



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FAGO-  
ANTICUERPOS CONTRA MELITINA POR  
RESONANCIA DE PLASMONES  
SUPERFICIALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NOMBRE DEL ALUMNO

EVERARDO REMI RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

TUTOR:

Dr. EDUARDO HORJALES REBOREDO

2007





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

<p>1.Datos del alumno  Rodríguez  Rodríguez  Everardo Remi  55 79 92 23  Universidad Nacional Autónoma de México  Facultad de Ciencias  Biología  099277114</p>
<p>2.Datos del tutor  Dr  Eduardo  Horjales  Reboredo</p>
<p>3. Datos del sinodal 1  Dr  Luís Felipe  Jiménez  García</p>
<p>4.Datos del sinodal 2  Dr  Baltazar  Becerril  Luján</p>
<p>5.Datos del sinodal 3  Dr  Enrique  Rudiño  Piñera</p>
<p>6. Datos del sinodal 4  M en C  Raúl  Contreras  Medina</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito  Selección y caracterización de fago-anticuerpos contra melitina por resonancia de plamones superficiales  65p  2007</p>



FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:  
Selección y caracterización de fago-anticuerpos contra melitina por resonancia  
de plasmones superficiales.  
realizado por Everardo Remi Rodríguez Rodríguez  
con número de cuenta 099277114 , quien cubrió los créditos de la licenciatura en Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a) Propietario Dr. Eduardo Horjales Reboredo

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario Dr. Baltazar Becerril Luján

Suplente Dr. Enrique Rudiño Piñera

Suplente M. en C. Raúl Contreras Medina

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D.F., a 12 de Febrero  
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE Biología

del 2007

FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. Zenón Cano Santana



*Dedico la tesis a mi Mamá por darme las herramientas para salir adelante y creer siempre en mí, a mi Abuelita por hacerme crecer y cuidarme en todo momento donde quiera que me encuentre, a mis hermanos (Erika, Endia, Brenda, Edgar, Octavio, Adán y Julio), a Jaz y familia a todos ellos, por estar siempre a mi lado, brindarme su apoyo incondicional en cualquier situación y los buenos momentos, a Yeyo por hacerme sonreír en todo momento, a mi Papá por la gran ayuda a pesar de la distancia, a mis tíos (Pedro y Rosa) y a mis primos (Picos y Ale). Gracias los quiero mucho.*

*“Nunca dejes de creer en ti y lograras lo que quieras”  
Solid Snake*

## Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Horjales Reboredo por la oportunidad de participar en su grupo y realizar este trabajo, así como por ser un gran apoyo como tutor.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por los consejos y el buen humor.

A Biol. Sonia Rojas por el asesoramiento metodológico.

Al Dr. Baltasar Becerril y la Dra. Lidia Riaño por su ayuda para la realización de este proyecto.

Al Dr. Luís Felipe Jiménez García por la revisión de este trabajo así como sus comentarios.

Al M. en C. Raúl Contreras Medina por sus comentarios y la gran ayuda académica y personal a lo largo de la carrera.

Al Instituto de Biotecnología por la beca otorgada.

A los profesores de la facultad Rogelio Aguilar, Felipe Alcantara y Bety.

A los compañeros de laboratorio; Dra. Brenda, Eugenio, Yagul, Jonathan, Paloma, Francisco, Mariana, David, Erica, Eleuterio, Mauricio.

A mis amigos y compañeros de la facultad; Alfonso, Francisco, Daniela, Juan, Jesús, Benjamín y Carlos.

INDICE	página
Resumen-----	6
Introducción-----	6
Veneno de abeja-----	7
Melitina-----	8
Distribución espacial-----	9
Melitina y membrana-----	10
Síntomas-----	12
Antecedentes-----	13
Anticuerpos-----	13
Principios metodológicos (marco teórico)	
Despliegue en fagos-----	14
Biología de fagos filamentosos-----	15
Principios básicos-----	17
Despliegue de anticuerpos-----	18
Formato de anticuerpos desplegados-----	19
Librerías de anticuerpos-----	20
Librería inmune-----	20
Librerías nativas (no-inmunizadas)-----	20
Librerías sintéticas-----	21
Selección de fago-anticuerpos a partir de una librería-----	21
Una librería de fagos amplificada-----	23
Exposición al antígeno-----	23
Lavado y regeneración-----	23
Reinfección y amplificación-----	24
Análisis de poblaciones-----	24
Interacciones-----	24
Interacciones antígeno anticuerpo-----	24
Fundamentos BIAcore	
Biosensores-----	25
BIAcore X. Componentes-----	25
Funcionamiento-----	26
Resonancia de plasmones superficiales-----	27
Interpretación de datos-----	29
Caracterización interacción antígeno-anticuerpo-----	30
Hipótesis-----	31
Objetivo general-----	31
Objetivos particulares-----	31
Metodología-----	31
Protocolos	
Banco de fago anticuerpos humano-----	31
Selección de fago-anticuerpos-----	34
Amplificación de fago-anticuerpos seleccionados-----	36
Cinéticas-----	37
Equipo-----	38
Soluciones-----	38

Resultados	
Amplificación fago-anticuerpos humanos-----	39
Selección fago-anticuerpos-----	40
Amplificación de fago-anticuerpos seleccionados-----	44
Cinéticas	
Cinéticas melitina-----	44
Cinéticas péptido hidrofóbico-----	49
Discusión-----	55
Conclusiones-----	58
Perspectivas-----	59
Referencias-----	60
Índice de imágenes-----	64
Acrónimos-----	65

## RESUMEN

El constante consumo de productos derivados de la industria apícola, así como la introducción de abejas africanizadas, que producen una mayor cantidad de miel; ha ocasiona el invariable contacto de personas con estas y por ende se ha dado un incremento en el número de ataque de abejas, a seres humanos que en muchos casos ocasiona la muerte de estos últimos.

Desafortunadamente, aun no se ha encontrado una solución al problema derivado del envenenamiento causado por un ataque masivo de abejas.

Una nueva metodología para la generación y expresión de macromoléculas tales como: proteínas, péptidos y anticuerpos entre otros, que ha venido desarrollándose en los últimos años es conocida como despliegue en fagos (*phage display*). En esta metodología, se utilizan librerías de proteínas, que son desplegadas en la superficie de fagos con gran número de variantes. Una de las finalidades de obtener una librería, de fagos, es seleccionar el mayor número de variantes posibles y así poder elegir dentro de ese universo, alguna que tenga características que nos sean útiles, para realizar funciones previamente definidas.

El fenómeno de resonancia de plasmones superficiales es una herramienta que ha sido implementada para la medición de interacciones entre moléculas. BIAcore, es un equipo reciente, cuyo funcionamiento esta basado en este fenómeno y con ayuda de éste es posible interpretar interacciones de biomoléculas en un sistema de flujo continuo muy similar a las condiciones *in vivo*.

La constante búsqueda de una respuesta a la problemática, causada por la picadura de abejas, obliga a los investigadores a mejorar las técnicas de selección y mejoramiento de anticuerpos, que nos ayuden a conseguir una solución que beneficie a la población afectada. Esto redundo en una disminución de los riesgos del trabajo propio de la industria apícola.

## INTRODUCCIÓN

Los insectos constituyen el grupo más grande e importante dentro del reino animal, por su gran diversidad, con más de un millón de especies descritas. Dentro del orden *himenóptera* se han descrito cerca de 250,000 especies, equivalente a una cuarta parte del total de especies de insectos encontrados a nivel mundial.

Dentro de los *himenópteros*, un grupo de gran importancia biológica, por la complejidad de su comportamiento y organización social, son las abejas, además de la importante relación que establecen con el hombre. Es probablemente el grupo de insectos que le aporta mayores beneficios, pues son importantes polinizadores de plantas, de gran valor económico, que se deriva de la explotación apícola; sin embargo, desde el punto de vista medico, es el grupo de animales venenosos de mayor importancia a escala mundial por la alta mortalidad que originan sus picaduras, en comparación con otro grupo de animales ponzoñosos<sup>1</sup>. La presencia de abejas en torno al hombre incrementa la posibilidad de que el encuentro entre éstos culmine en serios problemas médicos.

La presencia de estructuras y adaptaciones morfofisiológicas, así como la producción de sustancias que les permiten proveerse de alimentos y defenderse, son las constantes filogenéticas frecuentes en la evolución de las especies. La finalidad de las sustancias producidas por especies predadoras es

el iniciar un proceso extrínseco de digestión de las presas capturadas, lo que explica la acción neurotóxica y la histotoxicidad características de algunos venenos animales, propiedades que pueden darse en forma independiente o combinada; también les permite responder con ciertas ventajas al ataque de enemigos y así mantenerse vivos en la cadena biológica, como es el caso de las abejas<sup>1</sup>.

La frecuencia de los ataques masivos de abejas se ha incrementado dramáticamente en el continente americano debido de la introducción y la proliferación de las abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*), por su alta explotación, debido a que tiene una mayor producción de miel<sup>2</sup>.

La introducción accidental de abejas africanas (*Apis mellifera scutellata*) nativas dentro de Brasil, en 1957, y su subsecuente desplazamiento e hibridación con las ya establecidas abejas europeas (*A. m. mellifera* y *A. m. lingustica*) dio como resultado abejas africanizadas o “asesinas” altamente agresivas, que se adaptan a los climas templados y cálidos mejor que las europeas, dando así un amplio rango de distribución en toda América. Se postula que desde 1992 las abejas africanizadas cruzaron la frontera sur de los Estados Unidos<sup>3</sup>.

La alta frecuencia de ataques de abejas africanizadas reside en su agresividad debido a que: mantienen una mayor protección de la colmena, poseen menor umbral de irritabilidad, dispersan más feromonas de alarma aumentando la probabilidad de ataques múltiples, permanecen excitadas por más tiempo (hasta 24 horas), después de la perturbación y realizan una persecución más persistente (hasta 200 metros) del sitio de ataque inicial<sup>2</sup>.

Desde 1985 se ha estimado que en el continente americano se han causado entre 700 y 1000 muertes. Sólo en México se dieron 190 muertes entre 1988 y 1993, y se estima que pudiera aumentar a 60 muertes por año<sup>4</sup>. Se notificaron alrededor de 17,478 picaduras en 1998<sup>2</sup>.

En México se observó una relación importante ( $r^2 > 0.5$ ) entre la cantidad de sujetos picados entre enero y junio de 2001 ( $n=300$ ) y la cantidad de enjambres de cada delegación (1365 colmenas totales) dando un promedio de 0.22 individuos picados por colmena, ratificando que producen una gran cantidad de accidentes en humanos<sup>2</sup>.

Además, hay que considerar que hay numerosas colonias silvestres de abejas, originadas de fugas de apiarios, que pueden tener entre 20,000 a 60,000 individuos.



Su estructura terciaria asume una conformación extendida de alfa hélice que es interrumpida en la posición 10 a 12. Esto da como resultando dos ejes de hélices arreglados en una conformación que coloca a los residuos hidrofóbicos consecutivos dentro de la superficie de una pequeña cavidad<sup>7</sup>.

La columna vertebral de cada cadena de melitina mantiene una inclinación con un ángulo de 120°. Cada molécula de melitina muestra dos cadenas de estructura alfa hélice la primera formada por los residuos 1 a 10, la cual está conectada, a través de los residuos 11 y 12, con los residuos 13 al 26, que forman la segunda<sup>6</sup>.

Los 20 residuos del lado amino terminal están arreglados asimétricamente alrededor de la estructura de acuerdo a su polaridad. Diez residuos hidrofóbicos de cada cadena se ubican en la primera parte de la estructura, con una relación de solo cuatro residuos hidrofílicos, mientras que en la segunda sección se ubican cuatro hidrofóbicos. El carboxilo terminal, abarca seis residuos en la cadena, que son enteramente hidrofílicos.

La melitina esta caracterizada por seis cargas positivas cuatro acumuladas en la secuencia Lys21, Arg 22, Lys 23, Arg24 (Fig.1).

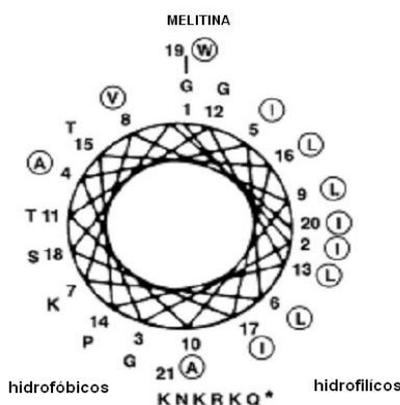


Fig.1 Se muestra la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos dentro de la melitina. El asterisco marca la secuencia del carboxilo terminal

### Distribución espacial

Aunque el lado de la cadena que abarca los residuos 1 al 6 son todos hidrofóbicos, un lado de la hélice es más apolar que el otro dentro de la misma región. La razón de esto es porque la cadena que comprende los residuos Ile-2, Val-5 y Leu-6 se encuentran todos posicionados hacia el lado interno o el lado alto del doblez, mientras la cara opuesta de la hélice tiene sólo una pequeña Ala-4. Existe una segregación espacial de cadenas laterales apolares y polares en los residuos 7-20. Los residuos mas apolares Val-8, Leu-9, Leu-13, Leu-16, Ile-17, Trp-19 y Ile-20 están todas en la superficie interna; los residuos hidrofílicos, Lys-7, Thr-10, Thr-11 y Ser-18 están todos en la superficie exterior de la molécula.

Análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido, muestran que el efecto del residuo Pro-14 en las regiones de las alfa hélices de la proteína es la causa de la distorsión de la geometría estándar. Esto es por la inherente rigidez de la prolina y la disrupción de la formación de puentes de hidrogeno<sup>8</sup>.

La Pro-14 contribuye de diferentes maneras a la formación del doblez en la estructura aunque, en realidad, forma parte de la segunda región de la

cadena de alfa hélice. Debido a que la Pro-14 no forma enlaces de hidrógeno con la Thr-10, por ende, la hélice-alfa es desestabilizada entre los residuos 10 y 14 <sup>5</sup>(Fig.1).

La cadena de la melitina puede ser dividida en tres regiones, basado en la distribución de las cadenas polares y apolares: 1) La región hidrofóbica amino terminal, 2) sección central con caras hidrofóbicas e hidrofílicas y 3) la región completamente hidrofílica en el carboxilo terminal (Fig.2).

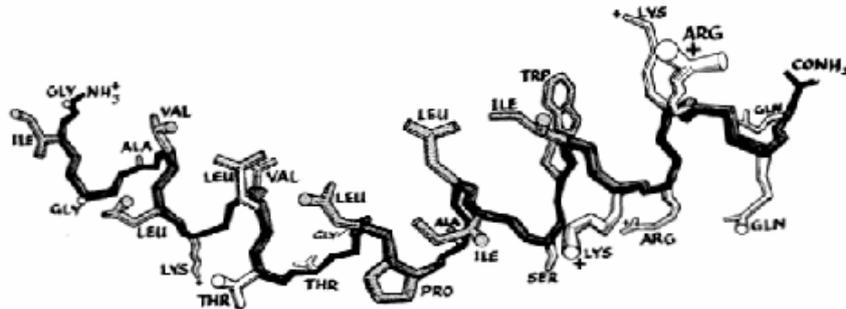


Fig.2 Melitina. Se muestran los residuos de aminoácido dentro de la cadena. La primera región (residuos 1 al 13), representa la parte hidrofóbica, dividida por la mitad por una prolina (residuo 14). Dentro de la segunda región se muestra la región hidrofílica (residuos 20 a 26).

La melitina es soluble en agua pero existe en dos estados en solución, difieren en estructura secundaria y cuaternaria. En una baja fuerza iónica y baja concentración se comporta como un monómero<sup>9</sup> y se presenta como tetrámero en una solución de alta fuerza iónica<sup>10</sup>.

Debido a su carácter anfifílico, la melitina en solución, puede asociarse para formar tetrámeros y pueden unirse a la superficie de los fosfolípidos de la membrana en la célula<sup>6</sup>.

La repulsión electrostática entre las cargas positivas y las interacciones hidrofóbicas, dentro de una solución, determinan la conformación del péptido en un equilibrio monómero-tetrámero.

Los balances entre las adhesiones hidrofóbicas del monómero y la repulsión electrostática de las cargas positivas en las moléculas de melitina ocasiona que ésta se encuentre como tetrámero en concentraciones altas y medios predominantemente ácidos dentro de las glándulas de secreción del veneno de la abeja. Resultados obtenidos mediante fluorescencia<sup>52</sup> y RMN<sup>53</sup> indican que la melitina se encuentra en forma monomérica a bajas concentraciones. Estas condiciones de una baja fuerza iónica favorecen la lisis celular dentro de un organismo vivo.

### Melitina y membrana

La melitina posee acción citolítica y necrotizante sobre diferentes tipos celulares, ocasionando la hemólisis de leucocitos. Activa la fosfolipasa C y también puede activar la fosfolipasa 2 tisular, que a su vez puede activar a la fosfolipasa D. Estas actividades combinadas producen diacilglicerol y ácidos grasos libres que pueden alterar las funciones de los canales de Na<sup>+</sup>. Se le identificó inicialmente como "factor hemolítico directo"<sup>2</sup>. Su capacidad de hidrolizar membranas celulares se debe a que puede comportarse como un

detergente, es decir, la melitina se une a la membrana plasmática desorganizando los lípidos y proteínas; esta actividad aumenta, de forma sinérgica cuando actúa conjuntamente con la fosfolipasa A<sub>2</sub> del veneno. Los cambios en la membrana aumentan su permeabilidad induciendo profundos cambios de composición iónica y muerte de la célula afectada. Adicionalmente, en los tejidos aumentaría la actividad de factores de necrosis tumorales alfa y de ciclooxigenasas-2 lo que aumentaría los procesos inflamatorios<sup>2</sup>.

Durante la lisis celular las cargas positivas en la melitina interactúan con los grupos fosfatos de los lípidos. La fuerte unión de la melitina a la membrana, afecta la estructura de los mismos<sup>6</sup>.

Estudios basados en RMN indican que la melitina es un monómero en la bicapa fosfolípida, y la porción hidrofóbica de la hélice está en contacto con los fosfolípidos de la bicapa, mientras que la porción hidrofílica está accesible en el medio acuoso<sup>11, 12</sup>.

Mediante pruebas de lisis en liposomas<sup>13</sup>, reduciendo el número de residuos de aminoácidos en diferentes moléculas de melitina, se observó que el tamaño de la hélice anfipática es un factor importante para la lisis, así como que la región hidrofóbica es la que está realmente implicada en la unión y determinando por tanto la actividad lítica<sup>13</sup>.

Estudios, mediante microscopia electronica<sup>14</sup>, indican que la melitina tiene notoria afinidad por la interfase agua-lípido. Este hecho se observa claramente como la melitina se encuentra en el medio acuoso y llega a la penetración en la bicapa de lípidos. Se ha visto que la melitina ocasiona la fragmentación de la membrana<sup>11,12,14</sup>. Se sugiere que la actividad de la melitina en la superficie de la membrana y la conveniente asociación apolar entre su porción hidrofóbica y las cadenas de acilo de los fosfolípidos es la causa del rompimiento de la membrana<sup>14</sup>.

Existen dos principales teorías de cómo la melitina puede provocar la lisis celular. Una de estas teorías propone que forma canales iónicos en la bicapa de la membrana por la tetramerización de los monómeros (Fig.3a)<sup>11, 15</sup>. La segunda propuesta es que forma una cuña parcial para penetrar la membrana e incrementar la permeabilidad y la desorganización de los lípidos<sup>13</sup> (Fig.3b).

El modelo de la formación de canales iónicos por la melitina en la membrana, involucra cuatro moléculas con caras hidrofílicas hacia dentro del poro<sup>11, 15</sup>.

a)



b)

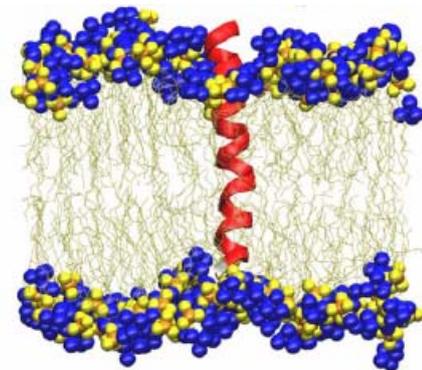


Fig.3 Modelos de lisis en células por la melitina. a) representación grafica de la formación de poros por tetramerización. b) modelo de lisis por la desorganización de los lípidos en la membrana por la melitina.

Mediante estudios con liposomas expuestos a melitina y con ayuda de microscopia electrónica<sup>14</sup>, así como por medio de dicroísmo circular orientado (OCD, por sus siglas en inglés)<sup>15</sup> y RMN<sup>53</sup>, se encontró que la melitina puede romper liposomas por medio de al menos cuatro mecanismos:

- a) Superando las fuerzas de adhesión polar entre los fosfolípidos, mediante la formación, de una interfase agua-aire, bajando dramáticamente la tensión superficial en la membrana dándose la penetración y finalmente formando poros.
- b) Rompiendo las fuerzas de cohesión apolar (hidrofóbico) entre las cadenas acil, mediante la integración de la región hidrofóbica de cada molécula dentro de la membrana, y provocando el desorden de los fosfolípidos.
- c) Rompiendo las fuerzas de cohesión impuestas por el agua del medio en las regiones de las cargas cercanas a los grupos de las cabezas de los fosfolípidos.
- d) Actuando de manera clásica como detergente formando micelas de los fosfolípidos de la melitina, en la cual cada cadena individual de las cadenas acil de cada liposoma puede asociarse con la porción hidrofóbica de la melitina<sup>14, 15</sup>.

El último mecanismo puede ser consecuencia, en caso extremo del segundo.

Las fuerzas de cohesión pueden presentar una estructura escalonada de los grupos en las cabezas polares de la membrana<sup>14</sup>.

La melitina combina una superficie altamente catiónica, (carboxilo terminal), con una hélice corta hidrofóbica (amino terminal), de 11 residuos, favoreciendo su partición dentro de los lípidos de la bicapa en la región de la interfase. Se ha sugerido que dicha configuración incrementa la curvatura de la bicapa provocando la ruptura de ésta. Los estudios, por RMN, demuestran que la melitina se encuentra inmersa en la bicapa<sup>7, 53</sup>.

La formación de un poro por la melitina, en forma de tetrámero, incrementa la permeabilidad de la membrana. Los poros formados muestran selectividad de aniones sobre cationes, probablemente por la acumulación de cargas positivas en el carboxilo terminal del péptido. El incremento en la permeabilidad de iones en presencia de melitina provee una explicación plausible de la actividad hemolítica<sup>7</sup>. La formación de poros se da mediante uniones micelares<sup>53</sup> y más recientemente se ha encontrado que se da por medio de la formación de un poro toroidal. Este modelo apoyado por estudios de dispersión de neutrones (*neutron scattering*) y dicroísmo circular orientado (OCD, por sus siglas en inglés)<sup>15</sup> se basa en la formación de un poro espontáneo transmembranal, debido al acomodo del tetrámero de forma perpendicular a la membrana.

