scientific Reports*, 14(1), 26061. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77899-1>
- Behlam, I., Sudershan, A., Priya, I., Sudershan, S., Saini, A. K., Sharma, R., Younis, M., Sabharwal, R., Kumar, P., Manhas, S., & Kumar, P. (2025). Association between ESR1 polymorphisms (XbaI & PvuII) and breast cancer risk: a comprehensive meta-analysis of case-control studies. *Breast Cancer Res Treat*, 214(2), 131-148. <https://doi.org/10.1007/s10549-025-07800-9>
- Bergamo, A., & Sava, G. (2024). Lysozyme: A Natural Product with Multiple and Useful Antiviral Properties. *Molecules*, 29(3). <https://doi.org/10.3390/molecules29030652>
- Camacho Meza, G., Avalos Navarro, G., De La Cruz Mosso, U., Ramirez Patino, R., Munoz Valle, J. F., & Bautista Herrera, L. A. (2025). Macrophage migration inhibitory factor: Exploring physiological roles and comparing health benefits against oncogenic and autoimmune risks (Review). *Int J Mol Med*, 56(4). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2025.5590>
- Chen, D., Darabedian, N., Li, Z., Kai, T., Jiang, D., & Zhou, F. (2016). An improved Bathocuproine assay for accurate valence identification and quantification of copper bound by biomolecules. *Analytical Biochemistry*, 497, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.12.014>
- Cheng, A., Holland, S.M. (2024). Anti-cytokine autoantibodies: mechanistic insights and disease associations. *Nat Rev Immunol* 24, 161–177. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00933-2>
- Chura-Chambi, R. M., Farah, C. S., & Morganti, L. (2022). Human growth hormone inclusion bodies present native-like secondary and tertiary structures which can be preserved by mild solubilization for refolding. *Microb Cell Fact*, 21(1), 164. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01887-1>

BIBLIOGRAFÍA

- Gordon, K. B., Blauvelt, A., Papp, K. A., Langley, R. G., Luger, T., Ohtsuki, M., Reich, K., Amato, D., Ball, S. G., Braun, D. K., Cameron, G. S., Erickson, J., Konrad, R. J., Muram, T. M., Nickoloff, B. J., Osuntokun, O. O., Secrest, R. J., Zhao, F., Mallbris, L.,...Group, U.-S. (2016). Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*, 375(4), 345-356. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1512711>
- Igwe, C. L., Müller, D. F., Gisperm, F., Pauk, J. N., Kierein, M., Elshazly, M., Klausser, R., Kopp, J., Spadiut, O., & Přáda Brichtová, E. (2024). Online monitoring of protein refolding in inclusion body processing using intrinsic fluorescence. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 416(12), 3019-3032. <https://doi.org/10.1007/s00216-024-05249-1>
- İncir, İ., & Kaplan, Ö. (2024). *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. *Protein Expr Purif*, 219, 106463. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106463>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2024). Camas y egresos hospitalarios 2024. INEC. Retrieved 17 May 2026 from
- Islam, M. D., Islam, M. M., & Kuroda, Y. (2025). Ni(2+)-induced selective precipitation of His-tagged recombinant proteins shortens purification time while maintaining high yield. *J Biotechnol*, 399, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.01.006>
- Jäger, V. D., Lamm, R., Küsters, K., Ölçücü, G., Oldiges, M., Jaeger, K. E., Büchs, J., & Krauss, U. (2020). Catalytically-active inclusion bodies for biotechnology-general concepts, optimization, and application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(17), 7313-7329. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10760-3>
- Jin, B. K., Odongo, S., Radwanska, M., & Magez, S. (2023). NANOBODIES(R): A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065994>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf501>

