



POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



“Obtención y selección de fragmentos VNAR de anticuerpos de tiburón que tengan afinidad por el veneno de *Latrodectus mactans*”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGÍA MARINA)

P R E S E N T A:

Ing. Biot. María de los Ángeles Barrón García

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alexéi Fedórovish Licea Navarro

COMITÉ TUTORAL Y JURADO: Dr. Alejandro Alagón Cano

Dr. F. Alberto Abreu Grobois

Dr. Píndaro Díaz Jaimes

Dr. Manuel B. Aguilar Ramírez

Mazatlán, Sinaloa; agosto 2012



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.

© Queda prohibida la reproducción y uso total o parcial de la información contenida en este trabajo sin previa autorización del autor y del director de tesis.

## **DEDICATORIA**

Dedicado primeramente a un ser intangible, pero que gracias a mi fe en él, he llegado hasta aquí. Gracias **SEÑOR**.

Mi **MADRE**, Felipa García Escalera, que siempre me ha acompañado, gracias por tu amor incondicional, te admiro y respeto como a nadie, eres mi Mejor **AMIGA**.

Mi **FAMILIA** primera, de la que provengo (Padre: José Santiago Barrón Osuna, Hermanos: Chago, Mayra, Mariana), les debo mi educación, formación personal y académica, con altibajos, aquí seguimos, unidos por nuestro amor de familia. Mis amados sobrinos: Ángel Luis, Juanito, Cristal, Abraham, Haziél, y los que han de llegar.

A la Familia **ZÁRATE MONTES**, mi otra familia, Sra. Mary, Sr. Zárate, Paola, Grecia, Horacio, Tere, Charly, Chilo, sobrinos Kathe, Yael, Horacillo, y el que viene. Dios los bendiga, siempre serán recordados con profundo amor y agradecimiento.

**CARLOMAGNO**, por acompañarme en la mejor etapa de mi vida, mucho me has enseñado, de todo lo vivido, el mejor resultado: nuestro **HIJO** (Jacob Isaías). Dios dirá...pero en mi corazón siempre serás **PRINCIPIO** y **FIN**.

**AMIGOS**: Mi Chanequis, Chayito, Bianquita, Manita, sus familias que igualmente se han convertido en mi familia, Efrén, Carmen, Nacho, **VART**, aquellos que han llegado y ya no están cerca, pero que han marcado una huella en mi vida. Gracias por su **AMISTAD**, mis amigos de toda la vida.

Abue Tula, Abue Mary<sup>+</sup>, Abue Luis<sup>+</sup>, Tía Gloria, Tíos, primos, todos Uds los amo, y siempre están presentes en mis oraciones.

A mi prójimo.

A la naturaleza misma por brindarnos todos los recursos que necesitamos.

**HIJO MIO:**

Estas sencillas palabras salen desde lo más profundo de mi corazón. Cuando te das cuenta que no tienes a nadie más que a ti mismo, aprendes que lo tienes todo. Y ahora mi bebé, tú para mí lo eres TODO. Te amé desde el momento que supe que existías, y desde entonces me aferré a ti con todas mis fuerzas, me refugié en ti en los momentos de pesares, y fuiste mi apoyo y consuelo en mis tristezas, así como también fuiste mi seguridad para hacer frente al mundo. Te volviste mi esperanza, mi mayor ilusión, iluminaste mi vida, y fuiste motivo de mi alegría. Me acompañaste durante esta etapa. Por ti, principalmente, conseguí este logro, pero, mi mayor triunfo: TÚ.

Por ti seguiré adelante, por ti me siento invencible. Dios nos acompañe en nuestro camino juntos. Dios te bendiga siempre mi Amor.

**JACOB ISAÍAS:** eres mi mayor bendición, mi motor...TE AMO POR SIEMPRE VIDA MÍA.

## **AGRADECIMIENTO**

Cada persona que ha participado activamente en mi desarrollo personal y profesional.

CONACYT, por brindarme la oportunidad de avanzar un escalón más.