La unión del monómero con la membrana siempre se da de forma paralela a la misma, a diferencia de la forma tetramérica que se da de manera perpendicular. Esto sugiere que en condiciones de baja fuerza iónica y baja concentración se comporta como un monómero<sup>9</sup>, mientras que en condiciones

de alta fuerza iónica<sup>10</sup> se comporta como tetrámero; ambos casos (unión, perpendicular o paralela, a la membrana), la melitina causa lisis celular.

La melitina es muy termoestable (solo a 100 °C y por 1h se abate su acción lítica<sup>1</sup>), lo cual favorece su actividad hemolítica. Esto explica también porque es difícil de degradar.

## **Síntomas**

Debido a que la melitina es considerada como el componente más letal dentro del veneno, se le ha atribuido una alta toxicidad general y local. Se ha demostrado en pacientes que sufrieron ataques masivos de abeja y corroborados por estudios en diferentes tejidos musculares de rana<sup>57</sup> que la melitina afecta las sinapsis neuromusculares y ganglionares, produce parálisis respiratoria y hemólisis. Es responsable del dolor y la inflamación, así como de la inhibición de la colinesterasa en el plasma. También participa en la coagulación del fibrinógeno, incrementa la permeabilidad capilar, contrae la musculatura lisa y libera histaminas.

La picadura produce dolor local e inflamación, causa hemólisis y hace permeable la membrana de los capilares de la piel. Su acción vasodepresora periférica, produce hipotensión al principio, pero si persiste o se incrementa la concentración de melitina en el cuerpo, se invierte esta acción y se torna en hipertensiva, llegando a producir parálisis respiratoria y muerte<sup>16</sup>.

Tiene también acción paralizante sobre las terminaciones nerviosas motoras, liberando potasio en el tejido muscular.

La fosfolipasa A<sub>2</sub> (lecitinasa A) transforma los ácidos grasos no saturados de lecitina en lisolecitina. Evita la coagulación de la sangre e induce la liberación de prostaglandinas. Produce hemólisis indirecta, inhibe el transporte de electrones, afecta la fosforilación oxidativa.

Los síntomas, debido a la picadura de abeja pueden variar en cada individuo, depende de la localización y del número de picaduras, así como de la sensibilidad de la victima a los componentes del veneno.

## ANTECEDENTES

El ataque de abejas es un problema que involucra la industria apícola, así como poblaciones que están en contacto con colonias silvestres, a nivel mundial. La generación de un antiveneno que pueda prevenir la muerte por picaduras de abejas, es una de las principales metas para la investigación en este ramo, ya que aún no se encuentra una terapia específica.

Se ha observado que al remover la parte hidrofóbica del amino terminal se reduce la actividad lítica de la melitina. Cuando el segmento catiónico de 6 aminoácidos es removido, el péptido no causa lisis, aunque se une a las membranas celulares<sup>13</sup>.

## Anticuerpos

Taylor y colaboradores en su trabajo<sup>17</sup> extrajeron del suero de ratones, inmunizados con melitina, IgGs e IgEs. Más del 80% de estos, son específicos para melitina y se encuentran unidos a la parte hidrofílica del carboxilo terminal de la melitina. Taylor y colaboradores obtuvieron, tres anticuerpos monoclonales específicos de melitina. Dos de ellos son isótipos de IgG y uno de isótipo IgE. Uno de los anticuerpos monoclonales del isótipo IgG se une al sitio carboxilo terminal de la melitina, mientras que los otros dos no; pero estudios de competitividad indican que los anticuerpos se unen a este lugar o lugares muy cercanos a este. Estas observaciones, aunado a que se sabe de las propiedades anfífilas de la melitina, sugieren que la inmunogenicidad de este péptido es a consecuencia de que se une a la superficie de fosfolípidos de la célula, por la parte hidrofóbica<sup>17</sup>. Es por esto que los anticuerpos no son capaces de neutralizar al péptido ya que no son capaces de reconocer el sitio hidrofóbico.

Debido a que la fosfolipasa A<sub>2</sub> es el componente denominado alergénico dentro del veneno de abeja la mayoría de personas sensibles al veneno de abeja presenta anticuerpos IgE e IgG que reconocen a la fosfolipasa (se presentan en 3 de cada 5 personas), mientras que sólo un tercio de estas personas presentan isótipos IgG que reconocen a la melitina<sup>1</sup>.

Además, este modelo proporciona una explicación a la inmunogenicidad de este péptido; a saber, la unión a los fosfolípidos de la membrana de la célula provoca cambios en la melitina ya que siendo un antígeno soluble, se torna en un antígeno celular multivalente con su fragmento hidrofílico carboxilo terminal como un grupo hapteno. Esta propiedad, así como la tendencia de la melitina a formar tetrámeros, no permitiendo la unión de anticuerpos a cada molécula incrementa la inmunogenicidad de la melitina, incrementando la vida media en el torrente circulatorio del hospedero<sup>17, 18</sup>.

Jones y colaboradores<sup>19</sup> produjeron fragmentos Fab de anticuerpos de oveja previamente inmunizada, la cual presentó un gran número de anticuerpos IgG específicos contra melitina, pero reconociendo la parte hidrofílica de ésta o regiones aledañas<sup>19</sup>.

## PRINCIPIOS METODOLÓGICOS (MARCO TEORICO)

### Despliegue en fagos

La técnica de despliegue en fagos o *phage display* en inglés, comenzó a desarrollarse hace alrededor de 20 años, cuando se demostró su viabilidad como herramienta dentro de la investigación molecular y los muchos beneficios a nivel biomédico que ofrece.

Se puede definir el despliegue en fagos (*phage display*) como la técnica, molecular, en la cual proteínas exógenas son expresadas en la superficie de los fagos. De tal forma que los fagos, además, de convertirse en el vehículo que lleva la información para la expresión de proteínas, tiene la capacidad de replicarse<sup>20</sup>. Descrito de una manera más simple el despliegue en fagos es la expresión de proteínas, péptidos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en la superficie de fagos<sup>20, 21</sup>. Esto se logra por la incorporación de la secuencia de nucleótidos que codifica para alguna proteína en el genoma del fago fusionado al gen que codifica para una proteína de la cubierta viral. Esta fusión asegura el ensamblaje con el fago y así la proteína foránea sea desplegada en la superficie del fago maduro. Este acoplamiento entre fenotipo y genotipo de la proteína expresada y la capacidad de replicación del fago son los elementos que sostienen la tecnología del despliegue en fagos. Con esta técnica se pueden tener una gran cantidad de variantes de secuencias de nucleótidos, que codifiquen para proteínas deseadas, llegando a producir una diversidad de millones o cientos de millones (alrededor de  $10^9$ ), dentro de una población de fagos, que pueden ser seleccionadas y obtener moléculas con las características deseadas (Fig. 4).

El despliegue en fagos es una herramienta muy poderosa para la selección de péptidos, proteínas y anticuerpos que tienen propiedades específicas de unión dentro de un gran número de variantes. Se utiliza principalmente en pruebas moleculares contra blancos específicos, así como para, el análisis y manipulación de las interacciones proteína-ligando entre otras aplicaciones.

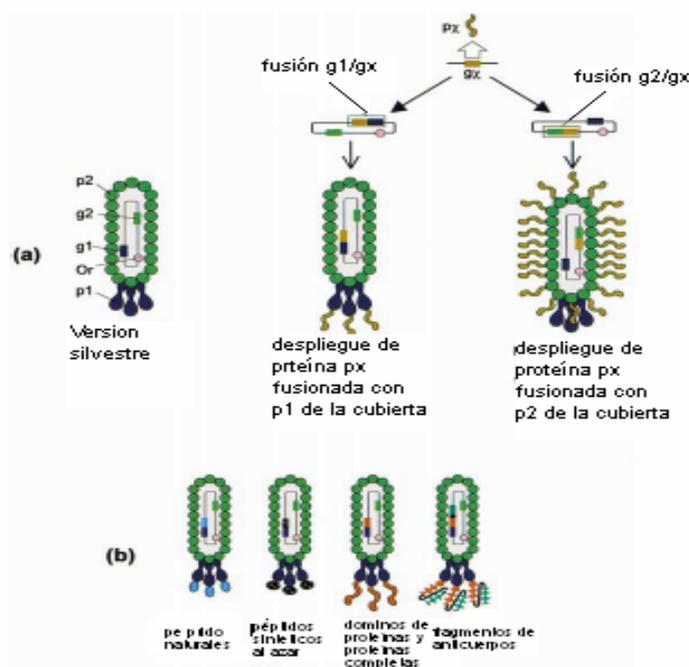


FIG. 4 Técnica de despliegue en fagos. a) Fago simple que muestra un origen de replicación (Or) y genes (*g1* y *g2*) que codifican para dos tipos de proteínas de la cubierta p1 y p2 respectivamente. Una proteína exógena *px* codificada por el gen *gx* puede ser desplegada en la superficie por la fusión de *gx* con algún gen de proteína de la cubierta. b) éste principio es aplicado para la expresión de péptidos naturales o al azar, dominios de proteínas o toda la proteína, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. c) una librería de variantes nucleotídicas, puede convertirse en una librería de variantes de péptidos, proteínas o anticuerpos desplegados. Esta librería puede ser sometida a selección para aislar péptidos, proteínas o anticuerpos con propiedades específicas.

### **Biología de fagos filamentosos**

Por mucho los fagos más populares para el despliegue son los fagos filamentosos no líticos. Tiene una cadena sencilla de ADN cerrada covalentemente, contenida dentro de un cilindro de aproximadamente 7 nm de ancho por 900 a 2000 nm de largo. Los fagos mejor caracterizados son el M13, fl y fd, los cuales infectan a *E. coli* por medio del plásmido F'. La infección comienza cuando el fago tiene una interacción específica entre la parte final del fago con la punta del pilus F' de la bacteria. El pilus F' es muy importante y requerido para la transferencia, del plásmido F dentro de la bacteria hospedera, solo se expresa a 37 °C<sup>21</sup>. Dentro, el genoma es replicado involucrando tanto las proteínas derivadas del fago como las de la célula hospedera, y posteriormente empaquetadas por la célula infectada en una partícula en forma alargada, la cual es liberada al medio. Todas las proteínas del virión pueden ser transportadas al periplasma de la célula propiciando su ensamblaje y la posterior extrusión de los viriones<sup>22</sup>.

El fago M13 de la familia de fagos Ff, son excelentes vehículos de clonación, porque su tamaño no es dependiente del ADN contenido dentro de él. La inserción de secuencias externas dentro de su genoma permite su fácil exposición en la superficie del fago gracias a su tamaño. Por otra parte el mecanismo de propagación no lítica, requiere que todos los componentes de la cubierta sean exportados a través de la bacteria dentro de la membrana para el ensamblaje de un fago maduro. En consecuencia, solo las proteínas que son capaces de adecuarse a esta exportación pueden ser desplegadas<sup>20</sup> (Fig. 5).

a)

b)

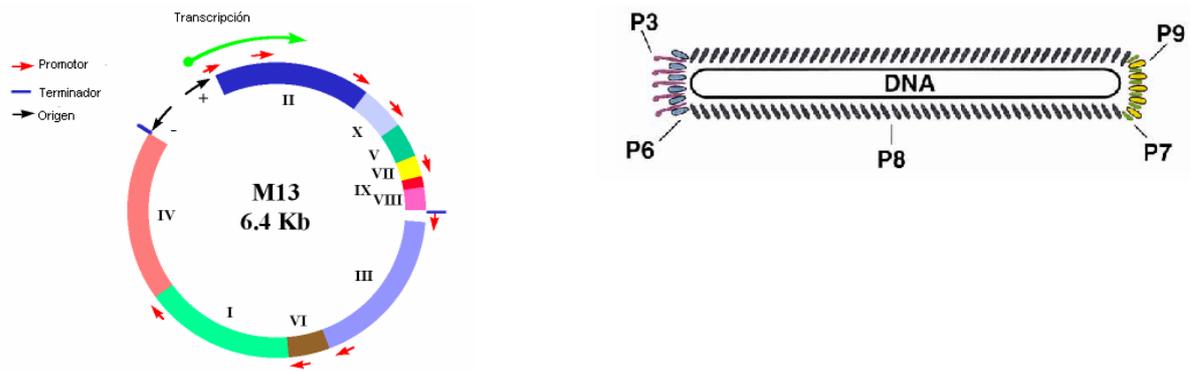


Fig.5 Fago M13 de la familia de fagos filamentosos Ff. a) Plásmido F del fago M13, contiene origen de replicación, de transcripción así como la información para la expresión de las proteínas de la cubierta pIII y pVIII. b) Proteínas de la cubierta utilizadas para despliegue en fagos, generalmente son utilizadas, pIII y pVIII.

Se producen alrededor de 1000 fagos en la primera generación, estos continúan la reinfección y cada hospedero produce alrededor de entre 100 a 200 fagos por generación llegando a formar un total de aproximadamente  $10^8$  a  $10^{13}$  partículas infecciosa por mililitro, después de una ronda de amplificación<sup>21</sup>.

Cada fago tiene una cubierta formada de 5 diferentes tipos de proteínas, las cuales pueden ser usadas para el despliegue de proteínas externas<sup>22,23</sup>.

Cada proteína de la cubierta tiene su merito relativo, para ser tomada en cuenta para la fusión con respecto a la densidad de proteínas que se quieran desplegar en cada fago, el efecto del número de proteínas expresadas se refleja en la viabilidad y la estabilidad de la fusión de cada proteína<sup>23</sup>. Las proteínas de la cubierta mas usada para despliegue en fagos son la pVIII y pIII.

En términos generales un gran número de proteínas pequeñas pueden ser mejor desplegadas en la pVIII, mientras que pIII es mas útil para un menor número de proteínas con un tamaño mas grande<sup>20</sup> (Fig.6).

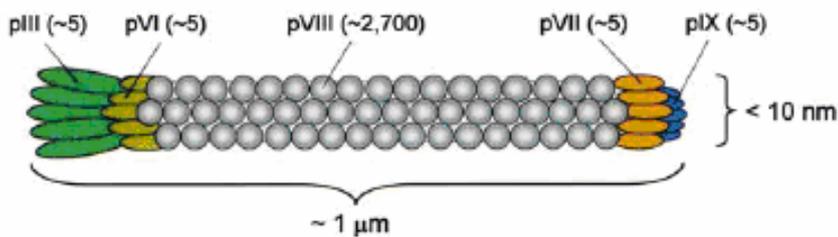
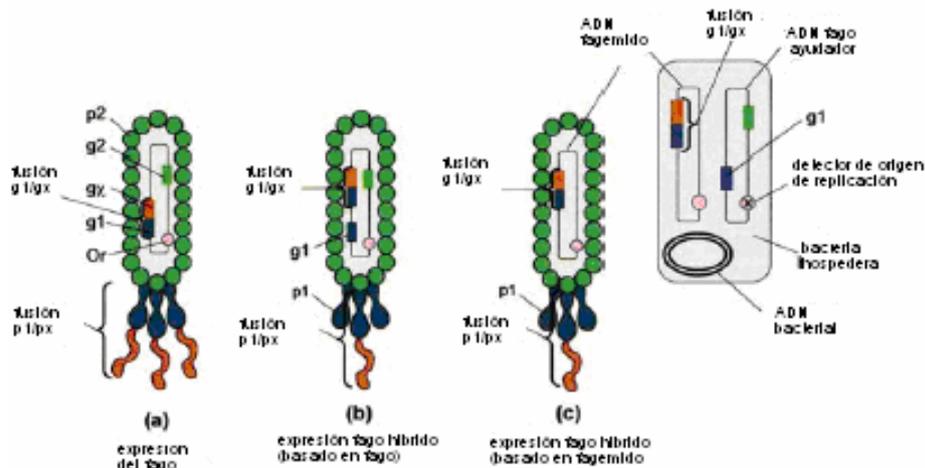


FIGURA 6. Formatos de despliegue en fagos. Estrategias para la expresión de proteínas en la superficie de un fago. a) El formato simple para la expresión de un péptido o proteína fusionada con un gen ( $g\chi$ ) que codifica para una proteína externa ( $p\chi$ ) con un gen de la proteína de la cubierta. Esta estrategia produce fagos en los cuales todas las copias de la proteína de la cubierta elegida esta fusionadas con una proteína. ( $p1/p\chi$ ). b) El fago híbrido puede ser creado por la incorporación de la fusión de genes ( $g1/g\chi$ ) como un elemento adicional en el genoma del fago. Con este arreglo, dos versiones de la proteína de la cubierta elegida como la pareja de fusión están codificadas una por el gen nativo ( $p1$ ) y otra por el gen fusionado ( $p1/p\chi$ ). Como el fago es ensamblado ambas  $p1$  y  $p1/p\chi$  son incorporadas dentro de la cubierta del fago. c) Sistema basado en fagemido es también ampliamente usado en la construcción de fagos híbridos. Sin embargo, el lugar de estar presente en solo genoma, el gen codifica para proteína, silvestre (*wild type*) de la cubierta y proteínas fusionadas son llevadas por el fago ayudador (*helper*) y fagemido respectivamente. La bacteria hospedera contiene ambos ADNs, del fagemido y del ayudador y ambos genomas contribuyen a la síntesis del fago híbrido. d) El bacteriófago M13 es ampliamente utilizado como vehiculo para despliegue en fagos. La proteína de membrana pIII puede ser utilizada como pareja de fusión para un número limitado de proteínas (un máximo de 5) mientras miles de proteínas pueden ser expresadas en la superficie si es usada pVIII. Se indica el número aproximado de copias en M13.

### Principio básicos

Los dos elementos claves para el despliegue en fagos son: una librería de secuencias de nucleótidos que codifiquen para sus correspondientes péptidos, proteínas o anticuerpos, entre otros (p.e. fragmentos de genes, oligonucleotidos al azar, población de cADN o el gen de un anticuerpo) y el vehiculo, fago, donde las secuencias serán expresadas. La forma mas sencilla para guardar y expresar una proteína externa es la fusión entre la secuencia

nucleotídica de la proteína que se quiere expresar y el gen que codifica para una proteína de la cubierta, del fago, dentro del genoma viral<sup>20</sup>. Utilizando este método la proteína, que se fusiona, se expresara cuando se exprese la proteína de la cubierta, esto nos da una ventaja en cuanto al número de copias de proteínas expresadas, pero si la funcionalidad de la proteína de la cubierta, elegida, esta comprometida por la fusión, la viabilidad del fago se vera afectada, especialmente las versiones de la proteína silvestre (*wild type*) de la cubierta que son retenidas. Esto se evita, si fagos híbridos son producidos en los cuales se encuentran copias silvestres (*wild type*) y copias con la proteína fusionada. En algunos sistemas de fagos híbridos la fusión del gen de la proteína es elemento adicional en el genoma del fago, de modo que una copia del gen de la proteína silvestre es retenida y el fago expresa ambas<sup>23</sup> (Fig. 6).

Como alternativa de fagos híbridos se crearon sistemas basados en fagemidos, este ha sido adoptado fuertemente. Consiste en que las secuencias que codifican para una proteína fusionada son cargadas con el fagemido (plásmido con un origen de replicación y señal de empaquetamiento) mientras la mayoría de los genes requeridos para la formación del fagos son cargados por el fago ayudador (*helper*) que co-infectan una bacteria hospedera<sup>23</sup>.

El sistema de fagos híbridos tiene desventajas potenciales, ya que el número promedio de proteínas fusionadas que son desplegadas es reducido, debido a la competencia para la incorporación dentro del fago, entre el tipo silvestre (*wild type*) y las proteínas fusionadas de la cubierta<sup>24</sup>. Sin embargo la baja valencia puede ser de gran ayuda, como estrategia durante la selección (*bio-panning*).

El número de proteínas expresadas, depende de la proteína de la cubierta elegida para la fusión; si se elige el sistema de fagemido, depende del fago *helper*<sup>20</sup>.

### **Despliegue de anticuerpos**

Los anticuerpos fueron las primeras proteínas desplegadas satisfactoriamente en la superficie de fagos<sup>25</sup>. Este fue hecho mediante la fusión de la secuencia que codifica para la región variable del anticuerpo (V), es decir, codifica para un fragmento de cadena sencilla Fv (scFv), unido al amino terminal de la proteína pIII de la cubierta del fago. El anticuerpo fue desplegado usando el vector del fago y fusionándolo con el genIII. En este vector, el gen que codifica para el fragmento de anticuerpo scFv, fue clonado en el mismo marco con el genIII y la secuencia señal del genIII, en la dirección normal de transito de la proteína al periplasma. Así, los dominios VH y VL se pliegan correctamente, covalentemente por un péptido conector para formar un scFv funcional. Inicialmente, el vector del fagos tiene la información genética requerida para completar el ciclo del fago<sup>26</sup>.

Debido a que el fagemido contiene la información para el genII, el scFv puede ser fusionado con el amino terminal del genIII maduro o en el amino terminal truncada de la pIII carente de los dos primeros dominios amino terminal<sup>22</sup>.

El ADN del fagemido que codifica para la fusión entre el anticuerpo y pIII, es preferentemente empacado dentro del fago mediante el fago ayudador (*helper*), el más usado es el M13, que proporciona a todas las proteínas estructurales<sup>22</sup>.

El despliegue de anticuerpos en fagos no sólo amplía nuestra capacidad de generar nuevas variantes de anticuerpos sino de encontrar variantes con aplicaciones médicas, de investigación, entre otras. Una de las mayores ventajas de la producción de anticuerpos, por medio de despliegue en fagos, es que todo el proceso se lleva a cabo *in vitro*.

La cantidad de anticuerpos desplegados en fagos, que se necesitan para un antígeno es mucho menor a la típica requerida para producción de anticuerpos por hibridoma (microgramos comparados con miligramos) y el tiempo requerido para generar anticuerpos recombinante es reducido (unas semanas comparadas con varios meses). Además de ser relativamente simple, no necesita requerimientos especiales, además de ser barata.

Ambas, el hibridoma convencional y el despliegue en fago de anticuerpos, genera una vasta diversidad en el repertorio de anticuerpos<sup>20</sup>.

Con el despliegue en fagos de anticuerpos se pueden sintetizar y seleccionar anticuerpos que tengan la afinidad y especificidad deseada para estudios *in vivo* o *in vitro*, así como para inmunoterapia y enfermedades humanas<sup>22</sup>.

El despliegue en fagos es una técnica muy poderosa para desplegar librerías que contienen millones hasta cientos de millones de diferentes péptidos, proteínas o anticuerpos. Una de las aplicaciones más útil del despliegue en fagos es la purificación de anticuerpos monoclonales recombinantes usando librerías de fagos-anticuerpos<sup>24</sup>. De hecho, en los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas muy eficaces para la construcción de librerías de fragmentos de anticuerpos, así como ingeniosos métodos de selección han sido establecidos, que lleve a los anticuerpos con características deseadas<sup>22, 27</sup>.

### **Formato de anticuerpos desplegados**

Existen varios formatos de despliegue en fagos de anticuerpos como son scFv<sup>24,25,27</sup>, fragmentos Fab<sup>28</sup> y Fv's con ingeniería intermolecular mediante puentes disulfuro para estabilizar en par de cadenas pesadas y ligeras en la región variable ( $V_H$ - $V_L$ ) es decir dsFv 's o dianticuerpos<sup>29</sup>. El pequeño tamaño de los formatos scFv hace las librerías, genéticamente más estables, que las librerías basadas en formatos Fab. Sin embargo, muchos scFv's son intrínsecamente inestables o pueden formar moléculas de alto peso, incluyendo dímeros y trímeros, lo cual puede complicar la selección y caracterización<sup>24</sup>. Por otra parte, los fragmentos Fab, carecen de esta tendencia a formar dímeros, lo cual facilita, por ejemplo los ensayos de selección y mediciones de cinéticas de unión<sup>28</sup>.