BIBLIOGRAFÍA

- Li, R., Zhu, X., Zhou, P., Qiao, Y., Li, Y., Xu, Y., & Shi, X. (2022). Generation of a High-Affinity Nanobody Against CD147 for Tumor Targeting and Therapeutic Efficacy Through Conjugating Doxorubicin. *Front Immunol*, 13, 852700. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.852700>
- Li, S., Shen, W., Xia, Y., Chen, X., & Yang, H. (2024). Efficient heterologous expression of cellobiose 2-epimerase gene in *Escherichia coli* under the control of T7 lac promoter without addition of IPTG and lactose. *Protein Expr Purif*, 223, 106558. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2024.106558>
- Li, T., Qu, J., Hu, C., Pang, J., Qian, Y., Li, Y., & Peng, Z. (2024). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) suppresses mitophagy through disturbing the protein interaction of PINK1-Parkin in sepsis-associated acute kidney injury. *Cell Death Dis*, 15(7), 473. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06826-z>
- Li, W. (2023). Distinct enzymatic strategies for de novo generation of disulfide bonds in membranes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 58(1), 36-49. <https://doi.org/10.1080/10409238.2023.2201404>
- Liu, B., & Yang, D. (2022). Easily Established and Multifunctional Synthetic Nanobody Libraries as Research Tools. *Int J Mol Sci*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031482>
- Liu, S., Song, X., Chrnyk, B. A., Shanker, S., Hoth, L. R., Marr, E. S., & Griffor, M. C. (2013). Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat Commun*, 4, 1888. <https://doi.org/10.1038/ncomms2880>
- Liu, X., Chen, L., Peng, W., Deng, H., Ni, H., Tong, H., Hu, H., Wang, S., Qian, J., Liang, A., & Chen, K. (2024). Th17/Treg balance: the bloom and wane in the pathophysiology of sepsis. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1356869>
- Liu, Z., Ting, Y., Li, M., Li, Y., Tan, Y., & Long, Y. (2024). From immune dysregulation to organ dysfunction: understanding the enigma of Sepsis. *Front Microbiol*, 15, 1415274. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1415274>
- Loughran, S. T., Bree, R. T., & Walls, D. (2023). Poly-Histidine-Tagged Protein Purification Using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). *Methods Mol Biol*, 2699, 193-223. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_11
- Luo, X., Pamidi, A. S., Gardner, Z., Alrashaidi, F. A., Raston, C. L., & Weiss, G. A. (2024). Ultrafast His-Tagged Protein Purification. *Current Protocols*, 4(9), e70006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cpz1.70006>

BIBLIOGRAFÍA

- OMS. (2024). Sepsis: Datos y cifras. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sepsis?utm_source=chatgpt.com
- ONU. (2023). Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible 2023: Edición especial.
https://unstats.un.org/sdgs/report/2023/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2023_Spanish.pdf
- Paroni, M., Leccese, G., Ranzani, V., Moschetti, G., Chiara, M., Perillo, F., Ferri, S., Clemente, F., Noviello, D., Conforti, F. S., Ferrero, S., Karnani, B., Bosotti, R., Vasco, C., Curti, S., Crosti, M. C., Guarini, P., Rossetti, G., Conte, M. P.,...Geginat, J. (2023). An Intestinal Th17 Subset is Associated with Inflammation in Crohn's Disease and Activated by Adherent-invasive Escherichia coli. *J Crohns Colitis*, 17(12), 1988-2001. <https://doi.org/10.1093/ecco-icc/ijad119>
- Pauk, J. N., Raju Palanisamy, J., Kager, J., Koczka, K., Berghammer, G., Herwig, C., & Veiter, L. (2021). Advances in monitoring and control of refolding kinetics combining PAT and modeling. *Appl Microbiol Biotechnol*, 105(6), 2243-2260.
<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11151-y>
- Pesarrodona, M., Latorre, I., & Salvatella, X. (2022). Intrinsically Disordered Proteins (IDP): Purification Under Denaturing Conditions. *Methods Mol Biol*, 2406, 359-370. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1859-2_21
- Pury, S., Saranz, R. J., Irastorza, M. J., Sasia, L. V., Visconti, P., Alegre, G., Lozano, N. A., Berardi, Y. V., & Lozano, A. (2024). [Monoclonal Antibodies in Allergic Diseases: Development, Pharmacology, and Clinical Applications]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, 81(4), 804-823. <https://doi.org/10.31053/1853.0605.v81.n4.44413> (Anticuerpos monoclonales en enfermedades alérgicas: desarrollo, farmacología y aplicaciones clínicas.)
- Ramon, A., Ali, M., Atkinson, M., Saturnino, A., Didi, K., Visentin, C., Ricagno, S., Xu, X., Greenig, M., & Sormanni, P. (2024). Assessing antibody and nanobody nativeness for hit selection and humanization with AbNatiV. *Nature Machine Intelligence*, 6(1), 74-91. <https://doi.org/10.1038/s42256-023-00778->