Mi primera experiencia en esta área y no pude haber tenido mejor guía que Ud. Dr. Alexéi F. Licea Navarro. Gracias por transmitirme la seguridad y confianza en mí misma, por no dejar de creer en mí, factor decisivo para finalizar; por permitirme ser parte de tan excelente grupo de trabajo. Fue excelente guía y amigo.

Comité jurado: Dres. Alagón, Abreu, Píndaro, Aguilar, que sin su apoyo y orientación no lo hubiera logrado. Son personas de mucha calidez humana, poco vista a este nivel.

Cuerpo académico UNAM: Mary, me encaminó y me dirigió en este rumbo; Magaly, sinónimo de calidad, amabilidad, servicio y humanidad; Mercedes, Michel, Samuel, no solo compañeros, también amigos; Clarita, no conozco persona más dedicada y eficiente en su servicio, afectuoso agradecimiento; personal de CU y de la unidad académica Mazatlán, gracias por hacerme parte de esta gran familia; así como compañeros y amigos: Raúl Lara\*, Ángela, Payan\*, Chinito, Bibian, Claudia, Perla, Jorge, Vallarta, Victor Muro, Syria, Yedid, César, Laura, Susana, Pedro y aquellos que se me escapan 😊; momentos tan agradables que me hicieron pasar, chistes, bromas, quedan grabados en mi corazón.

Personal y estudiantes de CICESE, gracias por el afectuoso recibimiento que me brindaron, pase momentos muy bonitos en compañía de Uds: Lili\*, Ada\*, Abraham\*, Erika\* y Beto\*, Viviana\*, Don Gilberius\*, Edna, Ira, Paola, Kathe, Oscar, Alex\*, Karlita\*, Karla, Sr. Eduardo, Andrea, Sami, Hanna, Oyuki, Felix\*, Pavel, Tanya, Yeni, David, Mayra, Mimi y Ricardo, Jayro, David, y los que se escapen 😊.

Familia de Culichi, Rojas Osuna y respectivos, les debo este logro más. Gracias de corazón.

Mis queridos profesores de cada etapa, que bajo su enseñanza he forjado mi formación.

“Levántate, resplandece, porque llega tu luz y la gloria del Señor brilla sobre ti”

Isaías 60:1...

## RESUMEN

*Latrodectus mactans* (Lm) es responsable de graves casos de envenenamiento en humanos, se han llegado a reportar hasta decenas de miles de accidentes por año en cada región. El veneno es altamente tóxico, puede ocasionar graves trastornos a nivel del sistema nervioso que pueden llevar a la muerte de la víctima, el agente causal es una neurotoxina llamada alfa-latrotoxina (alfa-LTX) que está presente en el veneno.

El objetivo principal de este trabajo fue obtener un dominio variable (V) de anticuerpos NAR (nuevo receptor de antígeno) de un tiburón *Heterodontus francisci* a partir de una biblioteca no inmune, para presentarlo como una nueva alternativa, más eficiente, de fácil producción y a menor costo, en el diagnóstico e incluso tratamiento contra el latrodectismo.

Obtuvimos tres VNAR (4-4, 4-12, 4-15), de los cuales, uno (4-4) presentó afinidad por el veneno de Lm, lo que se demostró por medio de un ELISA (ensayo inmunoenzimático). El potencial de neutralización de los VNAR se analizó mediante bioensayos.

**Palabras Clave:** Latrodectismo, alfa-LTX, VNAR.

## **ABSTRACT**

*Latrodectus mactans* is responsible for serious cases of poisoning in humans. There are reports of tens of thousands of accidents per year in each region. The venom is highly toxic, and it can cause serious disruption to the nervous system that can lead to death of the victim; the causal agent is a neurotoxin named alpha-latrotoxin (alpha-LTX) that is present in the venom.

The main objective of this work was to obtain a single variable domain (V) of NAR (new antigen receptor) antibody of *Heterodonthus francisci* shark from a nonimmune library, to be submitted as a new alternative, more efficient, easily produced at lower cost, in the diagnosis and even treatment to latrodectism.

We obtained three VNAR (4-4, 4-12, 4-15), from which, VNAR 4-4 showed affinity by the Lm venom, as demonstrated by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The neutralization potential of VNAR was analyzed by bioassays.