La forma para desplegar fragmentos Fab en fagos, tanto la cadena pesada como ligera, es mediante la fusión por medio del carboxilo terminal a la pIII y la cadena asociada se expresa sin fusionar y es secretada al espacio periplasmático, en donde ambas cadenas se asocian para formar un fragmento Fab. Un método similar es usado para expresar dianticuerpos<sup>29</sup>. Tales dímeros biespecíficos de scFv's son desplegados en el fago por medio de la expresión desde un *cassette* que contiene la fusión de  $V_H$ - $V_L$ , uno de los cuales es fusionado con *gIII*.

### **Librerías de anticuerpos**

Para poder tener una aplicación, en el despliegue en fagos, selección y purificación de anticuerpos monoclonales es muy importante comenzar basándose en una librería de anticuerpos.

Las librerías de anticuerpos (fago-anticuerpos) se construyen a partir de una diversidad de secuencias, ya sea de un solo organismo sin ser inmunizado o con una inmunización previa para el antígeno deseado, desplegando cada una de las diferentes variables de secuencias de anticuerpos para obtener una gran diversidad de estos. Existen tres tipos de librerías de anticuerpos: la inmune, nativa y la sintética.

### **Librería inmune**

La diversidad se crea a partir de los genes de IgG de los linfocitos B de individuos inmunizados con el antígeno deseado. La diversidad de fago-anticuerpos se encuentra enriquecida con anticuerpos contra un antígeno específico, muchos de los cuales tienen una afinidad madurada por el sistema inmune<sup>30</sup>.

Este método permite tener una gran diversidad, a partir de una inmunización, además de tener un acceso fácil al material por medio de donadores y así poder tener una rápida manipulación y producción de estos. Una desventaja de esta librería es que la inmunización no siempre es posible debido a los principios éticos así como la tolerancia hacia el antígeno debido a su toxicidad.

### **Librerías nativas (no-inmune)**

La diversidad de anticuerpos primarios (no seleccionados) contiene un gran arreglo de IgM que reconocen una gran variedad de antígenos. Estos arreglos pueden ser clonados en repertorios nativos de rearrreglos de genes, mediante el rescate de genes-V utilizando mRNA de IgM de células-B de donadores no inmunizados, por medio del aislamiento de linfocitos del torrente sanguíneo<sup>31</sup> (Fig.7). Las librerías también pueden ser hechas desde una diversidad de librerías nativas mediante el mRNA de los genes-V de IgG y amplificados por medio de cADN usando una familia de oligonucleótidos. Así, las cadenas pesada y ligera pueden ser combinadas aleatoriamente y clonadas para formar librerías de fragmentos de anticuerpos scFv o Fab. Este proceso permite tener acceso hacia anticuerpos a los cuales no se ha encontrado antígeno, aunque la frecuencia de este tipo de anticuerpos depende completamente de la diversidad de linfocitos B<sup>32</sup>. Una librería nativa (no-inmune) siendo suficientemente grande y diversa, puede permitir aislar anticuerpos, dentro de un amplio rango de variantes, de reconocimiento específicos contra antígenos, no-inmunogénicos o contra antígenos relativamente tóxicos<sup>33</sup>.

La afinidad de los anticuerpos seleccionados de la librería nativa es proporcional al tamaño de la librería; los rangos van desde  $10^{6-7} M^{-1}$  para una librería pequeña, con  $3 \times 10^7$  clonas<sup>31</sup> a  $10^{8-10} M^{-1}$  para una librería grande, con  $3 \times 10^9$  clonas<sup>33</sup>. Otras librerías humanas de scFv llegan a  $6.7 \times 10^7$  clonas y librerías de Fab han llegado a  $4.1 \times 10^{10}$ <sup>22</sup>.

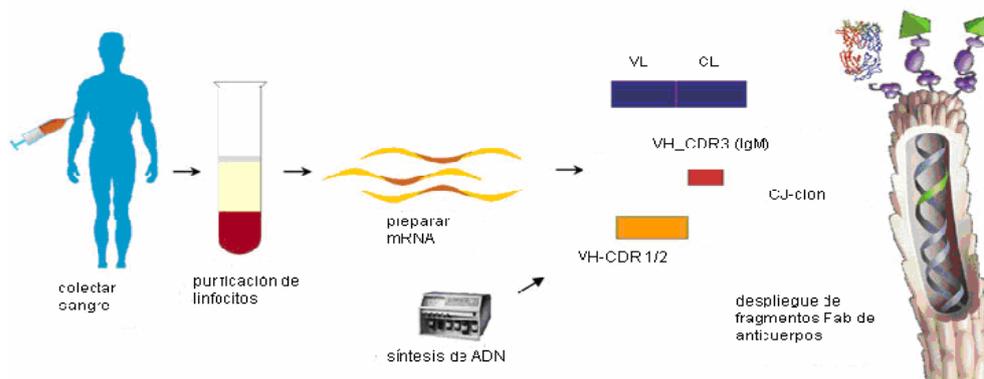


Fig.7 Metodología para librería de anticuerpos no inmunizados. Se construyen librerías de anticuerpos por medio de la obtención de sangre de donadores, la purificación de linfocitos, y combinaciones aleatorias cadenas pesadas y ligeras, previas amplificación mediante RT/PCR. Posteriormente clonados en fagos para la expresión y el despliegue.

### Librerías sintéticas

Este tipo de librerías se construyen artificialmente, por medio de un ensamblaje *in vitro* de segmento de genes-V y segmentos D/J. Los genes-V son ensamblados introduciendo, predeterminadamente, niveles aleatorios de las regiones CDR (por su siglas en ingles, Complementarity Determining Regions), dentro de la línea germinal de lo segmentos de los genes-V o rearrreglos de los genes-V<sup>22</sup>. Las regiones y el grado de variantes dependen de la diversidad natural de cada repertorio de anticuerpos.

La diversidad de estructuras y secuencias se encuentra generalmente en el asa en forma de rizo central del sitio de combinación con el antígeno, el CDR3 de la cadena pesada, mientras que los otros CDRs tienen variantes limitadas. Por lo tanto estos sitios son escogidos para poder introducir diversidad en librerías sintéticas<sup>22</sup>. Eventualmente muchos de los anticuerpos son perdidos durante la purificación, aun así se obtienen librerías estables de  $1.2 \times 10^9$  clonas<sup>34</sup>. Sin embargo, hay limitaciones físicas para el enriquecimiento de variantes, debido a la baja accesibilidad de la diversidad genética por razones técnicas.

Dentro de estas librerías sintéticas, después de una ronda de selección el repertorio se reduce a un máximo de  $10^5$  de una biblioteca inicial de  $10^{11}$  variantes<sup>34</sup>.

La pérdida de esta cantidad de anticuerpos ocasiona que el paso crucial sea la optimización de la calidad de despliegue de anticuerpos más aun que el proceso de selección<sup>22</sup>.

### Selección de fago-anticuerpos a partir de una librería

La selección de librerías de fagos (*bio-panning*), se hace en relación a la especificidad y afinidad, durante la cual la población de fagos es expuesta a un blanco que pueda ser reconocido por la molécula desplegada en el fago. A través de rondas sucesivas de pegado, lavado, elusión o regeneración y amplificación, se logra enriquecer una sola población que mantenga especificidad con el blanco de interés. Por ultimo se obtiene una población de fagos monoclonales con alta afinidad hacia el antígeno en cuestión.

Este proceso de manipulación de ADN para la creación de librerías, el empaquetamiento en fagos y la subsecuente selección (*bio-panning*) es el protocolo básico del despliegue en fagos y se acuño como “ciclo de despliegue en fagos” (*phage display cycle*)<sup>22</sup> (Fig.8). Este método tiene grandes ventajas; una de ellas es que se puede representar una gran diversidad de anticuerpos por ejemplo: una librería de anticuerpos (fago-anticuerpos) puede llegar a una diversidad de  $10^{10}$  variantes. Este método tiene gran flexibilidad, pueden hacerse selecciones *in vivo* o *in vitro*. La selección *in vitro* permite tener un amplio rango de blancos biológicos e inorgánicos gracias a la fácil manipulación de las condiciones de selección.

Gracias al despliegue en fagos se pueden tamizar cientos de millones de clonas en una semana<sup>35</sup>. Un aspecto más, a favor del despliegue en fagos es que se pueden obtener librerías apropiadas, la técnica es simple, barata, rápida y no requiere de un equipo especial<sup>22</sup>.

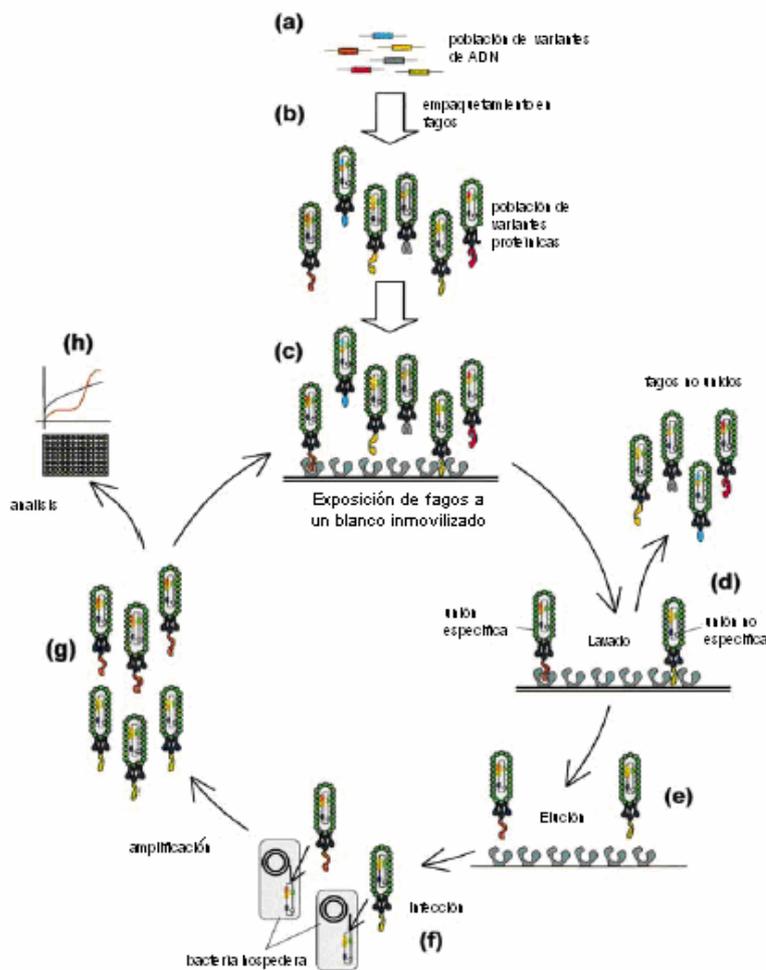


Fig. 8 Ciclo de despliegue en fagos. a) Una librería de variantes de secuencias de ADN que codifican para un péptido, proteína o anticuerpos son creadas. b) son clonadas dentro del genoma del fago o fagemido, fusionados con el gen de la proteína de la cubierta. c) la librería de fagos es expuesta a un blanco inmovilizado. d) los fagos no que no presentaron unión son lavados, puede ocurrir que se de pegado no específico. e) los fagos unidos son eluidos con condiciones que rompan la interacción entre la proteína desplegada y el blanco. f) los fagos eluidos infectan bacterias para ser amplificados. g) los fagos amplificados forman una segunda población de péptido, proteínas o anticuerpos específicos para el blanco, la selección (*bio-panning*) puede ser repetida para disminuir la población de variantes al mínimo. h) después de una selección una población de fagos son analizados.

Una vez que la librería ha sido construida o adquirida, la tarea es hacer una selección de la librería de cierta forma, que a partir de una alta diversidad de variantes se logre reducir a un número menor de clones que puedan ser analizadas a detalle. Gran parte de los procesos de selección se hacen en base en la especificidad e implica los siguientes puntos: 1) Una librería amplificada de fagos; 2) los fagos son expuestos al blanco para el cual se busca una proteína que se pueda unir; 3) los fagos que no se unieron son removidos por medio lavados; 4) los fagos que se unieron son eludidos, rescatados para infectar de nuevo bacterias y ser amplificados; y 5) análisis de las poblaciones seleccionadas. Este proceso de selección (*bio-panning*) puede ser repetido en varias ocasiones<sup>22</sup>.

### **Una librería de fago-anticuerpos amplificada.**

Aunque dentro de una librería existe una gran diversidad, muchas de estas variables expresan proteínas que no son compatibles para la propagación de los fagos, otros son altamente susceptibles a la proteólisis durante la propagación, aunado a que algunas secuencias pueden llegar a ser deletéreas. Es por eso que es importante iniciar con una librería de alta diversidad, basado en un análisis empírico para observar si no hay pérdida de insertos. Esto puede hacerse mediante cultivos y rescatando cada colonia individualmente para posteriormente hacer un análisis por PCR y secuenciación<sup>22</sup>.

### **Exposición a un antígeno.**

La principal fuerza de el despliegue en fagos y la selección, es que es fácil adaptar protocolos de selección para diferentes rangos, dependiendo de las moléculas a las que este dirigido.

El método más fácil, de gran ayuda y eficiencia se hace mediante la inmovilización del blanco a un soporte el cual sea expuesto a una solución que contenga la librería de fagos, permitiendo la interacción entre fago y su antígeno específico<sup>21</sup>.

### **Lavado y regeneración.**

El propósito básico del lavado es remover los fagos que no tuvieron unión específica. Este paso requiere tomar varias consideraciones, porque se requiere de un balance entre las especificidad y la avidéz de las clonas seleccionadas. La mayoría de la librerías presentan clonas con un espectro de avidéz para blancos en particular, pero muchos de estas clonas seleccionadas presentan uniones fuertes pero con baja especificidad y viceversa. Pero si se realizan regeneraciones de alta astringencia se lograra obtener fagos con fuerte unión y alta especificidad, así se perderán las uniones débiles, y lograr una población de clonas seleccionadas dominada por fagos con alta especificidad. Al contrario si las regeneraciones son débiles se obtendrán fagos con alta unión y baja especificidad. En la practica este balance es ajustado mediante los tiempos de lavado, la concentraron de soluciones astringentes y usando lavados que vayan incrementando progresivamente la astringencia. Los métodos más usados para regeneración son mediante cambio drásticos de pH y el uso de enzimas, como la tripsina<sup>36</sup>.

### **Reinfección y amplificación.**

Usualmente después de cada lavado y elusión es esencial recuperar los fagos para poder amplificar y tener una población de fagos con características deseadas. Sin embargo este dogma ha sido criticado, debido a que algunos reportes indican que el uso de los fagos seleccionados sin ser amplificados reduce problemas de pérdida y ayuda a reducir el número de fagos no específicos que son acarreados durante el proceso de selección.

La desventaja de amplificar cada población de fagos seleccionados es que el tiempo de amplificación es más largo que el tiempo que lleva cada selección por ende para ayudar a obtener fagos con mayor afinidad, lo más factible es que se amplifique aquellos fagos que se seleccionaron bajo las condiciones más drásticas de elusión y así reducir el tiempo de experimentación. Sin este paso final de razonamiento, y criterio de cada investigador, se puede sugerir que en un futuro el “ciclo de despliegue en fagos” puede llegar a ser totalmente automatizado<sup>22</sup>.

### **Análisis de poblaciones**

Uno de los puntos más importantes para la resolución de las pruebas, es el análisis cualitativo y cuantitativo de cada una de las poblaciones obtenidas de la selección, para poder obtener un grupo de anticuerpos que mantengan un reconocimiento mayor con el blanco específico y con alta afinidad. Esta fase nos proporciona información importante para discutir si el criterio de selección fue el correcto y así tener fagos con las características correctas.

## **Interacciones**

Uno de los propósitos dentro del campo de la bioquímica, biología molecular y biología celular es el entendimiento de las interacciones entre moléculas en las células. Parte del conocimiento y aplicación radica en el entendimiento de las características cualitativas y cuantitativas de éstas.

### **Interacción antígeno-anticuerpo.**

El sistema inmune es uno de los mecanismos más complejos de estudio para la ciencia, cuyo propósito es conocer el proceso que lleva al reconocimiento y eliminación de cualquier agente extraño (antígeno) dentro del cuerpo, mediante la producción de anticuerpos.

La interacción entre el anticuerpo y el antígeno implica la unión reversible, no covalente, dentro de las que se encuentran; las fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, puentes salinos, fuerzas de Van der Waals y las interacciones hidrofóbicas. La importancia de estas interacciones depende de la estructura del sitio de unión del anticuerpo específico y sitio de reconocimiento antigénico (epítope). La fuerza de unión entre un único sitio de combinación de un anticuerpo y el epítope de un antígeno se denomina afinidad del anticuerpo. Dicha afinidad es producto de la especificidad biológica de cada organismo. La fuerza de la interacción es caracterizada por una constante de equilibrio de unión expresada en afinidad biológica. Los anticuerpos presentan una gran diversidad de especificidad y afinidades<sup>37</sup>.

La parte más difícil para el estudio y experimentación de las interacciones, es el encontrar un método que permita simular las condiciones reales donde se realizan todos los mecanismos de las interacciones en diferentes contextos. Esto radica en mejorar un sistema donde las reacciones se encuentren en un sistema dinámico y puedan ser monitoreadas, y sea lo más parecido al real. Las características del reconocimiento y unión al antígeno mostrada por un anticuerpo son cruciales para su aplicación. Los parámetros críticos que deben ser evaluados para la aplicación de un anticuerpo son su especificidad de unión y su afinidad de unión.

## **FUNDAMENTOS DEL BIAcore**

### **Biosensores**

Una herramienta que ha venido en crecimiento en los últimos años para poder comprender y analizar las interacciones antígeno-anticuerpo, es el uso de biosensores que ayudan a monitorear interacciones en tiempo real. El fundamento de dichos biosensores radica en el fenómeno de resonancia de plasmones superficiales (SPR sus siglas en inglés)<sup>38</sup>. Este fenómeno es usado por el equipo BIAcore X; este instrumento nos permite monitorear interacciones en tiempo real, en condiciones lo más cercano a las reales, además de no ser requerido el marcado de las moléculas. El funcionamiento radica en la inmovilización de moléculas (ligando) en la superficie de un biosensor, en un ambiente de flujo permanente. Posteriormente se hace pasar a un flujo constante moléculas en solución (analito), las interacciones entre las moléculas son detectadas por un cambio en el ángulo de resonancia de plasmones de la superficie del biosensor, el cual es directamente proporcional a la masa total de moléculas unidas a la superficie<sup>39</sup>.

## BIAcore X. Componentes

El equipo se encuentra formado por tres sistemas principales (Fig. 9):

- a) Biosensor: en este sitio tiene lugar las interacciones. Esta constituido por una lámina de vidrio cubierto por una fina capa de oro, unida covalentemente a una matriz carboxilada de dextrano, en el cual se una el ligando (Fig. 10).
- b) Sistema óptico: es el responsable de la generación de luz polarizada por un prisma, así como de la detección de las señales provenientes de la resonancia de plasmones superficiales.
- c) Sistema de canales: son los encargados de dirigir y controlar los flujos de las soluciones y el paso del analito hacia el sitio donde se encuentra el ligando.

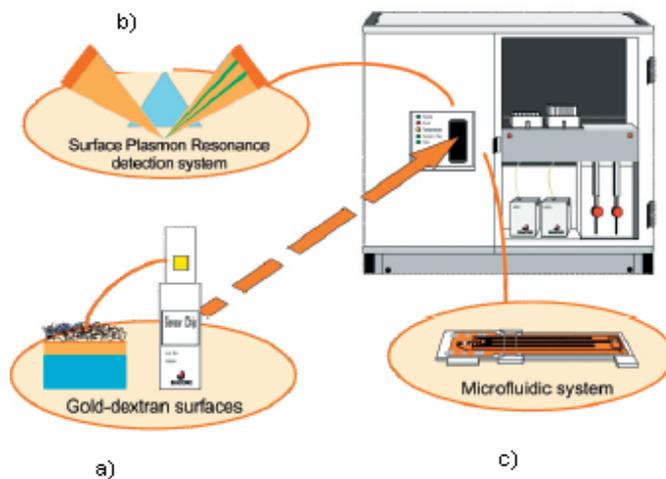


Fig. 9 Los tres principales componentes del BIAcore. a) El principal componente es el biosensor, ya que en este se realizan las interacciones entre cualquier molécula unida a la superficie, existen diferentes tipos de biosensores, dependiendo el grupo unido a la matriz de dextrano. b) sistema óptico, el principal componente de este sistema radica en un prisma recubierto con un metal conductor, la luz incide en este punto y es dirigida al sensor. c) El sistema de canales muestra un sistema de conductos donde se hace pasar flujos de bajo volumen de soluciones con una velocidad controlada.

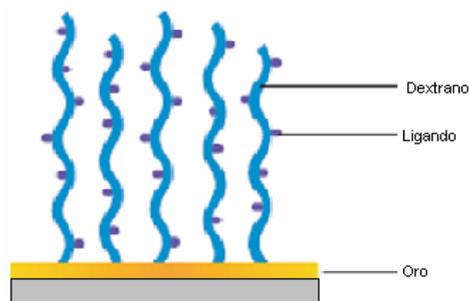


Fig.10 Componentes del sensor. La superficie de un sensor tipo CM5 consiste de tres capas: una capa de vidrio, una capa fina de oro de 50 nm y una matriz de dextrano carboximetilado. La matriz esta unida a la capa de oro a través de una capa de un conector inerte.

### Funcionamiento

El equipo monitorea las interacciones que se dan en la superficie del sensor. Una de las moléculas es inmovilizada covalentemente, (ligando), en la superficie del biosensor mediante enlaces covalentes con la superficie de carboxilatos, mientras otra (u otras) molécula(s), (analito), es puesto en contacto con el ligando mediante un flujo constante. A medida que la interacción sucede se genera una respuesta de resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en ingles) la cual es seguida en tiempo real. Esta respuesta es proporcional a la masa de proteína unida en la superficie, dada en unidades de resonancia, RU (1 RU es equivalente a un cambio de  $1 \text{ pg/mm}^2$  de concentración de proteína en la superficie). Este proceso se sigue continuamente y es presentado en el monitor como un gráfico del cambio de la señal de resonancia en función del tiempo, llamado sensograma, permitiendo un seguimiento en tiempo real de la asociación (esta se produce cuando la muestra es inyectada) y disociación (se produce cuando la muestra termina de fluir por el canal y empieza el flujo de solución amortiguadora) de moléculas desde la superficie del biosensor<sup>40</sup> (Fig.11).

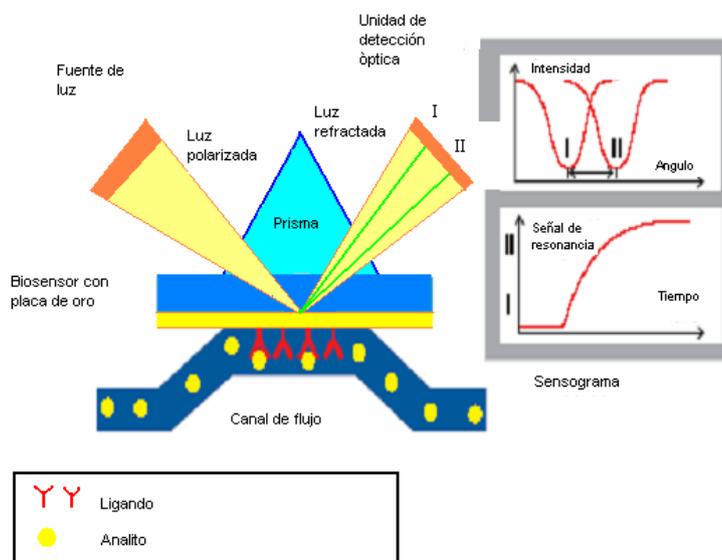


Fig.11 Principios de detección. En el equipo BIAcore X la luz polarizada es dirigida hacia la superficie del sensor. La transferencia de energía ocurre a determinado ángulo crítico que causa una depresión en la reflectividad. Este ángulo varía con el índice de refracción cerca de la superficie del sensor que esta expuesta al canal de flujo. Las interacciones causan un cambio en la masa en la superficie del sensor; y por lo tanto, un cambio en el índice de refracción por lo cual

son detectadas. Este cambio es medido continuamente como un sensograma, el cual graba los cambios en reflectividad con el tiempo.

### **Resonancia de plasmones superficiales.**

Un plasmón es la oscilación colectiva de electrones en una superficie metálica. El fenómeno de resonancia de plasmones superficiales ocurre cuando un haz de luz polarizada, en el plano de la superficie, incide sobre un *film* metálico bajo condiciones de reflexión total interna (TIR sus siglas en ingles). Este fenómeno ocurre en una interfase con un medio sin absorbanza, cuando un haz de luz, propagado en un medio con alto índice de refracción se encuentra con una interfase en un medio de bajo índice de refracción, (un *film* metálico), en un ángulo de incidencia por arriba del ángulo crítico, la luz es totalmente reflejada en la interfase y propagada de nuevo al medio de alta refracción<sup>41</sup>.

Si hablamos de un conductor ideal, al ser la luz totalmente reflejada, no hay habría pérdida de energía neta a través de la interfase, sin embargo los materiales reales tienen una conductividad que no es infinita, aunado, a las propiedades cuánticas de los fotones y los electrones del material, muestran que en la práctica una mínima parte de la intensidad del haz de luz se pierde provocando, en el material, una corriente de electrones en la superficie del conductor; a este fenómeno se le conoce como onda evanescente o plasmón.

Si la interfase (TIR) se cubre con una capa de material conductor, como un metal, de un grosor considerable, la onda evanescente puede penetrar la capa de metal y excitar, electromagnéticamente, provocando ondas de plasmones superficiales, propagándose por la superficie conductora que esta en contacto con el medio de bajo índice de refracción <sup>41</sup> (Fig. 12).

Es decir los plasmones superficiales son generados al excitarse los electrones en la superficie del metal, por la radiación electromagnética polarizada (luz) de una determinada longitud de onda. Estos electrones se comportan de manera diferente a los situados en el interior del mismo. El campo asociado a la radiación incidente induce una oscilación superficial. Cuando la onda evanescente entra en una capa fina de metal, se refleja en la segunda superficie de la placa (en este caso la superficie metal-fluido con macromoléculas circulando). Si el recorrido de la onda evanescente dentro del metal es media longitud de onda (más un número entero de longitudes de onda), la onda evanescente que vuelve al primer medio, interfiere destructivamente con la onda reflejada por lo que la intensidad de la onda reflejada disminuye en esas condiciones y la energía se transforma en una resonancia de plasmones, es decir en una oscilación resonante de electrones en la superficie del conductor. La absorción de energía por los plasmones de superficie durante la resonancia se observa mediante un mínimo en la intensidad de radiación reflejada cuando la variación del ángulo de incidencia alcanza un valor crítico (ángulo crítico). Este ángulo crítico depende de la longitud de onda y el plano de polarización de la radiación incidente así como de las propiedades dieléctricas del medio adyacente a la superficie del metal. Por tanto, cuando el grosor del material conductor aumenta, por ejemplo la unión de alguna macromolécula en la superficie, ocasiona un desplazamiento en el ángulo de resonancia <sup>41</sup> (Fig. 12)

Para que la excitación de un plasmón por medio de un fotón dé lugar a una resonancia, la energía, velocidad y la cantidad de movimiento de las partículas cuánticas, debe ser conservada durante la transformación a plasmón.

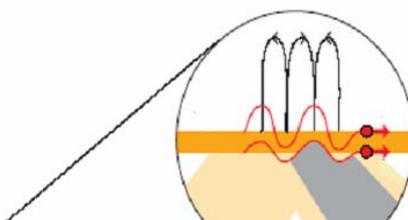


Fig.12. Resonancia superficial de plasmones. La resonancia de plasmones superficiales es producida por la luz polarizada en la interfase de un material metálico, los plasmones superficiales aumentan la amplitud de la onda evanescente. La resonancia superficial de plasmones es observada por el cambio en el ángulo de resonancia de la luz reflejada.

Principalmente el ángulo de resonancia de plasmones superficiales depende de las propiedades del *film* metálico, la longitud de onda de la luz incidente y el índice de refracción del medio colocado al otro lado del *film* metálico. En general, el índice de refracción es sensible a la temperatura, por lo que es importante realizar las medidas a determinada temperatura.

### Interpretación de datos.

La respuesta a un cambio en la masa del sensor que produce un cambio en el ángulo de resonancia en la resonancia de plasmones superficiales y ocasiona un cambio en el ángulo crítico de resonancia, es representada mediante sensogramas<sup>41</sup>.

Un sensograma proporciona esencialmente dos tipos de información (Fig.13).

1. La velocidad de las interacciones (asociación, disociación o ambos); del cual podemos obtener aproximaciones de las constantes cinéticas de afinidad y de concentración de la muestra.
2. El nivel de inmovilización el cual proporciona información sobre las constantes de afinidad y la concentración de la muestra.

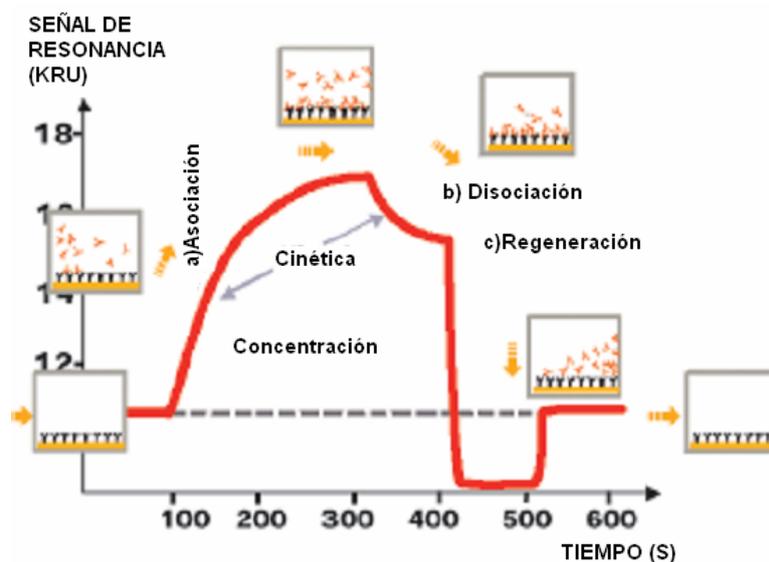


Fig. 13. Elementos de un sensograma. Un sensograma consiste de tres fases. a) En la fase de asociación, el analito es inyectado sobre el ligando inmovilizado en la superficie. Al desarrollarse la interacción entre el analito y el ligando, el incremento de la respuesta es registrada como unidades de resonancia (RU). La máxima unión se especifica como  $R_{max}$ . b) al terminar la inyección del analito el sistema hace fluir amortiguador, en donde se registra la fase de disociación. En muchos casos, la disociación del analito no se completa después de un tiempo razonablemente largo. c) se realiza una inyección con una solución apropiada para regenerar la superficie. Después del pulso de regeneración, la superficie regresa a su nivel inicial.

Para la interpretación de los datos con el fin de obtener constantes cinéticas, de afinidad y concentración deben tomarse en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) Situaciones de interacción: Homogéneo y Heterogéneo.
- b) Concentraciones precisas.
- c) Efecto de transporte de masas. Este fenómeno ocurre cuando la unión del analito con el ligando, se da de manera muy rápida, provocando un gradiente de concentraciones, en la superficie donde se da la interacción, entre analito y ligando. Esto puede disminuirse por medio de cambios de velocidad de flujo durante la experimentación.

Así también para las mediciones

1. Para mediciones cinéticas: flujo rápido y baja capacidad de pegue de la superficie.
2. Para mediciones de concentración: flujo bajo y alta capacidad de pegue de la superficie<sup>42</sup>.

Gracias a la eficiencia del sistema basado en resonancia de plasmones superficiales (BIAcore X), para la medición de interacciones moleculares, se postula como herramienta de gran utilidad para la selección (*bio-panning*) de fago-anticuerpos.

### **Caracterización interacciones antígeno-anticuerpo.**

La caracterización de los anticuerpos se realiza, a partir de la determinación de su afinidad, mediante las constantes de asociación ( $K_A$ ) y disociación en equilibrio ( $K_D$ ), calculadas, y sus velocidades cinéticas ( $k_{on}$  y  $k_{off}$ ), obtenidas experimentalmente, esto es importante, para conocer las propiedades de cada anticuerpo con respecto a su blanco específico.

La afinidad suele representarse mediante una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ), que describe la concentración de antígeno necesaria para ocupar la mitad de los sitios de combinación, de anticuerpos, presentes en una solución. Cuanto menor es la  $K_D$  mayor es la afinidad de la interacción, puesto que se necesita una menor concentración de antígeno para ocupar los sitios de unión. La  $K_D$  de los anticuerpos específicos de antígenos naturales obtenidos de una librería no inmune y desplegada en la superficie de fagos, como son no madurados suele oscilar entre  $10^{-7}$  M y  $10^{-11}$  M<sup>37,48</sup>. Una variedad de métodos están disponibles para medir la afinidad, sólo se requiere

que las concentraciones estén en equilibrio, pero son relativamente pocos los métodos usados para el análisis cinético. Los métodos que detectan cambios en parámetros físicos tales como fluorescencia o absorción en una de las especies reactantes pueden, en ciertos casos, ser empleados para el análisis cinético directo usando moléculas naturales. En este caso, el antígeno o el anticuerpo son a menudo marcados con una sonda radioactiva o fluorescente. Para medidas de afinidad se permite que la formación del complejo antígeno-anticuerpo alcance el equilibrio, los reactantes libres y en complejo son separados y por lo menos uno de ellos se cuantifica. Una vez que la cantidad de reactante libre o en complejo es determinada, los datos obtenidos pueden ser graficados, proporcionando información no sólo de la constante de afinidad sino también del número de sitios de unión y sobre la reactividad inmune.

La constante de afinidad en equilibrio, de un anticuerpo puede expresarse de dos maneras:

$$K_A = (Ac-Ag)/(Ac)(Ag), \text{ medida en l/mol o } M^{-1} \quad \text{Ecuación [1]}$$

$$K_D = (Ac)(Ag)/(Ac-Ag), \text{ medida en mol/l o } M \quad \text{Ecuación [2]}$$

En donde: Ac: concentración del anticuerpo y Ag: concentración del antígeno.

Una es el inverso de la otra, por lo que una  $K_A$  de  $10^9 M^{-1}$  es idéntica a una  $K_D$  de  $10^{-9} M$  (o 1 nM). En el primer caso, a mayor valor de la  $K_A$ , mayor es la afinidad del anticuerpo, mientras que para la  $K_D$  sucede lo contrario. Es importante notar que la forma de expresar la constante de afinidad puede traer confusiones<sup>42</sup>.

Se denominan afinidades altas, valores de  $K_D$  menores a  $1 \times 10^{-7} M$ .

La determinación de la constante de afinidad de un anticuerpo es un problema que aparentemente sólo ha sido resuelto recientemente con la aparición de equipos que pueden mantener un seguimiento en tiempo real de las interacciones bioespecíficas entre moléculas, basados en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmones superficiales, o SPR (por sus siglas en inglés).

## **Hipótesis**

Por medio de la técnica de despliegue en fagos de anticuerpos y la resonancia de plasmones superficiales se puede optimizar la selección de anticuerpos que reconozcan específicamente a la melitina, así como a la región hidrofóbica de esta.

## **Objetivo general**

Seleccionar y caracterizar cinéticamente fago-anticuerpos que reconozcan específicamente a la melitina, así como la región hidrofóbica de ésta, por medio de resonancia de plasmones superficiales.

## **Objetivos particulares**

- Seleccionar fago-anticuerpos que reconozcan específicamente a la melitina.
- Caracterizar cinéticamente fago-anticuerpos contra melitina.
- Seleccionar fago-anticuerpos que reconozcan específicamente la región hidrofóbica de la melitina.
- Caracterizar fago-anticuerpos contra la región hidrofóbica de la melitina.

## **METODOLOGÍA**

La metodología puede dividirse en cuatro partes principales, la primera consiste en la amplificación y recuperación del banco de fago-anticuerpos humano. La segunda parte consiste en la selección de fago-anticuerpos por medio de resonancia de plasmones superficiales contra melitina y un péptido sintetizado, que corresponde a la parte hidrofóbica de la melitina. La tercera etapa consta en la reinfección de bacterias, amplificación y recuperación de los fagos-anticuerpos seleccionados. La última parte consiste en la caracterización cinética de las fracciones obtenidas de a selección contra los antígenos.

## PROTOSCOLOS.

### 1-Banco de Fago-anticuerpos humanos.

La alícuota del banco se obtuvo gracias al grupo del Dr. Baltazar Becerril, con  $1 \times 10^8$  transformantes por mililitro, a partir de una librería no-inmune.

El primero de los pasos fue amplificar el fago ayudador (*helper*), se utilizó el VSCM13 (Stratagene®).

#### Amplificación de fago ayudador (*helper*)

- Crecer una colonia de células TGI en 2 ml de medio YT2X a 37 °C con agitación, durante toda la noche, ON (por sus siglas en inglés, *overnight*).
- Al día siguiente inocular 100 µl del cultivo, ON, de células TGI en 10 ml de medio YT2X y dejar crecer a 37 °C con agitación hasta una densidad óptica (DO) de 0.7-1 de luz visible a 600 nm y agregar 50 µl de fago ayudador (*Helper VSCM13*).
- Incubar a 37 °C por 30 min sin agitación y pasar a 37 °C con agitación.
- Transferir el cultivo a un matraz con 500 ml de medio YT2X+Km (50 µg/ml), e incubar por una noche a 37 °C con agitación.

#### Recuperación de fago ayudador

- Centrifugar el cultivo a 3500 rpm por 20 min a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a un recipiente estéril y adicionar el 15% de la mezcla PEG+NaCl, del volumen del cultivo. Incubar en hielo para facilitar la precipitación.
- Centrifugar a 8000 rpm por 40 min a 4 °C, tirar el sobrenadante y resuspender en 22.5 ml de PBS1x.
- Incubar a 70°C por 20 min, centrifugar a 3500 rpm por 15 min a 4 °C.
- Filtrar el sobrenadante en membrana de 0.45µm, almacenar a 4 °C.

#### Titulación de fago ayudador.

- Crecer una colonia de TGI en 2 ml de medio YT2X a 37°C durante la noche.
- Inocular al día siguiente 100 µl del cultivo en 10 ml de medio YT2X y dejar crecer a 37 °C con agitación hasta una densidad óptica (DO) de 0.7-1 de luz visible a 600 nm.
- Hacer diluciones del fago ayudador en 1 ml de medio YT2X.
- Tomar 10 µl de fagos y adicionar en 990µl de YT2X ( $10^{-2}$ ), mezclar por inversión varias veces.
- Tomar 10 µl de la dilución anterior y adicionar a 990 µl de YT2X ( $10^{-4}$ ) mezclar por inversión.
- Tomar 10 µl de la dilución anterior y adicionar a 990 µl de YT2X ( $10^{-6}$ ), mezclar por inversión.
- Tomar 10 µl de la dilución anterior y adicionar a 990 µl de YT2X ( $10^{-8}$ ), mezclar por inversión.
- Tomar 10 µl de la dilución anterior y adicionar a 990 µl de YT2X ( $10^{-10}$ ), mezclar por inversión.

- Tomar 10 µl de las 3 últimas diluciones y por separado agregar 990 µl de células TGI a una DO 0.7-1.
- Incubar las 3 diluciones a 37 °C sin agitación por 30 min y a 37 °C con agitación por 30 min.
- Sembrar 100 µl en cajas de medio sólido YT2X+Km (50 µg/ml), incubar durante toda la noche, contar las colonias y sacar la concentración mediante la siguiente formula.

**Concentración de fagos por mililitro= (No. De colonias)(1/factor de dilución)(10) Ecuación [3]**

Amplificación del banco de fago-anticuerpos.

- Colocar en 15 ml de medio YT2X+ Amp (200 µg/ml)+ Glucosa 2% e inocular el banco.
- Incubar a 37 °C con agitación hasta llegar a una DO de 0.7-1 y adicionar el fago ayudador en una relación de 20 fagos por bacteria (una DO de 0.5 equivale a  $5 \times 10^8$  células). La formula utilizada es:

**(concentración de células) (20) / (concentración fago ayudador) Ecuación [4]**

- Dejar por 30 min a 37 °C sin agitación y 30 min a 37 °C con agitación.
- Centrifugar el cultivo a 400 rpm por 15 min a 4 °C. Desechar el sobrenadante y resuspender en medio YT2+Km (50 µg/ml)+Amp (200 µg/ml), en un volumen final de 50 ml, en un matraz de 250 ml.
- Incubar a 37 °C por 30 min con agitación y a 30 °C por toda la noche con agitación.

Recuperación de fago-anticuerpos.

- Dividir el cultivo en 2 recipientes con 25 ml en cada uno, centrifugar a 4000 rpm por 20 min a 4 °C.
- Pasar el sobrenadante a tubos falcón y agregar 5 ml de mezcla, PEG+NaCl, incubar durante 15 min en hielo.
- Centrifugar a 5000 rpm por 20 min a 4 °C, desechar el sobrenadante, resuspender en 20 ml finales de PBS1X y adicionar 4 ml de PEG+NaCl, incubar en hielo por 15 min.
- Centrifugar a 5000 rpm por 20 min a 4 °C, desechar el sobrenadante, resuspender en 2.5 ml de PBS1X, pasar a tubos *eppendorf* de 1.5 ml.
- Centrifugar a 14000 rpm por 10 min a 4 °C.
- Filtrar el sobrenadante con membrana de 0.45 µm, almacenar a 4 °C.

Titulación fago-anticuerpos.

- Crecer una colonia de TGI en 2 ml de medio YT2X a 37 °C durante la noche.
- Inocular al día siguiente 100 µl del cultivo en 10 ml de medio YT2X y dejar crecer a 37 °C con agitación hasta una DO de 0.7-1 de luz visible a 600 nm.
- Hacer diluciones de los fago-anticuerpos en 1 ml de medio YT2X.

- Tomar 10  $\mu\text{l}$  de fagos y adicionar en 990  $\mu\text{l}$  de YT2X ( $10^{-2}$ ), mezclar por inversión varias veces.
- Tomar 10  $\mu\text{l}$  de la dilución anterior y adicionar a 990  $\mu\text{l}$  de YT2X ( $10^{-4}$ ) mezclar por inversión.
- Tomar 10  $\mu\text{l}$  de la dilución anterior y adicionar a 990  $\mu\text{l}$  de YT2X ( $10^{-6}$ ), mezclar por inversión.
- Tomar 10  $\mu\text{l}$  de la dilución anterior y adicionar a 990  $\mu\text{l}$  de YT2X ( $10^{-8}$ ), mezclar por inversión.
- Tomar 10  $\mu\text{l}$  de la dilución anterior y adicionar a 990  $\mu\text{l}$  de YT2X ( $10^{-10}$ ), mezclar por inversión.
- Tomar 10  $\mu\text{l}$  de las 3 últimas diluciones y por separado agregar 990  $\mu\text{l}$  de células TGI a una DO 0.7-1.
- Incubar las 3 diluciones a 37 °C sin agitación por 30 min y a 37 °C con agitación por 30 min.
- Sembrar 100  $\mu\text{l}$  en cajas de medio sólido YT2X+Amp (200  $\mu\text{g/ml}$ ), incubar durante toda la noche, contar las colonias y sacar la concentración mediante la ecuación [3].

## 2-Selección de fago-anticuerpos

Obtención de melitina y péptido.

La melitina se obtuvo de la compañía sigma-aldrich (*Melittin from honey bee venom*, clave M41714-1MG), con la secuencia Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-NH<sub>2</sub>, peso molecular de 2845.8 Da con una pureza del 97% (HPLC), y un punto isoeléctrico de 8.

El péptido, parte hidrofóbica de la melitina, con la secuencia Gly-Ile-Gly-Ala-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Cys se obtuvo por medio de la compañía sigma-aldrich, peso molecular de 1441.78 Da, punto isoeléctrico estimado (*Protein calculator V3.3*) de 8.22.

Pruebas de pre-concentración.

Se llama pre-concentración al proceso en el cual las cargas negativas de los carboxilatos en el biosensor son usadas para concentrar el ligando cerca de la superficie para la unión. Durante este proceso previo a la inmovilización deben ponerse a prueba dos características importantes para la optimización de la inmovilización del ligando; el conocer la concentración correcta de este y las condiciones de las soluciones amortiguadoras (*buffer*) con el que se pueda mejorar el acoplamiento<sup>44</sup>. Por esto existen algunas reglas a seguir:

1. Evitar que los componentes de la solución puedan competir con el ligando para reaccionar con los grupos de la superficie (no usar soluciones con aminas primarias).
2. La inmovilización es posible utilizando soluciones con una unidad de pH por debajo del punto isoeléctrico del ligando, esto permite optimizar la atracción entre las cargas positivas del ligando y las negativas de la superficie del biosensor.
3. Mantener la fuerza iónica de la solución, del ligando, en bajas concentraciones (si es posible mantener la concentración de cationes

debajo de 20 mM) y favorecer las interacciones electrostáticas entre el ligando y la superficie.

4. Usar concentraciones del ligando en un rango de entre 10-100  $\mu\text{g}$  dependiendo del peso molecular y el punto isoeléctrico del ligando y el propósito de la aplicación<sup>45</sup>.

Las condiciones para optimizar la inmovilización depende de la naturaleza del ligando y la cantidad requerida de ligando inmovilizado.

#### Prueba de pre-concentración con melitina

Todos los experimentos de interacciones se realizaron a 25 °C. Se hicieron inyecciones de las disoluciones de melitina con Mes, 10 mM pH 6.5 y HEPES, 10 mM pH 7, en pares, con concentraciones de 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  y 400  $\mu\text{g/ml}$ , 35  $\mu\text{l}$  en cada inyección de prueba.