**Keywords:** Latrodectism, alpha-LTX, VNAR.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>2.1. Latrosectismo</b> .....	2
<b>2.2. Sistema inmune de los vertebrados</b> .....	5
<b>2.3. Inmunoglobulinas de tiburón</b> .....	6
<b>2.4. Aplicaciones clínicas de los anticuerpos de dominio sencillo de tiburón</b> ...	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3.1. Objetivo general</b> .....	16
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	16
<b>6. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	17
<b>6.1. Rondas de selección contra el veneno de Lm con biblioteca no inmune</b> ...	17
<b>6.2. Extracción del plásmido y secuenciación</b> .....	20
<b>6.3. Transformación en células BL21(D3)</b> .....	21
<b>6.4. Expresión y obtención de la proteína soluble</b> .....	21
<b>6.5. Ensayos ELISA</b> .....	21
<b>6.6 Ensayos de neutralización <i>in vivo</i> en ratones</b> .....	21
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	23
<b>7.1. Rondas de selección contra el veneno de Lm con biblioteca no inmune</b> ....	23
<b>7.2. Búsqueda de colonias positivas de las rondas 3 y 4</b> .....	25
<b>7.3. Extracción del plásmido y secuenciación</b> .....	26
<b>7.4. Transformación, expresión y extracción de los VNARs</b> .....	29
<b>7.5 Ensayo ELISA</b> .....	29
<b>7.6 Ensayos de neutralización <i>in vivo</i> en ratones</b> .....	31
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	34
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	35

<b>ANEXOS</b> .....	41
<b>ANEXO 1: Preparación de células electrocompetentes</b> .....	41
<b>ANEXO 2: Reamplificación de biblioteca</b> .....	43
<b>ANEXO 3: Rondas de bioselección</b> .....	44
<b>ANEXO 4: Electroforésis en gel de agarosa</b> .....	46
<b>ANEXO 5: Extracción de plásmido</b> .....	47
<b>ANEXO 6: Expresión del fragmento VNAR como proteína soluble y extracción periplásmica de la proteína</b> .....	48
<b>ANEXO 7: ELISA de expresión</b> .....	49
<b>ANEXO 8: ELISA de reconocimiento</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especie <i>Latrodectus mactans</i> comúnmente conocida como araña viuda negra.....	3
Figura 2. Estructuras de la $\alpha$ -LTX como monómero (a) y dímero (b).....	4
Figura 3. Mecanismo de acción de la $\alpha$ -LTX.....	5
Figura 4. Representación esquemática de la estructura completa de un anticuerpo común...	6
Figura 5. Esquema de la estructura de IgNAR.....	8
Figura 6. Faboterápicos.....	12
Figura 7. Rondas de selección dirigidas contra el veneno total de <i>Latrodectus mactans</i> .....	19
Figura 8. Resultados de los títulos de salida durante las rondas de selección dirigidas contra el veneno de <i>Latrodectus mactans</i> .....	25
Figura 9. Colonias reamplificadas reveladas en gel de agarosa al 1.5%.....	26
Figura 10. Secuencia de aminoácidos de los VNARs con sus sitios característicos.....	28
Figura 11. Resultado del ELISA de reconocimiento empleando el extracto crudo de los tres fragmentos VNAR recombinantes (4-4, 4-12, 4-15). ....	30

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro clínico que presentan los pacientes que sufren envenenamiento por <i>Latrodectus mactans</i> .....	3
Tabla 2. Cuantificación de la concentración de los plásmidos extraídos de las colonias positivas al inserto VNAR.....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

La elevada incidencia de ataques por animales ponzoñosos en humanos, que se refleja a nivel mundial, genera cuadros de envenenamiento desde leves hasta letales, por lo que se le ha considerado un serio problema de interés clínico. Las especies involucradas son principalmente algunos tipos de alacranes, serpientes y arañas.