#### Inmovilización de melitina al chip.

Para la inmovilización se utilizó un biosensor de tipo CM5, el cual tiene una superficie una matriz de carboxilatos permitiendo gran flexibilidad para la química de inmovilización y provee un ambiente hidrofílico para la interacción entre las moléculas. La unión de la melitina (ligando) con la matriz se hizo mediante el *kit amino coupling* (BIAcoreX<sup>®</sup>), en el cual se introducen esteres de N-hidroxisuccinimida dentro de la superficie de la matriz para la modificación de los grupos carboxilatos mediante una mezcla de N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etil-N'-(dimetil-aminopropil)-carbamida (EDC). Los esteres reaccionan espontáneamente con las aminas y otros grupos nucleofílicos del ligando para formar enlaces covalentes (Fig.14).

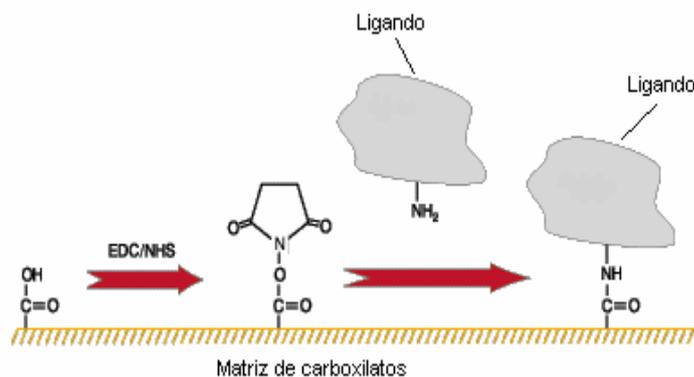


Fig.14 Inmovilización del ligando. Mediante la activación de la superficie de la matriz, la unión de la mezcla de EDC/NHS con los carboxilatos ocasiona la pérdida del  $\text{H}^+$  en el grupo hidroxilo de estos y así facilitar la unión covalente por medio de un enlace peptídico, entre el ligando y la matriz del biosensor.

Se realizaron 2 inmovilizaciones a diferentes concentraciones de melitina, con un flujo de 5  $\mu\text{l/min}$ , inyectando de la siguiente forma:

- a) Mezcla de EDC/NHS, 35  $\mu\text{l}$
- b) Melitina 35  $\mu\text{l}$  (15  $\mu\text{g/ml}$  y 300  $\mu\text{g/ml}$ )
- c) Etanolamina-HCl 35  $\mu\text{g/ml}$
- d) Hidróxido de sodio (NaOH, 5 mM) 5  $\mu\text{l}$

### Pruebas de pre-concentración con el péptido

Se realizaron inyecciones de diluciones del péptido en HEPES, pH 7 10 mM a unas concentraciones del péptido de 50 µg/ml, 100 µg/ml y 200 µg/ml, 35 µl en cada inyección de prueba.

### Inmovilización del péptido

Se utilizó el biosensor de tipo CM5, la unión del péptido al chip se hizo mediante el *kit* de acoplamiento del ligando tiol, este mecanismo es una alternativa del acoplamiento amino (*amino coupling*), para un amplio rango de ligandos. Este proceso puede ser utilizado en cualquier grupo tiol en el ligando o grupos reactivos introducidos por modificaciones del grupo carboxilo o que contenga residuos amino. Este método es útil para inmovilización de proteínas ácidas, péptidos o ligandos pequeños que carecen o el número de grupos aminos son pocos y ligando cuyo sitio específico de acoplamiento son importantes. El acoplamiento del ligando tiol permite un intercambio disulfuro-tiol entre el nativo o el grupo tiol introducido en el ligando y una reacción de puente bisulfuro con la superficie de la matriz<sup>46</sup> (Fig.15).

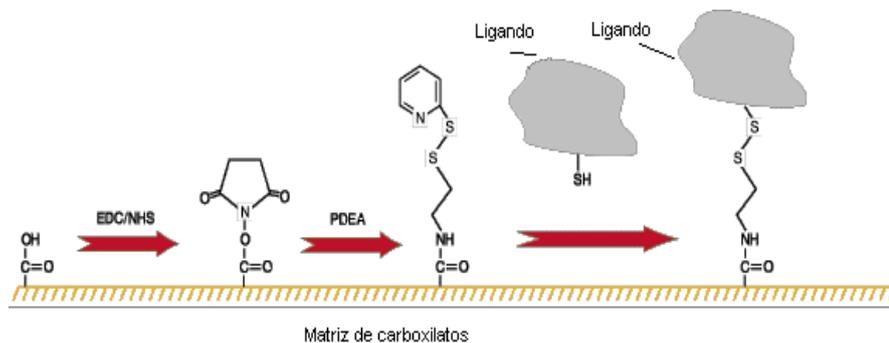


Fig.15 La activación de los carboxilatos se lleva a cabo por medio de la mezcla de EDC/NHS, el grupo de bisulfatos son introducidos en la superficie por medio del acoplamiento amino de 2-(2-pirimidiliditio)etanamina (PDEA)

Se realizó la inmovilización a un flujo de 5 µl/min con las siguientes inyecciones:

- Mezcla de EDC/NHS, 10 µl
- PDEA, 20 µl
- péptido 35 µl (200 µg/ml)
- Cisteína-NaCl 20 µl

### Selección del banco de fago-anticuerpos contra melitina

Se realizaron tres selecciones cada una por duplicado, la solución de corrida fue HEPES pH 7 10 mM se inyectó 70 µl de fago-anticuerpos por cada selección una velocidad de flujo de 10 µl/min, la regeneración se hizo mediante hidróxido de sodio (NaOH) a diferentes concentraciones en un gradiente en aumento de 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM y 30 mM, inyectando 5 µl de cada concentración a una velocidad de flujo de 10 µl/min.

Los fago-anticuerpos eluidos fueron recibidos en 50 µl de solución Tris-HCl.

### Selección del banco de fago-anticuerpos contra péptido

La selección se realizó a partir de la biblioteca completa de fago-anticuerpos. La solución de corrida fue HEPES pH 7 10 mM se inyectaron 70  $\mu$ l en cada prueba con una velocidad de flujo de 10  $\mu$ l/min, la regeneración se hizo con hidróxido de sodio (NaOH) en un gradiente en aumento con las siguientes concentraciones 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM.

Los fago-anticuerpos eluidos fueron recibidos en 50  $\mu$ l de solución Tris-Cl.

### 3-Amplificación de fago-anticuerpos seleccionados.

#### Reinfección de bacterias con fago anticuerpos

La reinfección se llevo acabo a partir de los fagos-anticuerpos recuperados de cada selección.

- Crecer una colonia de TGI en 2 ml de medio YT2X a 37 °C durante la noche.
- Inocular al día siguiente 100  $\mu$ l del cultivo en 5 ml de medio YT2X y dejar crecer a 37 °C con agitación hasta una densidad óptica (DO) de 0.7-1 de luz visible a 600 nm.
- Agregar los fago-anticuerpos, dejar por 30 min a 37 °C sin agitación y 30 min a 37 °C con agitación.
- Plaquear 1 ml en cajas de petri con medio YT2X+Amp (200  $\mu$ g/ml), el resto almacenarlo con glicerol al 10% a -70 °C. Incubar toda la noche a 37 °C.

#### Amplificación de fago-anticuerpos seleccionados.

- "Cosechar" las células infectadas previamente y agregarlas en 25 ml de medio YT2X+Amp (200  $\mu$ g/ml)+Glucosa 2%, dejar crecer a una DO de 0.7-1 y adicionar el fago ayudador en una relación de 20 fagos por bacteria.
- Dejar por 30 min a 37 °C sin agitación y 30 min a 37 °C con agitación.
- Centrifugar el cultivo a 400 rpm por 15 min a 4 °C. Desechar el sobrenadante y resuspender en medio YT2+Km (50  $\mu$ g/ml)+Amp(200  $\mu$ g/ml), en un volumen final de 50 ml, en un matraz de 250 ml.
- Incubar a 37 °C por 30 min con agitación y a 30 °C por toda la noche con agitación.

Para recuperar el banco y la titulación usar los protocolos de Recuperación de fago-anticuerpos y titulación fago-anticuerpos de la sección 2.

### 4-Cinéticas

Se realizaron cinéticas de 4 de las fracciones seleccionadas de fago-anticuerpos contra melitina y péptido por triplicado a una velocidad de flujo de 5  $\mu$ l/min y 10  $\mu$ l/min, en una solución de corrida HEPES pH 7, 10 mM, la tabla muestra cada una de las inyecciones:

Fracción	Volumen	Retraso	Concentración	Ligando
F1	80 $\mu$ l	600 seg	0.1n,0.05n,10n,100n	M y P
F2	80 $\mu$ l	600 seg	0.1n,0.05n,10n,100n	M y P
F1	100 $\mu$ l	900 seg	0.1n,0.05n,10n,100n	M y P

F2	100 $\mu$ l	900 seg	0.1n,0.05n,10n,100n	M y P
P1	80 $\mu$ l	600 seg	0.1n,0.05n,1n,5n,10n	M y P
P2	80 $\mu$ l	600 seg	0.1n,0.05n,1n,5n,10n	M y P
P1	100 $\mu$ l	900 seg	0.1n,0.05n,1n,5n,10n	M y P
P2	100 $\mu$ l	900 seg	0.1n,0.05n,1n,5n,10n	M y P

Donde:

F1 es una fracción seleccionada de fago-anticuerpos contra melitina

F2 es una fracción seleccionada de fago-anticuerpos contra melitina

P1 es una fracción seleccionada de fago-anticuerpos contra péptido

P2 es una fracción seleccionada de fago-anticuerpos contra péptido

M es melitina P es péptido

n es nanomolar p es picomolar

Retraso es el tiempo transcurrido desde el final de la inyección (disociación) hasta la regeneración.

Las regeneraciones se realizaron con NaOH en las concentraciones 5 mM, 10 mM y 20 mM.

La evaluación se realizó mediante la sustracción del canal que no tiene ninguna molécula inmovilizada (canal de referencia) al canal donde se encuentra inmovilizado el ligando (canal de prueba) y así eliminar del sensograma las interacciones inespecíficas.

Los datos obtenidos fueron analizados usando el ajuste global, aplicando el modelo Langmuir de interacciones 1:1, en algunos casos se utilizó el ajuste de línea de base oscilante, así como también el ajuste independiente de asociación y disociación.

## EQUIPO

El análisis de las interacciones por medio de resonancia de plasmones superficiales se realizó en el equipo BIAcore X (Amersham Pharmacia Biotech). La evaluación se hizo mediante el programa BIAevaluation 3.2.

## SOLUCIONES

### Medios de cultivo

#### YT2X líquido

Para 1 litro:

Cloruro de sodio 10 gr.

Extracto de levadura 10 gr.

Triptona 16 gr.

Agar 15 gr.

Ajustar a pH 7 NaOH 1 M

#### YT2X sólido

Para 1 litro:

Cloruro de sodio 10 gr.

Extracto de levaduras 10 gr.

Triptona 16 gr.

Ajustar a pH 7 con Na OH 1M

### Soluciones

#### PBS 1X

Para 1 litro:

NaCl 8 gr.

KCL 0.2 gr.

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 gr

Ajustar a pH 7.4 con NaOH 1 M

#### PEG +NaCl

Para 1 litro:

PEG 800 al 20 %, 200 gr.

NaCl 2.5 M, 146.1 gr.

Stock de Amp 200,000 µg/ml (Ampicilina)  
Para 50ml:  
2 gr de ampicilina  
repartir en alícuotas de 1ml

NaOH 1M (hidróxido de sodio)  
Para 10 ml:  
NaOH .4 gr.

Stock MES pH 6.5, 100 mM  
Para 100 ml:  
MES 2.132 gr.  
Ajustar a pH 6.5 con NaOH 1 M  
Filtrar y desgasificar

Stock HEPES pH 7, 100 mM  
Para 100ml:  
HEPES 2.383 gr.  
Ajustar a pH 7 con NaOH 1M  
Filtrar y desgasificar

Stock melitina 500 µl/ml  
Para 1 ml:  
Melitina .5 gr.  
EDC, N-etil-N'-(dimetil-aminopropil)-carbamida, 400 mM  
Para 20 ml:  
EDC 1.5336 gr  
Filtrar y desgasificar

Stock péptido 500 µl/ml  
Para 1 ml:  
Péptido .5 gr.

NHS, N-hidroxisuccinimida, 200 mM  
Para 20 ml:  
NHS 0.46036 gr.  
Filtrar y desgasificar

Etanolamina 1 M pH 8.5  
Para 250 ml:  
Ajustar pH con NaOH 1 M  
Filtrar y desgasificar

Solución de borato pH 8.5, 100 mM  
Para 50 ml:  
Acido bórico 0.31 gr  
Ajustar a pH 8.5 con NaOH 1 M

Tris-Cl 1M  
Para 50 ml:  
Tris-Cl 7.88 gr.

PDEA de 2-(2-pirimidilditio)etanamina, 80 mM  
Para 50 ml:  
Disolver PDEA 4.5 gr en 250µl de solución de borato pH 8.5 100 mM

Solución de formato de sodio pH 4.3, 100 mM  
Para 50 ml:  
Formato de sodio 0.35 gr  
Ajustar a pH 4.3 con acido fórmico

Cisteina-NaCl  
Cisteina 50mM-NaCl 1M  
Disolver 1.5mg de l-cisteina y 14mg de NaCl en 250µl de solución de formato de sodio pH 4.3 100 mM

## RESULTADOS

### Amplificación de fago-anticuerpos humanos

Amplificación del fago ayudador (*helper*)

Se obtuvo el siguiente número de colonias en cada caja por dilución

Tabla 1

Dilución	No. de colonias
$1 \times 10^{-10}$	184
$1 \times 10^{-12}$	2

Utilizando la Ecuación 3 nos da una titulación aproximada de  $2 \times 10^{13}$  fagos/ml

Amplificación banco de fago-anticuerpos humanos

Se obtuvo el siguiente número de colonias en cada caja por dilución

Tabla 2

Dilución	No. de colonias
$1 \times 10^{-10}$	426
$1 \times 10^{-12}$	7

Utilizando la Ecuación 3 nos da una titulación aproximada de  $7 \times 10^{13}$  fagos/ml

### Selección de fago-anticuerpos humanos

Pruebas de preconcentración con melitina

La prueba se realizó para conocer cual era la solución amortiguadora más óptima para la inmovilización así como la concentración a la cual se observa una mejor respuesta.

Se observó la siguiente respuesta.

Tabla 3

Concentración	Respuesta (RU)
20 $\mu\text{g/ml}$ pH 6.5	2660
20 $\mu\text{g/ml}$ pH 7	2716
10 $\mu\text{g/ml}$ pH 6.5	1185
10 $\mu\text{g/ml}$ pH 7	1728
300 $\mu\text{g/ml}$ pH 7	3173
400 $\mu\text{g/ml}$ pH 7	3314

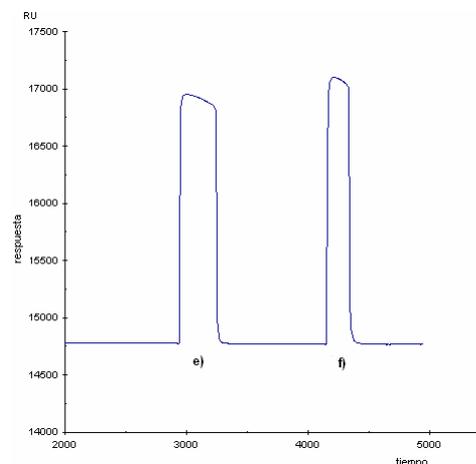
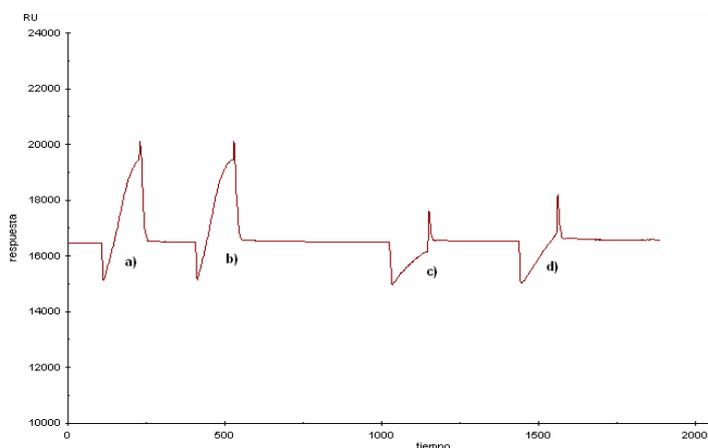


Fig. 16 Preconcentración de melitina. Se muestran las respuestas de las inyecciones a diferentes concentraciones de melitina a diferentes pHs; a) melitina 20  $\mu\text{g/ml}$  a pH 6.5, b)

melitina 20 µg/ml a pH 7, c) melitina 10 µg/ml pH 6.5, d) melitina 10 µg/ml pH 7, e) melitina 300 µg/ml, f) melitina 400 µg/ml.

### Inmovilización melitina

La melitina se inmovilizó en los siguientes niveles

Tabla 4

Concentración	Respuesta (RU)
20 µg/ml	586
400 µg/ml	824

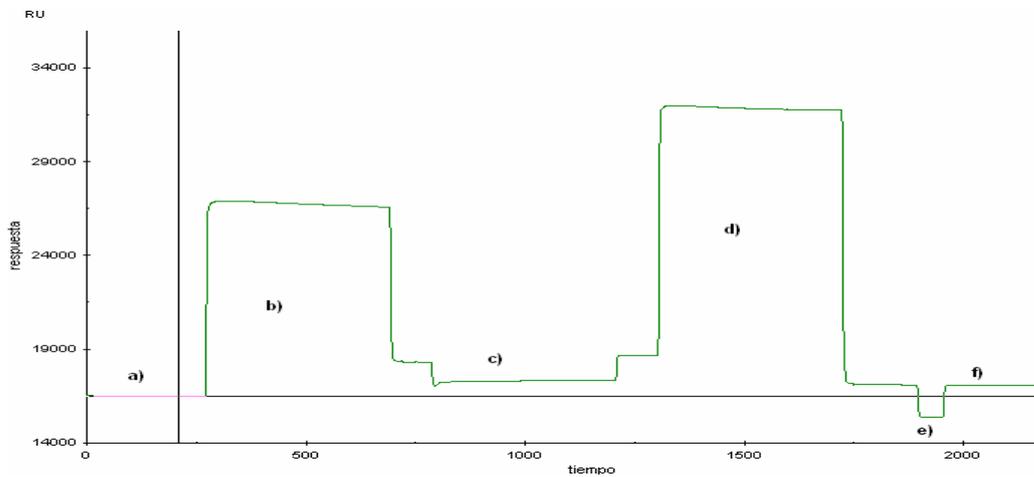


Fig.17 Inmovilización melitina. Se muestra la respuesta a las inyecciones realizadas para la unión de la melitina al biosensor; a) línea base, b) mezcla de EDC/NHS, c) melitina, d) etanolamina, e) regeneración NaOH 5 mM, e) nivel de inmovilización

### Pruebas preconcentración péptido

Se observaron las siguientes respuestas

Tabla 5

Concentración	Respuesta (RU)
50 µg/ml	1674
100 µg/ml	1965
200 µg/ml	2277

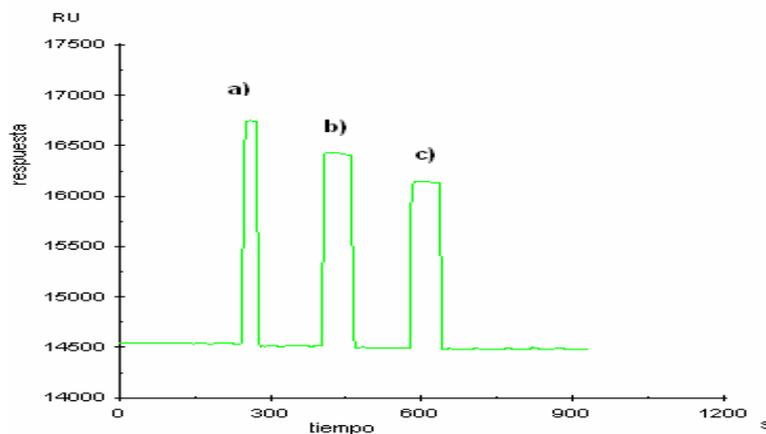


Fig.18 Preconcentración péptido. Se muestra la respuesta de inyecciones a diferentes concentraciones de péptido, a) 200 µg/ml, b) 100 µg/ml, c) 50 µg/ml.

### Inmovilización de péptido

Se inmovilizo el péptido en los siguientes niveles.

Tabla 6

Concentración	Respuesta (RU)
200 µg/ml	1001

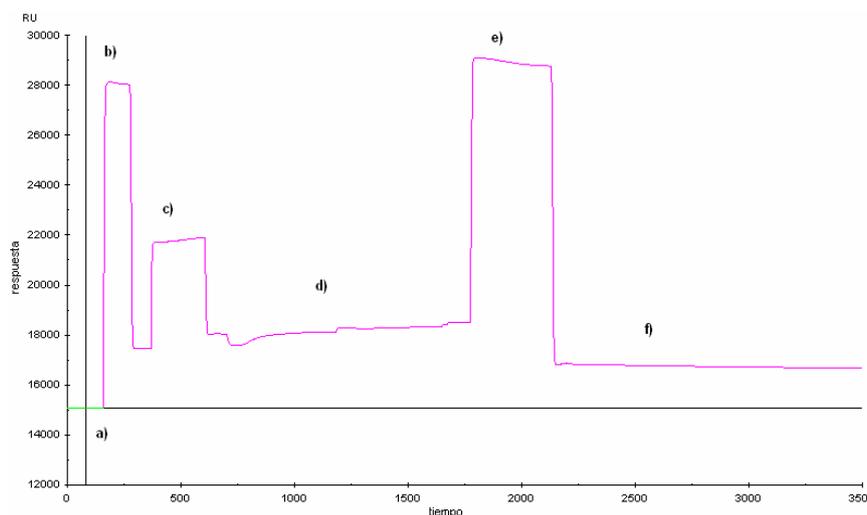


Fig. 19 Inmovilización del péptido. Se muestra la respuesta a las inyecciones realizadas para la unión del péptido al biosensor, a) línea base, b) mezcla de EDC/NHS, c) PDEA, d) péptido, e) cisteína-NaCl, f) nivel de inmovilización.

### Selección fago-anticuerpos contra melitina

La selección se realizó a partir de la librería de fago-anticuerpo humano no-inmunizada (ver protocolos), se obtuvo la siguiente respuesta.

Primera selección

Tabla 7

Fracciones	Respuesta (RU)	Regeneración (mM)	NaOH
Unión	328		
1	24	1	
2	47	3	
3	27	5	
4	14	5	
5	14	5	

6	35	10
7	97	20
8	39	20
9	14	30

Segunda selección

Tabla 8

Fracciones	Respuesta (RU)	Regeneración NaOH (mM)
Unión	303	
1	12	1
2	37	3
3	30	5
4	13	5
5	45	10
6	23	20
7	43	30
8	84	30

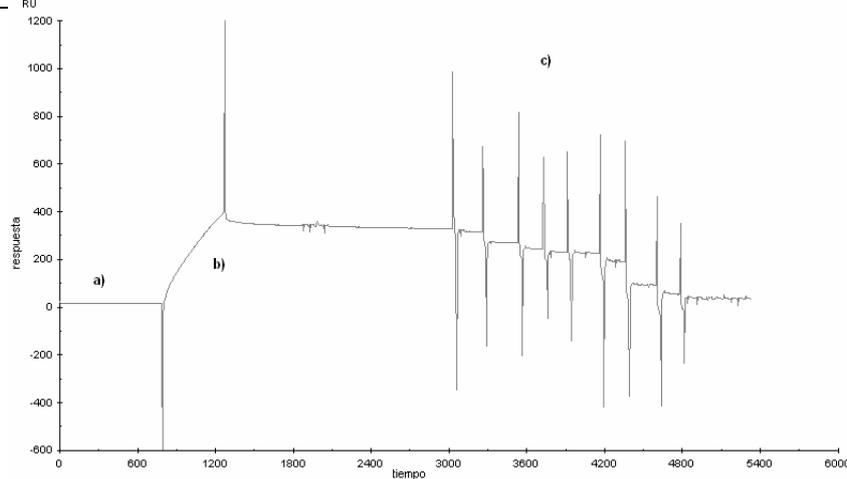


Fig.20 Selección fago-anticuerpos contra melitina. El sensograma muestra la diferencia entre los canales de prueba y de referencia, a) línea base, b) curva de unión, c) picos de las diferentes regeneraciones.

Se juntaron las últimas 4 fracciones repartidas en dos es decir, de la primera selección se junto la fracción 9 y 8, así como las fracciones 7 y 6, se les llamaron F1 y F2, respectivamente.

Selección fago-anticuerpos contra péptido hidrofóbico.

Durante la selección se obtuvo la siguiente respuesta

Tabla 9

Fracciones	Respuesta (RU)	Regeneración NaOH (mM)
Unión	38	
1	10	5mM
2	29	10mM

Segunda selección

Tabla 10

Fracciones	Respuesta (RU)	Regeneración NaOH (mM)
Unión	30	
1	2	5mM
2	26	10mM

NOTA: La respuesta es dada por la resta entre el canal, que tiene inmovilizada el ligando inmovilizado y el canal de referencia, la sustracción disminuye la medición del pegado inespecífico.

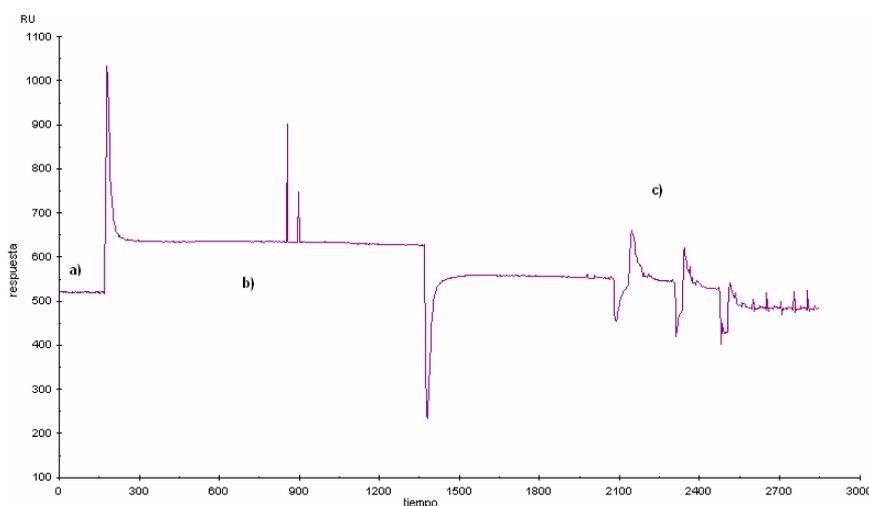


Fig. 21 Selección fago-anticuerpos contra péptido. El sensograma muestra la respuesta entre el canal de referencia y el canal de prueba, a) línea base, b) curva de unión, c) picos de las diferentes regeneraciones

Se juntaron las fracciones con su correspondiente la fracción 1 de la primera selección con la fracción 1 de la segunda selección, así también con las fracciones 2 y se les denominó P1 y P2 respectivamente.

### Amplificación de fago-anticuerpos seleccionados

Se obtuvo el siguiente número de colonias en cada caja por dilución

Tabla 11

Fracción	Dilución	No. de colonias
F1	$1 \times 10^{10}$	158
F1	$1 \times 10^{12}$	2
F2	$1 \times 10^{10}$	162
F2	$1 \times 10^{12}$	3
P1	$1 \times 10^{10}$	150
P1	$1 \times 10^{12}$	2
P2	$1 \times 10^{10}$	250

P2	$1 \times 10^{12}$	3
----	--------------------	---

Basados en la fórmula la titulación dan un valor aproximado es:  
 F1  $2 \times 10^{13}$  fagos/ml F2  $3 \times 10^{13}$  fagos/ml, P1  $2 \times 10^{13}$  fagos/ml y P2  $3 \times 10^{13}$  fagos/ml

## Cinéticas

### Cinética melitina

Las cinéticas realizadas con las fracciones F1, F2, P1 y P2 contra melitina se obtuvieron las siguientes gráficas y valores. Los sensogramas muestran la relación entre unidades de resonancia (RU) y tiempo (s). Los residuales muestran la diferencia entre los datos experimentales y el modelo utilizado.

Fracción F1 contra melitina; ajuste global Langmuir 1:1.

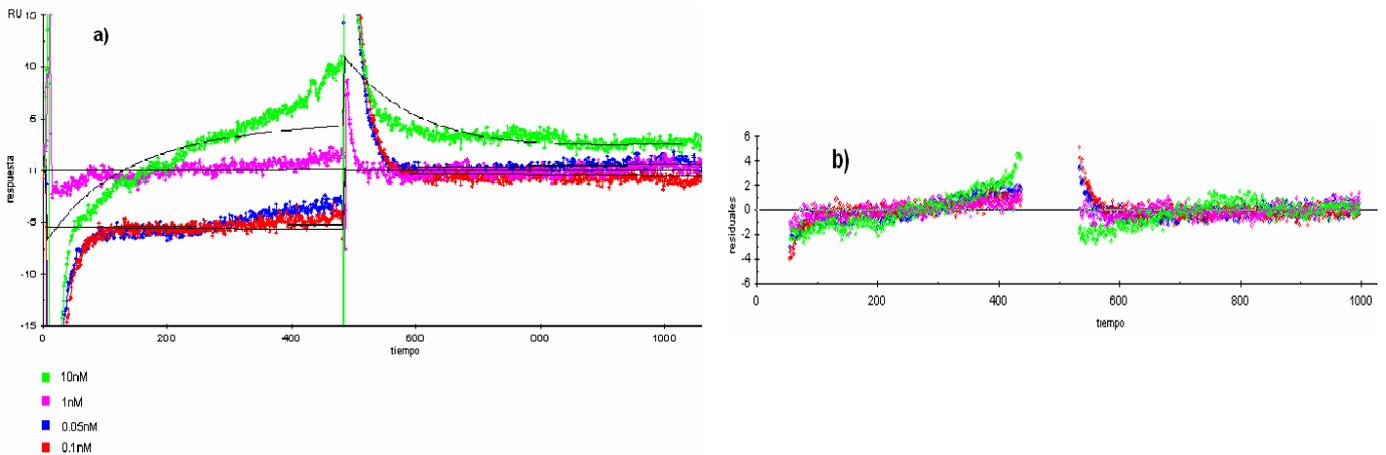


Fig. 22 Cinética F1 contra melitina. a) Los sensogramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra melitina a diferentes concentraciones 10 nm (verde), 1nm (magenta), 0.05nM (azul) y 0.1nM (rojo) usando un ajuste global. b) Muestra los residuales del ajuste global entre el modelo y los sensogramas obtenidos

Datos obtenidos del ajuste global

Tabla 12

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F1	3.6e3	8.2e-3	4.4e5	2.6e-6	0.81

Fracción F1 contra melitina; ajuste disociación

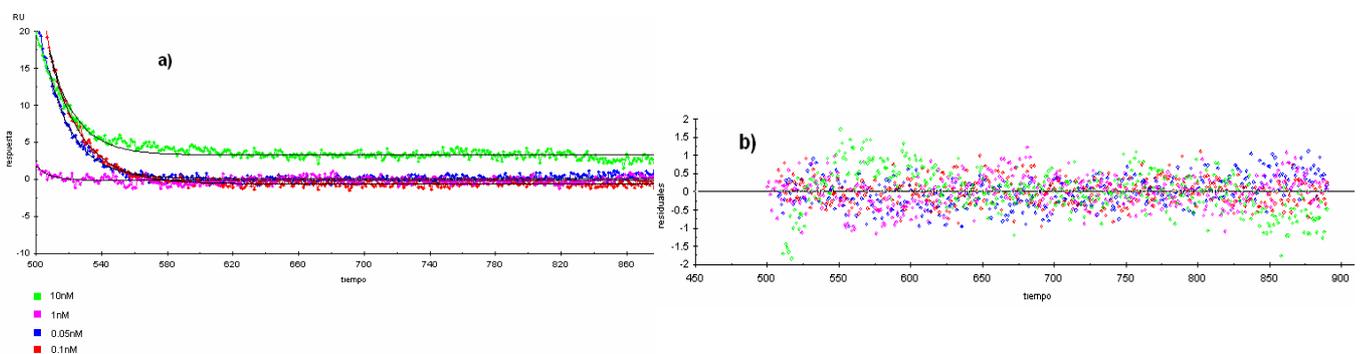


Fig.23 Cinética F1 contra melitina. a) Se muestra el ajuste del periodo de disociación entre las interacción de la fracción F1 contra melitina a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales entre el modelo de ajuste y los sensoqramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.

Tabla 13

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
F1	6.3e-3	0.23

### Fracción F1 contra melitina; ajuste asociación

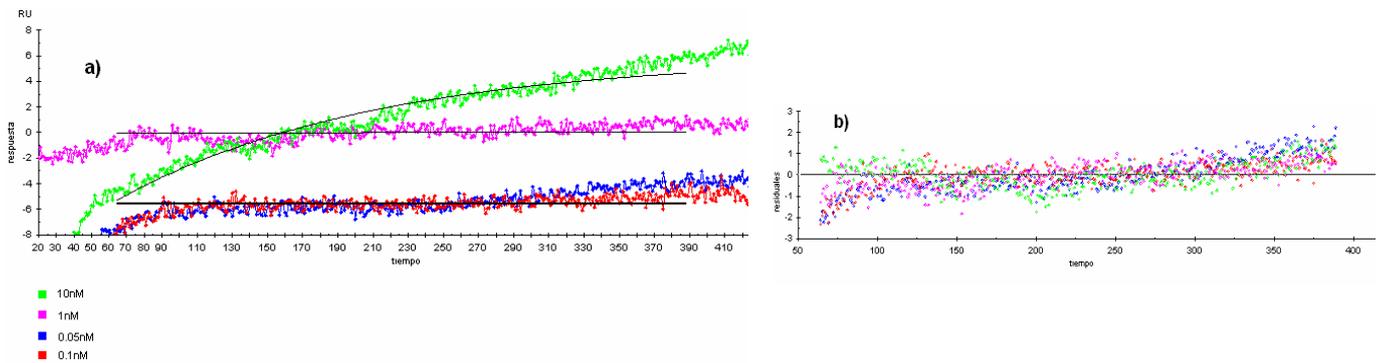


Fig.24 Cinética F1 contra melitina. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre las interacción de la fracción F1 contra melitina a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales entre el modelo de ajuste y los sensoqramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación.

Tabla 14

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F1	5e4	6.3e-3	7.9e6	1.3e-7	0.45

### Fracción F2 contra melitina; ajuste global Langmuir 1:1.

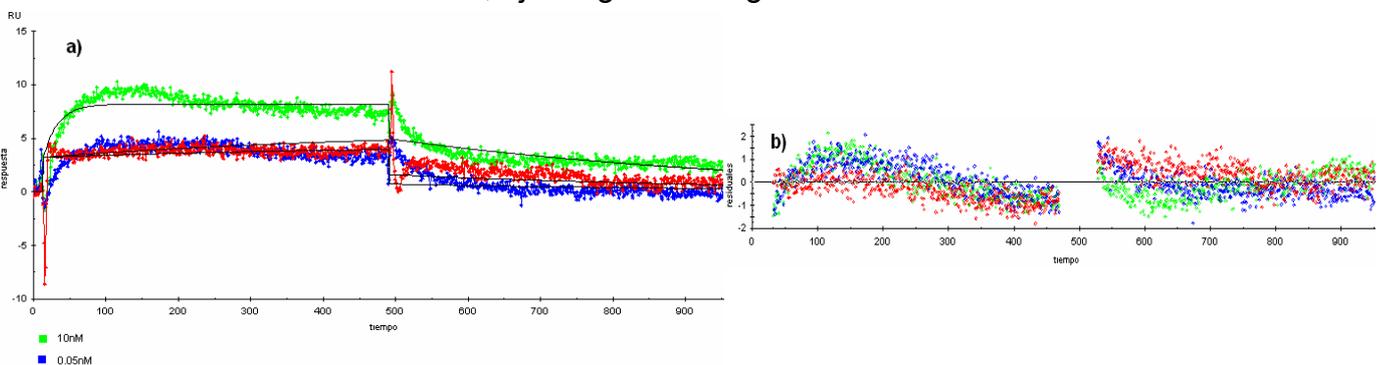


Fig.25 Cinética F2 contra melitina. a) Los sensogramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra melitina a diferentes concentraciones 10 nM (verde), 1nM (magenta), 0.05nM (azul) y 0.1nM (roja) usando un ajuste global. b) Se muestran los residuales, entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste global.

Tabla 15

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F2	9.6e6	1.9e-3	4.9e-9	2e-10	0.44

Fracción F2 contra melitina ajuste; disociación.

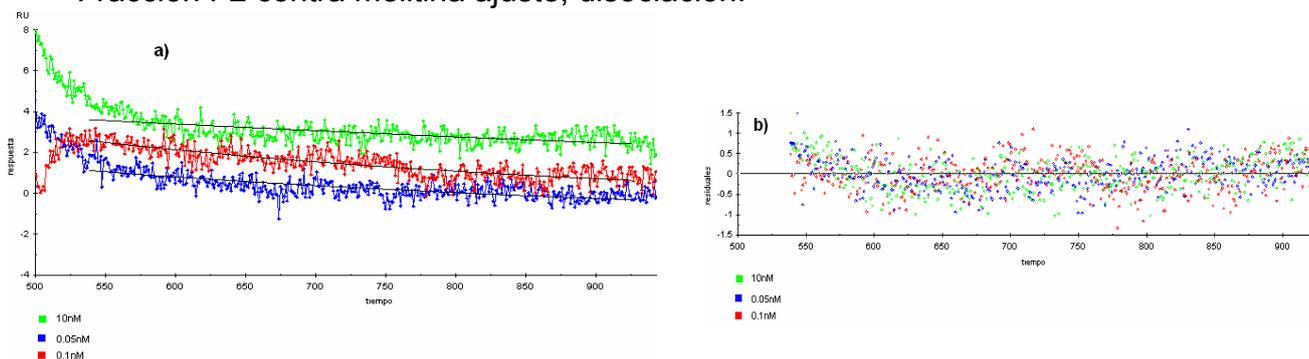


Fig.26 Cinética F2 contra melitina. a) Se muestra el ajuste del periodo de disociación entre las interacción de la fracción F2 contra melitina a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.

Tabla 16

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
F2	2e-3	0.16

Fracción F2 contra melitina; ajuste asociación.

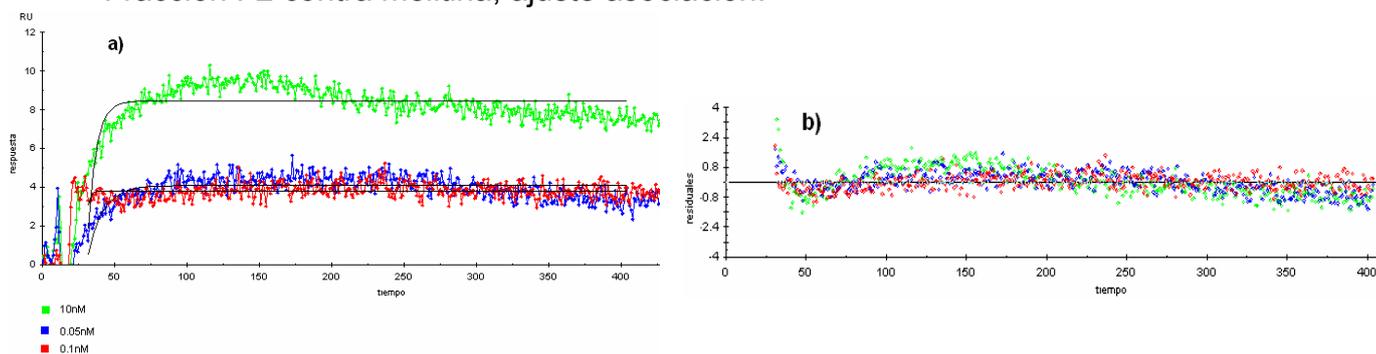


Fig.27 Cinética F2 contra melitina. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre las interacción de la fracción F2 contra melitina a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación.

Tabla 17

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F2	1e7	2e-3	5.3e9	1.9e-10	2.8

Fracción P1 contra melitina; ajuste global Langmuir 1:1.

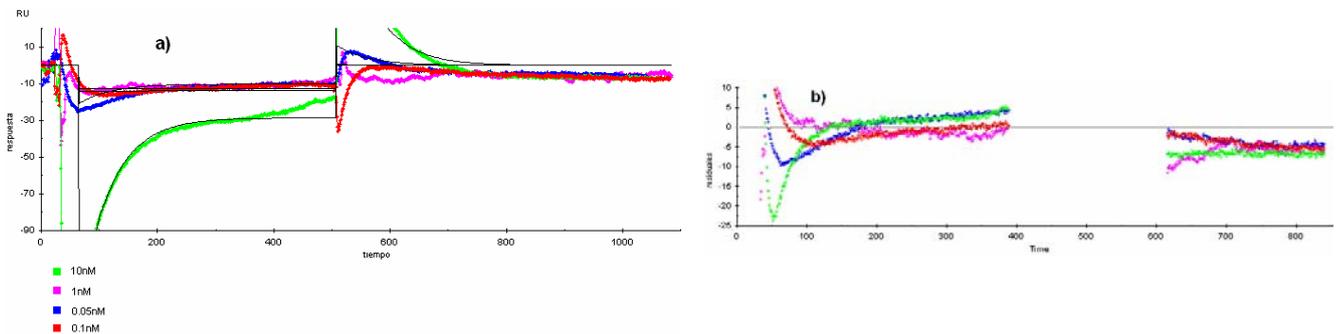


Fig. 28 Cinética fracción P1 contra melitina. a) Los sensogramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra melitina a concentración 10nM (verde), 1nM (magenta), 0.05nM (azul) y 0.1pM (roja), observe que los sensogramas se encuentran a nivel de la línea base. b) Se muestran los residuales, entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste global.

Tabla 18

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
P1	5.3e3	1e-3	2.8e5	3.6e-6	12

Fracción P1 contra melitina; ajuste disociación.

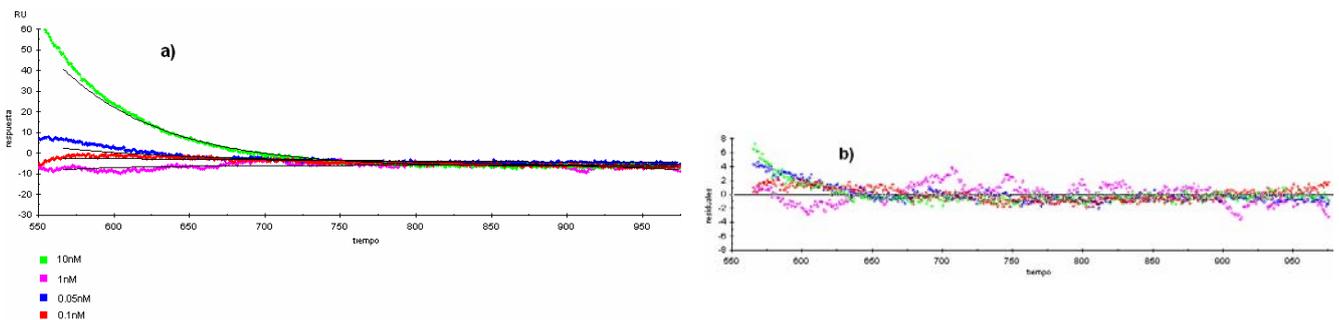


Fig. 29 Cinética P1 contra melitina. a) Se muestra el ajuste del periodo de disociación entre las interacción de la fracción P1 contra melitina a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.  
Tabla 19

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
P1	1e-3	1.5

Fracción P1 contra melitina; ajuste asociación.

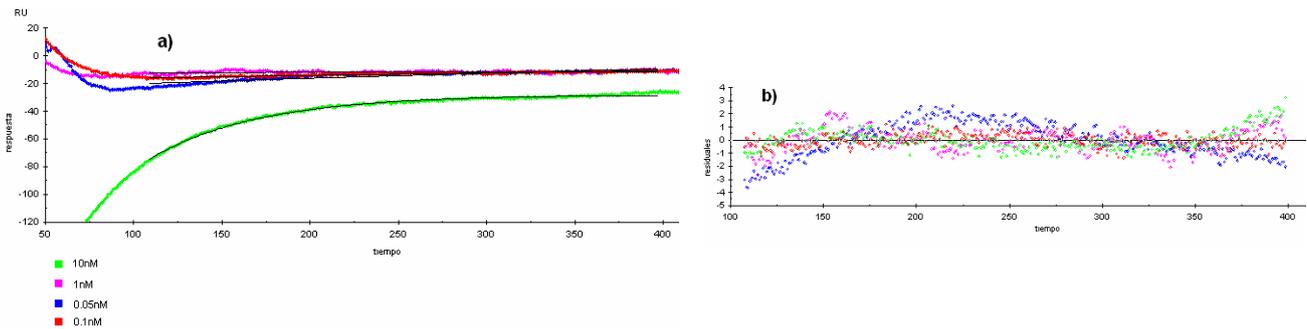


Fig.30 Cinética P1 contra melitina. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre las interacción de la fracción P1 contra melitina a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación.  
Tabla 20

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
	1.5e6	1e-3	1.5e9	6.6e-10	0.85

Fracción P2 contra melitina.