Dentro del grupo de las arañas se encuentra el género *Latrodectus*, que incluye 30 especies conocidas hasta la actualidad, a las cuales se les denomina comúnmente arañas viuda negra (Garb et al., 2004). La especie *Latrodectus mactans* mantiene una extensa distribución en el mundo (Garb et al., 2004), siendo más recurrente en regiones con clima árido, templado y tropical, gracias a su gran capacidad de adaptación a condiciones cambiantes. La ocurrencia de latrodectismo (término asignado al cuadro de envenenamiento producido por *Latrodectus*) es muy elevada, ascendiendo hasta decenas de miles de accidentes por año en cada región (Forrester y Stanley, 2004), y aproximadamente 4 o 5 de cada mil que se registran resultan mortales (Hickman et al., 2002), por lo que aún cuando está asociado a baja mortalidad, su importancia radica en los efectos que produce el cuadro de envenenamiento (Isbister et al., 2008). En el pasado, los síntomas manifestados por latrodectismo se trataban con analgésicos debido a que no se contaba con un tratamiento específico; pero para el año 2000 se logró producir un antiveneno obtenido a partir del suero de animales (equinos) inmunizados; sin embargo, aunque este antiveneno soluciona rápidamente los síntomas, no todos los pacientes lo toleran, desarrollando reacciones adversas, siendo las más comunes las reacciones de hipersensibilidad tipo III, que resultan de la inyección de proteínas ajenas al organismo (Bugli et al., 2008).

Por lo tanto, en la búsqueda de fuentes alternativas para producir un antiveneno, aparecen los dominios variables de anticuerpos de tiburón tipo VNAR (variable domain of the shark new antigen receptor) o dominio variable de anticuerpos nuevos receptores de antígenos de tiburón (Wesolowski et al., 2009), con muchas ventajas como poder obtenerlos como proteínas recombinantes de alta especificidad mediante la tecnología de despliegue en fagos, además, se evita el sacrificio continuo de organismos, y propiedades como su tamaño pequeño, que facilita su rápida eliminación del organismo, evitando efectos secundarios adversos, convirtiéndolos en una posible herramienta para inmunoterapia (Wesolowski et al., 2009).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Latroductismo

En la especie *Latrodectus mactans* (Fig. 1) es la hembra el género asociado con el cuadro de envenenamiento en humanos; esta es fácilmente distinguible por presentar un color negro brillante, con un abdomen globuloso, en cuya parte ventral hay unas manchas color marrón que asemejan la forma de un reloj de arena, su tamaño es de aproximadamente 3 cm, y aunque no es una araña agresiva, ataca si se siente amenazada (Roques et al., 2007).

La incidencia de ataques por viuda negra es muy elevada. En Argentina (Borda et al., 2005; Roques et al., 2007), a través de un registro epidemiológico en el año 2001 se identificó que de 2,915 accidentes por mordedura de araña reportados, 2,500 (85.8%) correspondían al género *Latrodectus* (Roques et al., 2007). En lugares como Australia y Perú, el latroductismo representa el síndrome de envenenamiento más común (Parpura et al., 1995; Woll y López, 2003; Isbister et al., 2008). A partir de los datos de la red de los centros de intoxicaciones de Texas se identificaron 8,094 casos de mordedura de araña reportados durante 1998 a 2002, de los cuales, la araña viuda negra fue responsable en 775 casos (Forrester y Stanley, 2004). En México (Borda et al., 2005; Sotelo-Cruz et al., 2006), el Instituto Mexicano del Seguro Social presentó un informe en 1998 que registró 4,142 accidentes por mordedura de araña, y de 1998 a 2001, se reportaron 759 casos en las localidades de León, Guanajuato y Guadalajara, Jalisco (Sotelo-Cruz et al., 2006).

El veneno de *L. mactans* es altamente tóxico; una pequeña dosis puede ser mortal, afectando principalmente a infantes, adultos mayores y personas con problemas cardiovasculares. Cuando ocurre el ataque, además del dolor intenso que se produce por efecto del veneno, otros síntomas a nivel local y sistémico se manifiestan de manera exponencial conforme transcurre el tiempo (tabla 1), y en algunos casos la víctima puede llegar a morir por edema pulmonar o cerebral progresivo, o trastornos cardiovasculares (Quintana-Castillo y Otero-Patiño, 2002; Sotelo-Cruz et al., 2006).