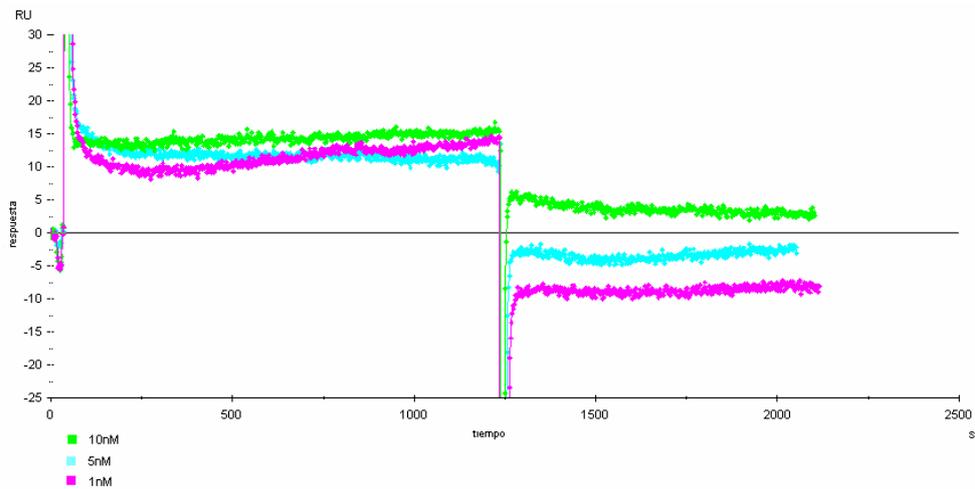


Fig.31 Cinética fracción P2 contra melitina. Se muestra la interacción entre la fracción P2 contra melitina, a diferentes concentraciones, 1 nM (magenta), 5 nM (esmeralda), 10 nM (verde).

### Cinética péptido.

Se realizaron las cinéticas con las fracciones F1, F2, P1 y P2 contra el péptido y se obtuvieron las siguientes graficas y valores. Los sensogramas muestran la relación entre unidades de resonancia (RU) y tiempo (s). Los residuales muestran la diferencia entre los datos obtenidos y el modelo utilizado.

Fracción F1 contra péptido; ajuste global Langmuir 1:1.

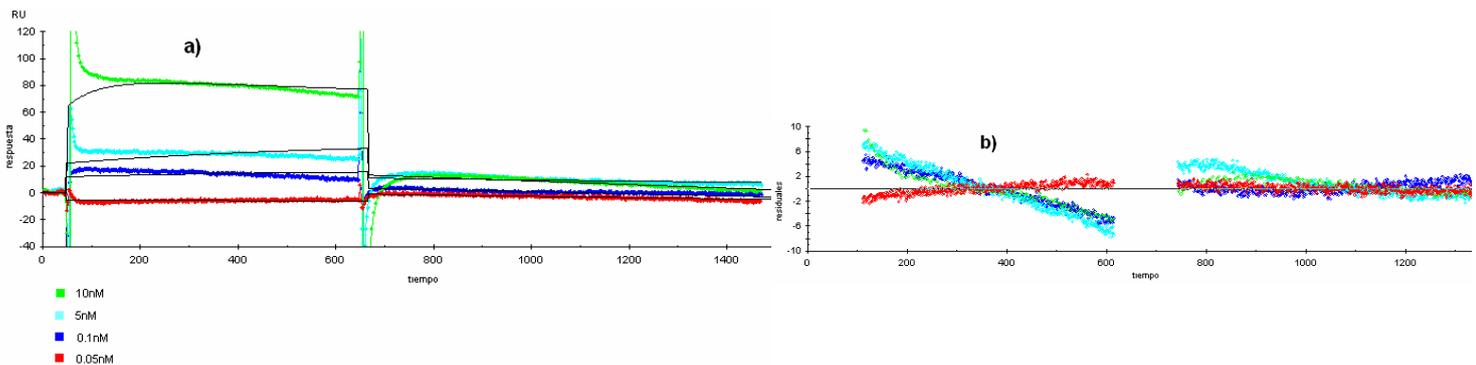


Fig.32 Cinética F1 contra péptido. a) Los sensogramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra péptido a diferentes concentraciones 10nM (verde), 5nM (esmeralda), 0.1nM (azul) y 0.05nM (rojo) usando un ajuste global. b) Se muestran los residuales, entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste global.

Tabla 21

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F1	1.6e5	2.6e-6	6.2e10	1.6e-10	4.7

### Fracción F1 contra péptido; ajuste disociación

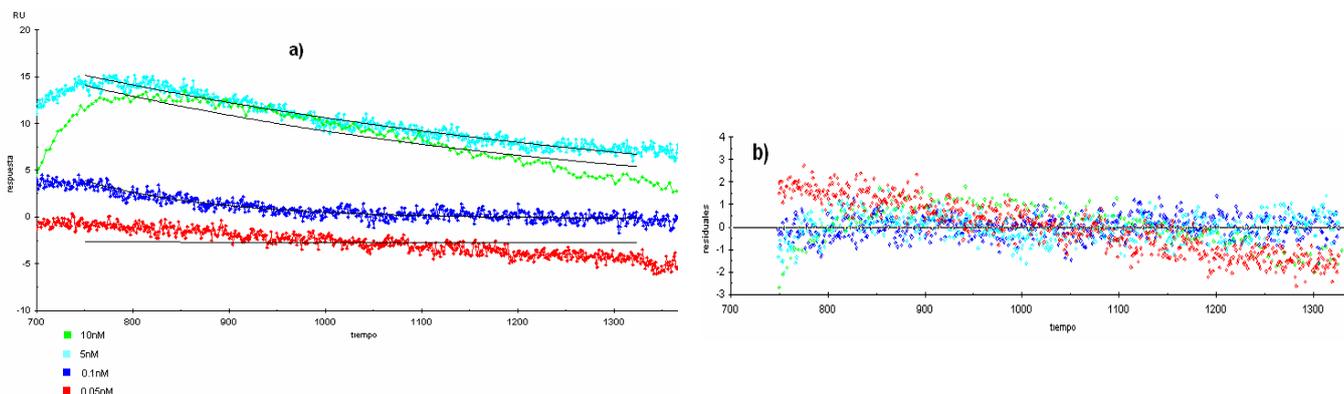


Fig. 33 Cinética F1 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de disociación entre las interacción de la fracción F1 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensoqramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.

Tabla 22

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
F1	5.2e-3	0.66

### Fracción F1 contra péptido; ajuste asociación

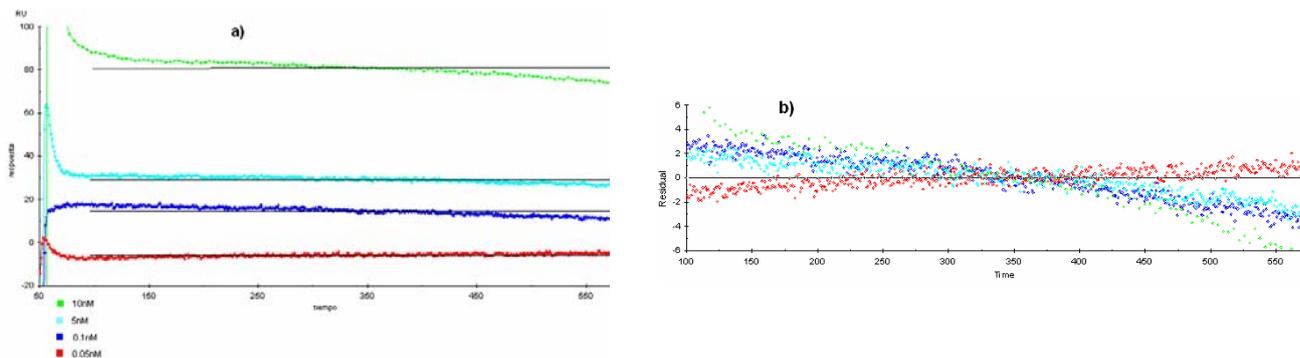


Fig.34 Cinética F1 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre las interacción de la fracción F1 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales, entre el modelo de ajuste y los sensoqramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación

Tabla 23

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F1	3.2e2	5.2-3	3.9e5	4.7e-6	2.7

Fracción F2 contra péptido; ajuste global Langmuir 1:1, con línea base oscilante.

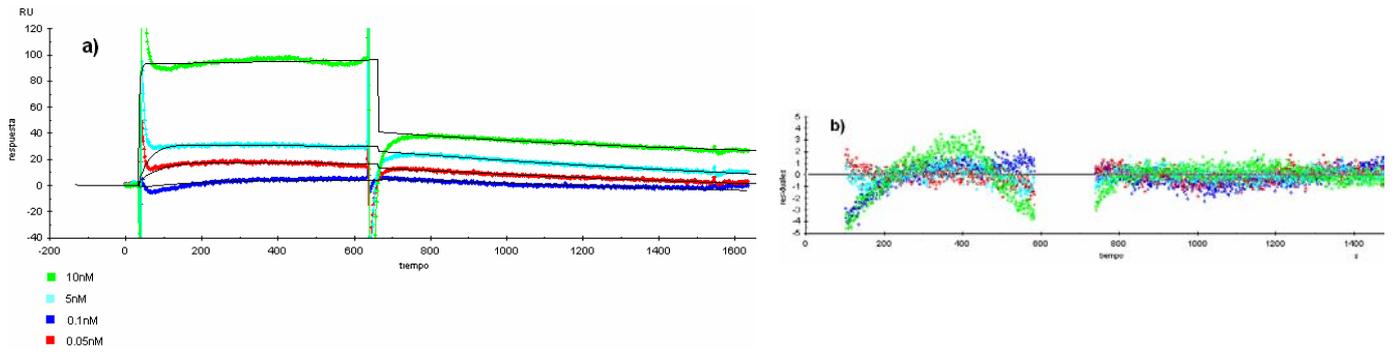


Fig.33 Cinética F2 contra péptido. a) Los sensorgramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra péptido a diferentes concentraciones 10 nM (verde), 5nM (esmeralda), 0.1nM (azul) y 0.05nM (rojo) usando un ajuste global. b) Se muestran los residuales entre el modelo de ajuste y los sensorgramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste global.

Tabla 24

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F2	3.4e6	7.2e-4	4.7e9	2.1e-10	0.9

Fracción F2 contra péptido; ajuste disociación

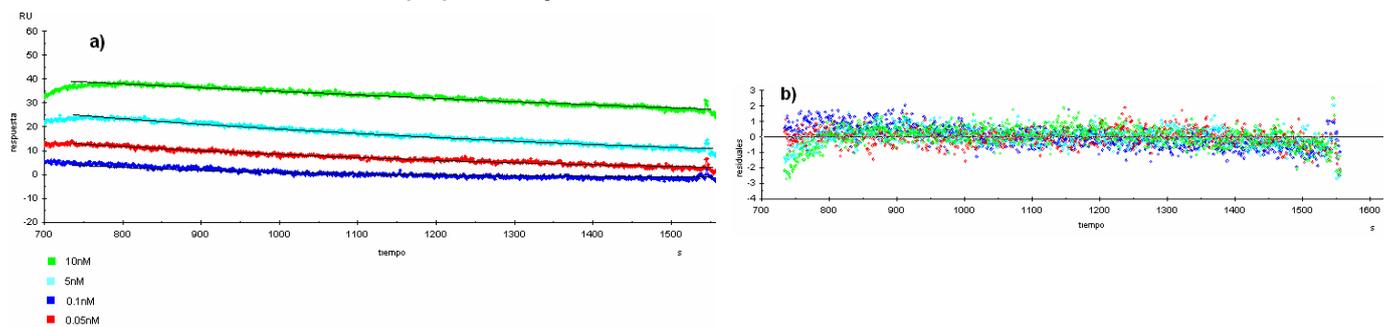


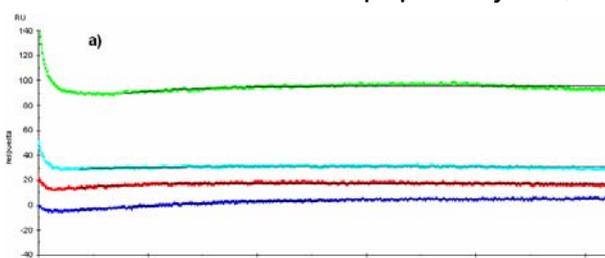
Fig. 34 Cinética F2 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de disociación entre las interacción de la fracción F2 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensorgramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.

Tabla 25

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
F2	3.6e-4	0.41

Fracción F2 contra péptido ajuste; asociación.



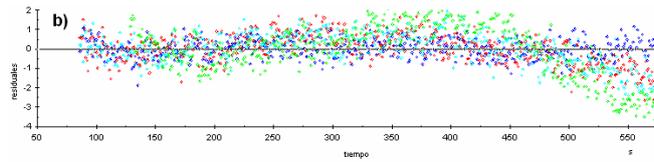


Fig.35 Cinética F2 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre las interacción de la fracción F2 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestran los residuales, entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación

Tabla 26

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
F2	7.5e6	3.6e-4	3.8e9	2.2e-10	0.83

Fracción P1 contra péptido; ajuste global Langmuir 1:1.

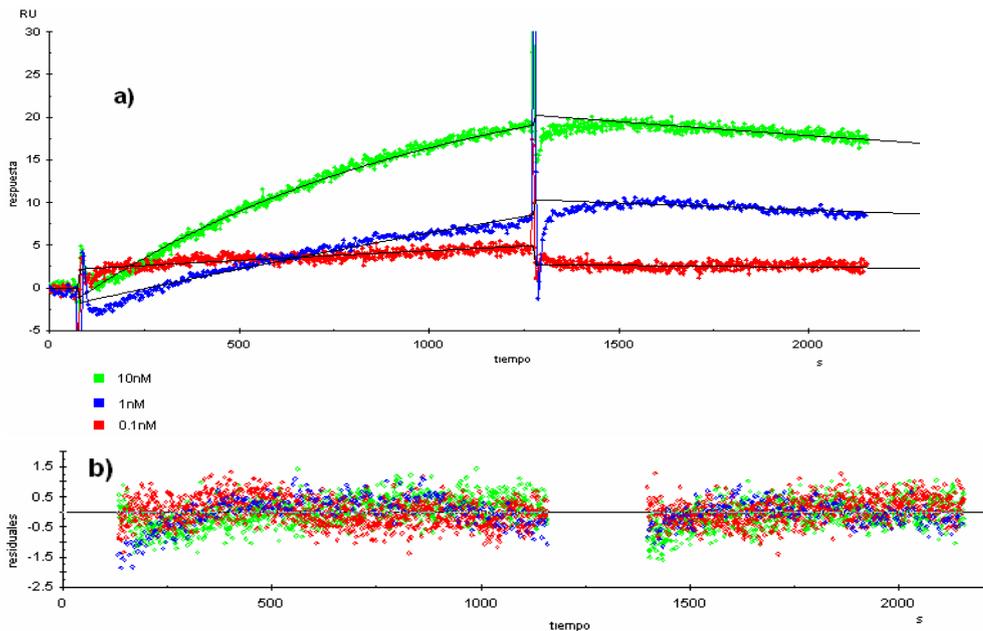


Fig.36 Cinética P1 contra péptido. a) Los sensogramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra péptido a diferentes concentraciones 10nM (verde), 1nM (azul), 0.1nM (rojo), usando un ajuste global. b) Se muestran los residuales, entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste global.

Tabla 27

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
P1	8.9e4	1.7e-4	5.1e8	2e-9	0.2

Fracción P1 contra péptido; ajuste disociación.

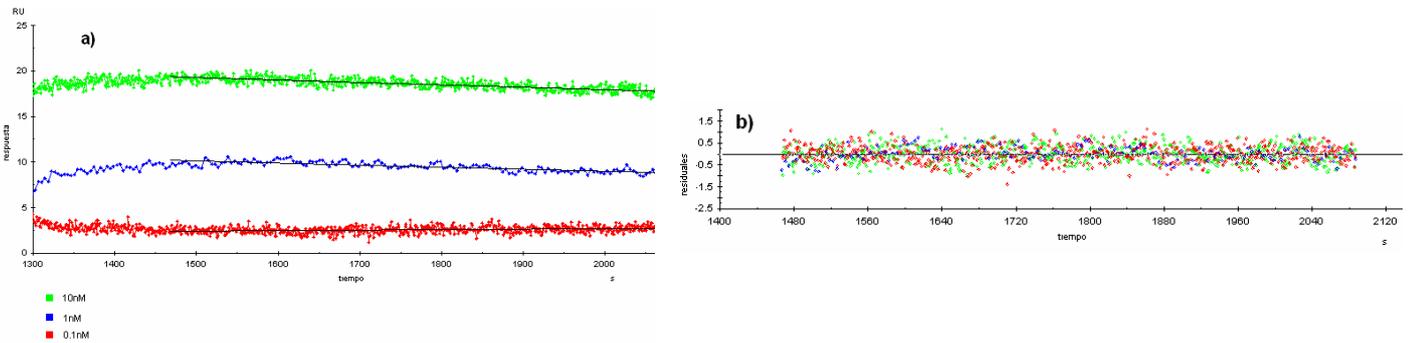


Fig. 37 Cinética P1 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de disociación entre la interacción de la fracción P1 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensoqramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.

Tabla 28

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
P1	1.4e-4	0.14

Fracción P1 contra péptido; ajuste asociación

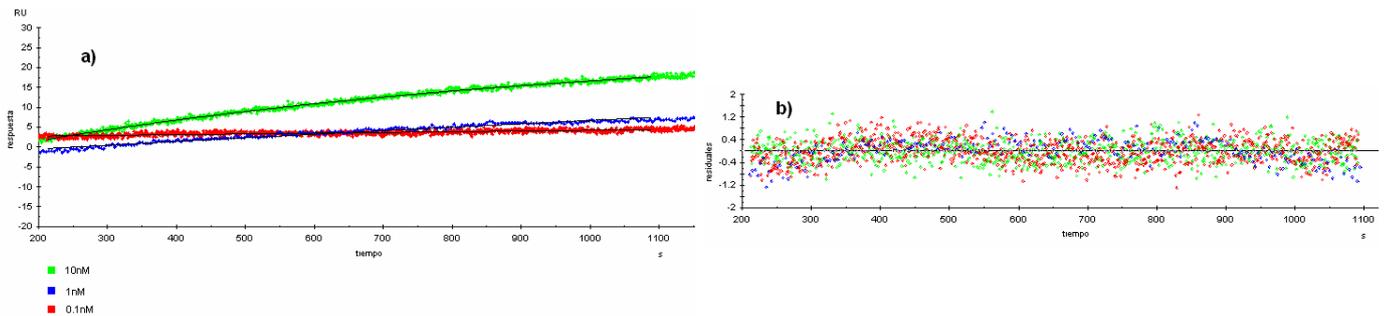


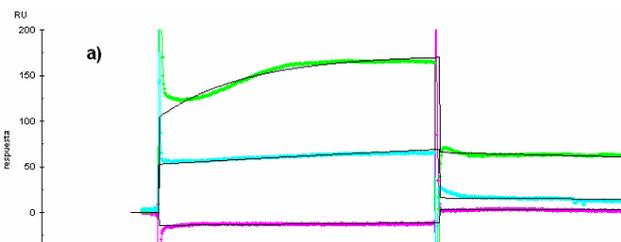
Fig.38 Cinética P1 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre la interacción de la fracción P1 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensoqramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación.

Tabla 29

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
P1	1.9e5	1.4e-4	1.9e9	5.2e-10	0.16

Fracción P2 contra péptido ajuste global Langmuir 1:1.



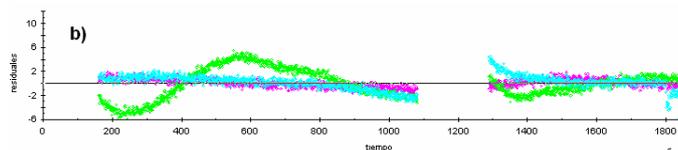


Fig.39 Cinética P2 contra péptido. a) Los Sensogramas muestran las interacciones entre los fago-anticuerpos contra péptido a diferentes concentraciones: 10nM (verde), 5nM (esmeralda), 1nM (magenta), usando un ajuste global Langmuir. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste global.

Tabla 30

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
P2	2.0e5	2.6e-5	2.6e9	2.2e-10	2

Fracción P2 contra péptido ajuste disociación.

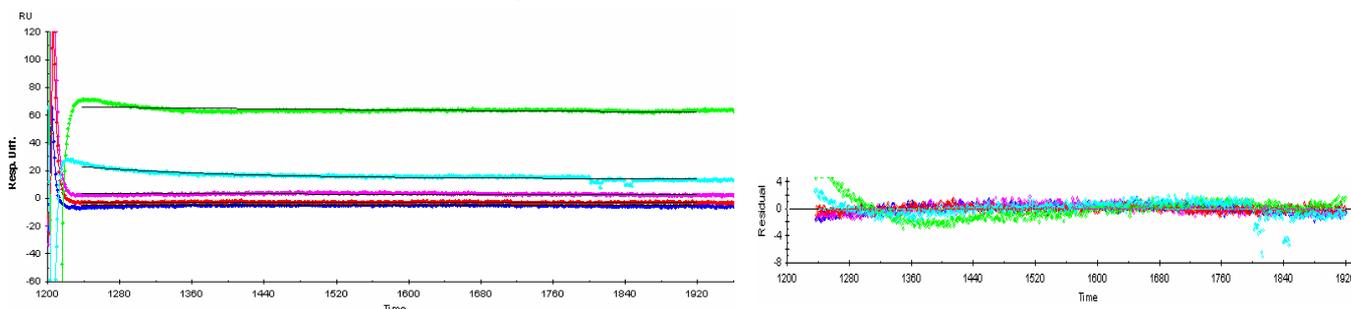


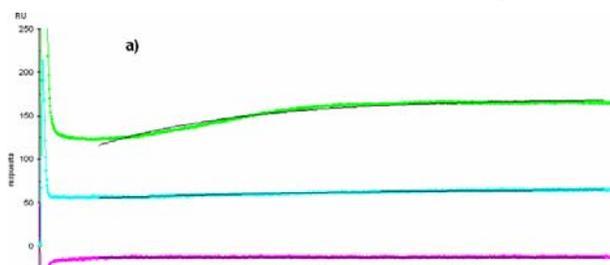
Fig.40 Cinética P2 contra péptido. a) Se muestra el ajuste Langmuir del periodo de asociación entre las interacción de la fracción P2 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de disociación.

Tabla 31

Analito	Kd (1/s)	Chi <sup>2</sup>
P1	2.4e-5	0.63

Fracción P2 contra péptido; ajuste asociación



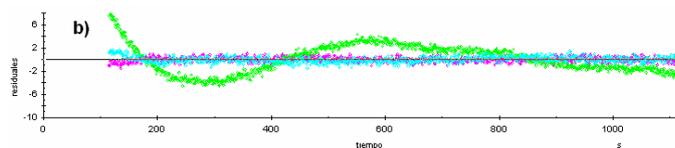


Fig.41 Cinética P2 contra péptido. a) Se muestra el ajuste del periodo de asociación entre las interacción de la fracción P2 contra péptido a diferentes concentraciones. b) Se muestra los residuales entre el modelo de ajuste y los sensogramas obtenidos.

Datos obtenidos del ajuste del periodo de asociación.

Tabla 32

Analito	Ka (1/M)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
P2	2.2e5	2.4e-5	2.7e10	2.2e-10	1.3

## Discusión

Durante la amplificación de un banco de fago anticuerpos híbridos (basados en fagemido), uno de los pasos más importante es la amplificación de el fago ayudador (*helper*). Es de gran importancia conocer los valores de titulación de fago ayudador, para mantener la relación, 1:20, durante la infección, ya que una mayor cantidad de fago ayudador, se ha observado, que mata a las células hospederas y una cantidad mucho menor disminuye la eficiencia de la amplificación del banco (Dra. Lidia Riaño, comunicación personal).

Se realizó la amplificación de fago-anticuerpos humanos con un número de variantes de  $1.1 \times 10^8$ . Esta librería estaba compuesta por fragmentos de anticuerpos variables de cadena sencilla, humanos no inmunizados. Una librería de este tipo puede ser fuente de anticuerpos con gran especificidad. Desafortunadamente este tipo de anticuerpos tienen baja afinidad<sup>48</sup>. Sin embargo es posible obtener anticuerpos de mayor afinidad cuando los bancos empleados son grandes. Esto se debe, que al existir una mayor variabilidad incrementa la probabilidad de seleccionar anticuerpos con las mejores características deseadas<sup>33</sup>.

La cantidad de fago anticuerpos, amplificados del banco, fue alta. Esto nos ayudara a mantener interactuando un mayor número de partículas de fago-anticuerpos, con la melitina, así como a la parte hidrofóbica de esta, y así poder seleccionar, anticuerpos que tengan un mejor reconocimiento contra estos antígenos en particular.

Dentro de las pruebas de preconcentración se observó que la mejor respuesta ocurre en soluciones con pH 7, es decir un mayor número de moléculas concentradas en la superficie, del biosensor por la diferencia de cargas entre los carboxilatos y la melitina. La repuesta a altas concentraciones mostró una saturación más rápida por lo tanto se eligieron estas para la inmovilización. Se utilizaron concentraciones de; 400  $\mu\text{g/ml}$  y 20  $\mu\text{g/ml}$  para selección y cinéticas respectivamente. Se eligió para la selección una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$ , estos para tener una mayor densidad de moléculas en el biosensor y reducir el pegado inespecífico o fago anticuerpos que reconozcan a la matriz de carboxilatos. La segunda inmovilización de

melitina, 20 µg/ml, se eligió para realizar cinéticas, esto para tener una menor densidad de moléculas en el biosensor y disminuir el fenómeno de avidéz y así obtener una mejor respuesta a bajas concentraciones.

Se logró inmovilizar 586 y 824 RU para 20 µg/ml y 400 µg/ml respectivamente equivalente a .586 y .824 ng/mm<sup>2</sup>. Equivalente a 3.55e<sup>5</sup> y 4.17e<sup>5</sup> moléculas por milímetro cuadrado en la superficie del biosensor.

Para la inmovilización del péptido, correspondiente a la parte hidrofóbica de la melitina, se eligió la concentración de 200 µg/ml, para selección y cinéticas, esto debido a que el péptido es pequeño, 14 residuos de aminoácidos, y la respuesta a bajas concentraciones sería mínima, por ende una concentración alta mantiene una buena respuesta, debido a su tamaño no existe ningún problema para mantener una buena densidad, suficiente para la selección y cinéticas.

Se logró inmovilizar 1001 RU de respuesta equivalentes a 1.001 ng/mm<sup>2</sup>; equivalente a 4.7e<sup>5</sup> moléculas por milímetro cuadrado.

Durante la selección la relación de fago-anticuerpos que reconocían específicamente a la región hidrofóbica de la melitina fue mucho menor en comparación con la melitina completa.

La selección se realizó por medio de la librería de fago-anticuerpos humanos. Se encontró que existe un mayor número de fago-anticuerpos que reconocen a la melitina que los que reconocen a la parte hidrofóbica, una diferencia de 300 RU, que equivale a .300ng/mm<sup>2</sup>, sin embargo, dentro de esta gran cantidad de fago-anticuerpos no se conoce cual es la región de la melitina, que sirve como sitio de anclaje al fago-anticuerpo además de mantener una baja afinidad por ésta, sin embargo el tener una menor cantidad de fago-anticuerpos que reconozcan la parte hidrofóbica de la melitina nos facilita la selección para anticuerpos específicos.

Se eligieron las dos últimas fracciones de cada selección, basándose en la astringencia de la regeneración, es decir con una concentración de hidróxido de sodio más alta, para poder romper la interacción entre el fago-anticuerpo y la melitina y el péptido, lo que nos sugiere que la afinidad por éstas es más alta. Estas fracciones fueron elegidas y unidas en pares, con el fin de ser caracterizadas cinéticamente, así como para tener una población más grande, ya que muchos de los fago-anticuerpos no expresan anticuerpos y el reconocimiento puede darse con las proteínas de la cubierta del fago.

Cada repetición, de la selección, fue seguida de la amplificación de fago-anticuerpos seleccionados y así poder mantener las variables seleccionadas, en proporciones suficientes para poder volver hacer rondas de selección, así como para realizar caracterizaciones cinéticas.

La caracterización de interacciones antígeno-anticuerpo se realiza mediante la determinación de su afinidad y sus velocidades cinéticas ( $k_a$  y  $k_d$ ).

La afinidad suele representarse mediante la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ), que describe la concentración necesaria de antígeno necesaria para ocupar los sitios de unión de la mitad de las moléculas de anticuerpos presentes en una solución de anticuerpos. Cuanto menor es la  $K_D$ , mayor es la afinidad de la interacción, puesto que se necesita una menor concentración de antígeno para ocupar los sitios de unión. Por el contrario la constante de asociación en equilibrio ( $K_A$ ), se describe como el inverso de la constante de disociación en equilibrio  $K_D$ . Es decir entre mayor se  $K_A$ , mayor es la afinidad de la interacción.

La caracterización de cada población de fago-anticuerpos radica en la aplicación de modelos de interacciones entre biomoléculas y en base a éstos tener un acercamiento a las constantes de afinidad de un anticuerpo.

Cada modelo evalúa;  $K_a$ ,  $K_d$ , obtenidas experimentalmente y calcula  $K_A$  y  $K_D$ , y con base al modelo y los resultados obtenidos, presenta estas constantes, dando un acercamiento para la comprensión de afinidad entre antígeno-anticuerpo. Es debido decir que cada modelo utiliza el estadístico de  $\chi^2$  para conocer la diferencia entre la relación del modelo utilizado y los datos experimentales, es decir un ajuste con  $\chi^2$  alta (mayores a 3), es menos acertado que uno con valores bajos (menores a 3). La diferencia entre los valores del modelo y los datos obtenidos son graficados en forma de residuales. Debido a los cambios bruscos en el índice de refracción en los experimentos, se tomó como 5 el valor máximo considerado como ruido.

Es importante mencionar que se tomaron los datos de los modelos que se sometieron al ajuste global, o en su caso, los que mantenían un valor de  $\chi^2$  más bajo.

Mediante las cinéticas realizadas se observó que las poblaciones de fago-anticuerpos mostraban comportamientos diferentes. Se encontró que la afinidad de la fracción F2,  $K_D 2e^{-10}$  M, en ajuste global, es mayor contra melitina, que la fracción F1,  $K_D 2.6e^{-6}$  M, en ajuste global, recordando que fue seleccionada con regeneración de mayor astringencia. Mientras que la fracción P1, seleccionada con el péptido mostró una  $K_D 3.6e^{-6}$  M, en ajuste global, pero el pegado fue menor, así como la velocidad de formación del complejo, con respecto a la fracción F1. Si consideramos que una  $K_D$ , alta debe ser superior a  $1e^{-7}$  la afinidad de F1 y P1 contra melitina no presentan alta especificidad.

En contraste la fracción P2 mostró muy poco reconocimiento, y en ocasiones nulo, contra melitina, que no es significativo para realizar un ajuste, aunado a un problema de cambio de índice de refracción muy alto, dificultando el ajuste.

La fracción F1,  $K_D 4.7e^{-7}$  M, en ajuste asociación y disociación por separado, contra el péptido mostró interacción contra el péptido, pero un modelo global no pudo ser ajustado con exactitud, es decir presentaba una  $\chi^2$  alta, aunado a que el pegado de los fago-anticuerpos fue muy poco por debajo de los 15 RU. Lo que sugiere que el reconocimiento de la fracción F1 contra el péptido no presentan alta especificidad. En cambio la afinidad de la fracción de F2,  $K_D 2.1e^{-10}$  M, ajuste global, contra el péptido fue mucho mayor, lo que nos sugiere que esta población reconoce el mismo sitio tanto en la melitina completa como en el péptido.

Las constantes de disociación en equilibrio muestran una afinidad nanomolar, aproximada de  $2 \times 10^{-9}$  M y  $2.2 \times 10^{-10}$  M para P1 y P2, respectivamente, contra el péptido, ambas en ajuste global.

Las fracciones P1 y P2 mostraron alta afinidad con el péptido, sin embargo el modelo con mejor ajuste fue con la fracción P1.

Las fracciones que mostraron las mejores  $K_D$  contra melitina y el péptido respectivamente fueron F2 y P1 respectivamente, por lo que se enfilan como fuertes candidatos para neutralizar a la melitina.

## **Conclusiones**

Se logró seleccionar fago-anticuerpos que reconocen a la melitina así como a la parte hidrofóbica de ésta, mediante resonancia de plasmones superficiales.

Se logró caracterizar cinéticamente cada fracción de fago-anticuerpos seleccionados, mediante resonancia de plasmones superficiales.

Se encontró que la fracción F2 reconoce a la melitina.

Tanto F1 como P1 no presentan especificidad por la melitina, por lo tanto baja afinidad por esta.

Se encontró que la fracción F2, P1 y P2 reconocen a la parte hidrofóbica de la melitina.

Tanto P1 como P2 tienen alta afinidad contra la parte hidrofóbica de la melitina.

La fracción F2 mostró la más alta afinidad contra melitina.

La fracción P2 mostró la más alta afinidad contra la parte hidrofóbica de la melitina.

## **Perspectivas**

La búsqueda de un anticuerpo monoclonal que sea capaz de neutralizar a la melitina, específicamente a la parte hidrofóbica de ésta, es un camino por recorrer. La selección dentro de una librería de fago-anticuerpos, es el primer paso dentro de este largo camino.

La caracterización de cada clona dentro de la diversidad de cada población seleccionada, así como, la capacidad de generar variantes a partir de una población, ya seleccionada, es el paso siguiente. Mediante rondas de mutación y selección, se pretende encontrar anticuerpos con altas afinidades y capaces de neutralizar a la melitina, por medio del reconocimiento de la parte hidrofóbica de esta. El paso consecutivo es la expresión de anticuerpos monoclonales, por medio de fagemido, capaces de inhibir a la melitina así como al veneno completo de abeja.



## REFERENCIAS:

1. Valderrama Hernández Rafael. 2003. Aspectos toxicológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. IATREIA. 16(3)
2. De Roodt A. R, Salomón O. D, Orduna T. A, Ortiz R. L, Solís P. y Alagón C. A. 2005. Envenenamiento por picaduras de abeja. Gac. Méd. Méx. 141 (3):215-222
3. Jones R. G., Corteling, R. L., To H. P., Bhogal G., Landon J. 1999 A novel fab-based antivenom from the treatment of mass bee attacks. Am. J. Trop. Med. Hyg. 6 (3): 361-366.
4. Guzmán N. E, Page R.E. 1994. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. Am Bee J 134: 101–106
5. Terwilliger C. T, Eisenberg D. 1982 The structure of melittin II. Interpretation of the structure. J. Biol. Chem. 257 (11): 6016-6022.
6. King P, Kochoumian L, Joslyn A. 1984 Melittin-specific monoclonal and polyclonal IgE and IgG<sub>1</sub> antibodies from mice. J. Immuno. 133 (5) : 2668-2673
7. Bechinger B. 1997. Structure and functions of channel forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. J Mem Biol. 156: 197-211.
8. Bazzo R, Tappin M, Pastore A, Harvey T, Carver J, Cambell D. 1988 The structure of melittin; A H-NMR study in methanol. Eur. J. Biochem. 173:139-146
9. Talbot J. Dufourcq J, de Bony J, Faucon J, Lussan C. 1979 Conformational change and self association of monomeric melittin. Febs letters 102 (1):191-193
10. Terwilliger C. T, Eisenberg D. 1982 The structure of melittin I. Structure determination and partial refinement. J. Biol. Chem. 257 (11): 6010-6015
11. Terwilliger C. T, Weissman L, Eisenberg D. 1982. The structure of melittin in the form I crystals and its implication for melittins` s lytic and surface activities J. Biophys. 37: 353-361
12. Brown L, Braun W, Kumar A, Wüthrich K.1982. High resolution nuclear magnetic resonance studies of the conformation and orientation of melittin bound to a lipid-water interface. J. Biophys. 37 (1): 319-328
13. Rivett D, Kirkpatrick A, Hewish D, Reilly W, Werkmeister A. 1996. Dimerization of truncated melittin analogues results in cytolytic peptides. Biochem. J. 316: 525-529.
14. Grazia S, Freer J, Colacicco G, Weissmann G. 1969. Interaction of lytic polypeptide, melittin, with lipid membrane systems. J. Biol. Chem. 244 (13): 3575-3582
15. Yang L, Harroum T, Weiss T, Ding L, Huang H. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. Biophys J.81: 1475-1485
16. Taylor O. R. 1986. Health problems associated with African bees. Ann. Intern. Med. 104: 267–268.
17. King T, Kochoumian L, Joslyn A. 1984. Melittin-specific monoclonal and polyclonal IgE and IgG antibodies from mice. Immuno. J. 133(5): 2668-2673
18. Fehlner P, Kochoumian, King T. 1991. Murine IgE and IgG responses to melittin and its analogs. Immuno J.146 (8): 2664-2670
19. Jones R, Corteling H, To H, Bhogal G, Landon J. 1999. A novel fab-based antivenom for the treatment of mass bee attacks. Am. J. Trop. Med. Hyg. 61(3): 361-366
20. William G. T. Willats, 2002. Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology 50: 837-854.
21. Kay K.B, Winter J, McCafferty J, 1996. Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual. Academi press. U.S.A.

22. Hoogenboom, H.R., de Bruïne A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J-W. and Roovers, R.C. 1998. Antibody phage display and its applications. *Immunotechnology* 4: 1–20.
23. Sidhu, S.S. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol. Engin.* 18: 57–63.
24. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R.1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433–455
25. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*;348:552-554
26. Skerra A, Pluckthun A, 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240: 1038-1041.
27. Riaño L, Juárez R, Olamendi T, Ortíz M, Possani L, Becerril B. 2005. A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom. *FEBS J.* 272: 2591-2601
28. Hoogenboom R. H, Griffiths D. A, Johnson S. K, Chiswell J. D, Hudson P, Winter G. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acid Research*; 19(15): 4133-4137
29. Brinkmann U, Chowdhury PS, Roscoe DM, Pastan I. Phage display of disulfide-stabilized Fv fragment. *J. Immunol Methods.* 1995; 182(1):41-50
30. Clackson T, Hoogenboom R. H, Griffiths D. A, Winter G, 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*;352:624-628
31. Marks D. J, Hoogenboom R. H, Bonnert, McCafferty J, Griffiths D. A, Winter G, 1991. By-passing immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J.Mol.Biol*;222:581-597
32. Klein U, Küppers R, Rajewsky K, 1997. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B-cells in humans. *Blood*;89:1288-1298.
33. Vaughan J. T, Williams J. A, Pritchard K, Osbourn K. J, Pope R, Earnshaw C. J, McCafferty J, Hodits A. R, Wilton J, S. Johnson S.K. 1996. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nature Biotechnol*;14:309-314
34. Griffiths A.D, Williams S.C, Hartley O, Tomlinson I.M, Waterhouse P, Crosby W.L, Kontermann R, Jones P.T, Low N.M, Allison T.J, Prospero T.D, Hoogenboom H.R, Nissim A, Cox J.P.L, Harrison J.L, Zaccolo M, Gherardi E, Winter G.1994 Isolation of high affinity antibodies directly from large synthetic repertoires. *J.EMBO*; 13:3245–3260.
35. Rodi, D.J. and Makowski, L. 1999. Phage-display technology—finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 87–93.
36. Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. and Dübel, S. 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature Biotechnol.* 19: 75–78.
37. Lehninger A. L, Nelson D. L, Cox M.M. 2000, Principles of biochemistry. (3<sup>a</sup> ed). Worth Publishers Inc. New York.
38. Rich I. R, Myszka G. D. 2000. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr. Opin. Biotechnol*;11: 54-61.
39. Malmqvist M. 1999. BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem. Soc. Trans*; 27 :335-340

40. BIACORE. 2002-1. An introduction to Biacore`s SPR technology. Technology notes.
41. BIACORE. 2002-2. Surface plasmon resonance. Technology notes.
42. BIACORE.1996. BIAsimulation. software handbook. Suecia.
43. Myszka G. D, 2000. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods in Enzymologic*; 323: 325-340.
44. BIACORE.1997-1.Getting started BICORE<sup>®</sup> X. Suecia
45. BIACORE.1997-2. BIACORE<sup>®</sup> X.Instrument handbook. Suecia
46. BIACORE.1998. BIAApplications handbook. Suecia
47. BIACORE. 1999. BIAevaluation version 3. Software handbook. Suecia.
48. Riaño Umbarila L. 2005. Aislamiento y caracterización de anticuerpos humanos contra la toxina Cn2 del veneno del alacran *Centruroides noxius* a partir de una biblioteca de despliegue de scFvc. Tesis de doctorado, Intituto de biotecnologia, UNAM
49. Leippe, M. Ebel, S. Schoenberger, L. Horstmann, R. Muller-Eberhard, J. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytic*. *PNAS*; 88: 7659-7663.
50. Qui, W. Zhang, L. Kao, Y. Lu, W. Li, T. Kim, J. Sollenberg, M. Wang, L. Zhong, D. 2005. Ultrafast hydration dynamics in melittin folding and aggregation: helix formation and tetramer self-assembly. *Phys. Chem. J.* 109: 16901-16910.
51. Glättli, A. Chandrasekhar, I. Van Gunsteren, W. 2006. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in phospholipid bilayer. *Eur. Biophys. J.* 35: 255-267.
52. Talbot, J. Dufourcq, J. de Bony, J. Faucon, F. Lussan, C. 1979. The surface properties of melittin include its ability to form surface monolayers at water-air interfaces, dramatically lowering the sueface tension of water, and to penetrate lipid surface monolayers. *FEBS letters.* 102 (1): 336-341
53. Lam, H. Wassall, S. Morton, C. Smith, R. Separovic F. 2001. Solid-state NMR structure determination of melittin in a lipid environment. *Biophys. J.* 81: 2752-2761
54. Nabil, Z. Hussein, A. Zalat, S. Rakha, M. 1998. Mechanism of action of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom on different types of muscles. *Hum. Exp. Toxicol*; 17: 185-190.
55. Säfsten P, Klakamp S.L, Drake A.W, Karlsson R, Myszka D.G. 2006.Screening antibody–antigen interactions in parallel using Biacore A100 *Analytic biochemistry*;353:181-190
56. Adamczyk M, Moore J. A, Yu Z. 2000. Application of surface plasmon resonance toward studies of low-molecular-weight-antigen-antibody interactions. *Methods*; 20: 319-328.
57. Homola J. 2003. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem*; 377: 528-539.
58. Fivash M, Towler M. E, Fisher R. 1998. BIAcore for macromolecular interaction. *Curr. Opin. Biotechnol*; 9: 97-101.
59. Malmborg A. C, Dueñas M, Ohlin M, Söderlind E, Borrebaeck C. A. 1996. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. *J. Immunol Meth*; 198: 51-57.
60. Better M, Chang C. P, Robinson R. R, Horwitz A. H, 1988. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science*;240: 1041-1043.

61. Guzman-Novoa E, Page RE, 1994. The impact of Africanized bees on Mexican beekeeping. *Am Bee J* 134 (suppl 2): 101–106.
62. Guidolin M, Stephano M, Marcelino M, Yamaguchi I, Sakaguchi, E, 1997. Production of equine antivenom against africanized bee (*Apis mellifera*) venom. *Venom. Anim. Toxin J.* 3:245-254
63. Maques A, Fujii A, Verceze A, Arantes M, Soares A, Higashi. 1997. Anti-bee venom serum: preliminary test. *Venoms Anim Toxin J.* 3:236-244
64. <http://www.scripps.edu/cgi-bin/cdputnam/protcalc3>
65. <http://www.nihilnovus.com/servlet/FileRead3>

## Índice de figuras.

1. Leippe, M. Ebel, S. Schoenberger, L. Horstmann, R. Muller-Eberhard, J. 1991. Pore-forming peptide of pathogenic Entamoeba histolytic. PNAS; 88: 7659-7663.
2. Terwilliger C. T, Eisenberg D. 1982 The structure of melittin II. Interpretation of the structure. J. Biol. Chem. 257 (11): 6016-6022.
- 3a. Yang L, Harroum T, Weiss T, Ding L, Huang H. 2001. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. Biophys J.81: 1475-1485.
- 3b. Glättli, A. Chandrasekhar, I. Van Gunsteren, W. 2006. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in phospholipid bilayer. Eur. Biophys. J. 35: 255-267
4. William G. T. Willats, 2002. Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology 50: 837-854
- 5a. <http://wine1.sb.fsu.edu/bch5425/lect33/lect33.htm>
- 5b. Sidhu, S.S. 2001. Engineering M13 for phage display. Biomol. Engin. 18: 57-63.
6. William G. T. Willats, 2002. Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology 50: 837-854
7. <http://www.genpromag.com/ShowPR>.
8. William G. T. Willats, 2002. Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology 50: 837-854
9. BIACORE. 2002-1. An introduction to Biacore`s SPR technology. Technology notes.
10. BIACORE. 2002-1. An introduction to Biacore`s SPR technology. Technology notes.
11. BIACORE. 2002-2. Surface plasmon resonance. Technology notes.
- 12-15. BIACORE. 2002-1. An introduction to Biacore`s SPR technology. Technology notes.
- 16-41. Biacore evaluation version 3.2

## Acrónimos

Ag: plata, elemento químico  
Amp: ampicilina  
Au: oro, elemento químico  
C: centígrados, unidad de temperatura  
CDR: en anticuerpos sitio de combinación de antígeno  
Cu: cobre, elemento químico  
Da: daltones  
DO: densidad óptica  
Gr: gramos unidad de masa  
IgG: inmunoglobulina tipo G  
IgE: inmunoglobulina tipo E  
 $K_{eqA}$ : constante de asociación en equilibrio  
 $K_{eqD}$ : constante de disociación en equilibrio  
Kg: kilogramos, unidad de masa  
Km: kanamicina  
 $k_{off}$ : velocidad de disociación  
 $k_{on}$ : velocidad de asociación  
l: litros, unidad de volumen  
LD 50: dosis letal media  
M: molar, unidad de concentración  
mM: milimolar, unidad de concentración  
mm: milímetro, unidad de área  
mg: miligramos, unidad de masa  
min: minutos, unidad de tiempo  
NaCl: cloruro de sodio  
nM: nanomolar, unidad de concentración  
NMR: Resonancia magnética nuclear  
PCR reacción en cadena de la polimerasa  
PEG: polietilén glicol  
pg: picogramo, unidad de masa  
pH: logaritmo negativo de la concentración de iones hidronio  
pM: picomolar, unidad de concentración  
RU: unidad de resonancia  
 $\mu$ g: microgramos, unidad de masa  
 $V_H$ : región variable de la cadena pesada  
 $V_L$ : región variable de la cadena ligera