El veneno se produce en glándulas secretoras que se encuentran en la región cefálica y están conectadas al aparato inoculador (los quelíceros). El veneno es una mezcla compleja que incluye elementos inorgánicos, ácidos libres, aminos, glucosa, neurotoxinas y otras proteínas (Escoubas et al., 2000; Ushkaryov et al., 2004; Belebony et al., 2004; Rohou y Ushkaryov, 2007). Las neurotoxinas presentes en el veneno, son una familia de latrotoxinas

selectivas para insectos (latoinsectotoxinas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), crustáceos ( $\alpha$ -latrocrustatoxina) y vertebrados ( $\alpha$ -latrotoxina) (Ushkaryov et al., 2004).



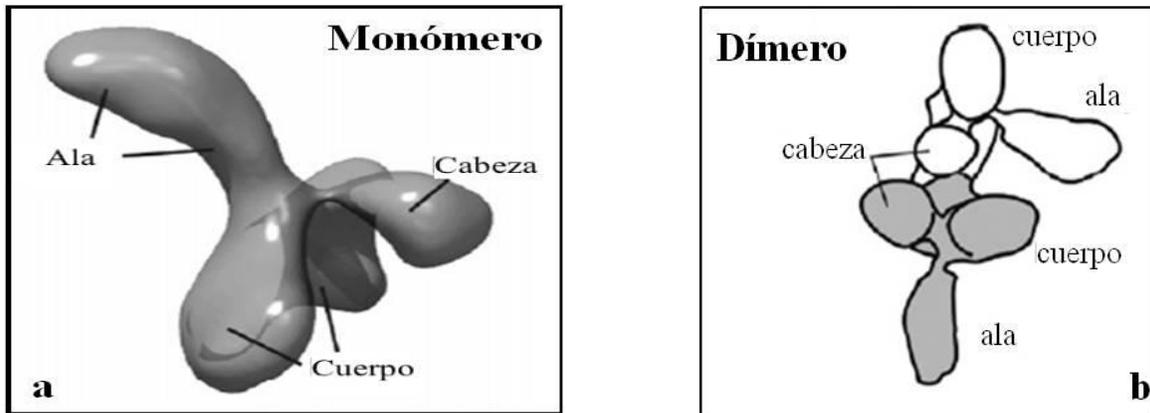
**Fig. 1.** Especie *Latrodectus mactans* comúnmente conocida como araña viuda negra. Es responsable de graves cuadros de envenenamiento en humanos.

Tabla 1. Cuadro clínico que presentan los pacientes que sufren envenenamiento por *Latrodectus mactans*.

	<b>Tiempo transcurrido</b>				
	<b>15 min-2 hrs</b>	<b>2-6 hrs</b>	<b>6-24 hrs</b>	<b>24-72 hrs</b>	
<b>Síntomas</b>	Dolor local	Lagrimo	Parestesias	Taquicardia	Rigidez muscular generalizada
	Eritema	Disnea	Ansiedad	Miosis/Midriasis	Hormigueo
	Prurito	Opresión torácica	Espasmos musculares	Nistagmo	Nerviosismo
	Transpiración	Cefalea	Dolor abdominal intenso	Trismus	Muerte
	Sialorrea	Priapismo	Temblores	Sensación de asfixia	
	Piloerección		Sudoración excesiva	Hipertensión	
	Calambres			Hiper glucemia	

La  $\alpha$ -latrotoxina ( $\alpha$ -LTX) (Fig. 2) es una proteína de 130 kDa (Kiyatkin et al., 1990), que se sintetiza en forma de monómero, cuya estructura se conforma de tres dominios principales (ala, cuerpo, cabeza) unidos consecutivamente. Aunque tiende a oligomerizarse en forma de dímero y tetrámero, es este último la forma biológicamente activa, es decir, la que es capaz de formar poros en la membrana presináptica de las células blanco (células neuronales y endocrinas) (Ushkaryov, 2002; Rohou y Ushkaryov, 2007). El tetrámero se inserta en la membrana de manera que los dominios del cuerpo penetran la bicapa lipídica y

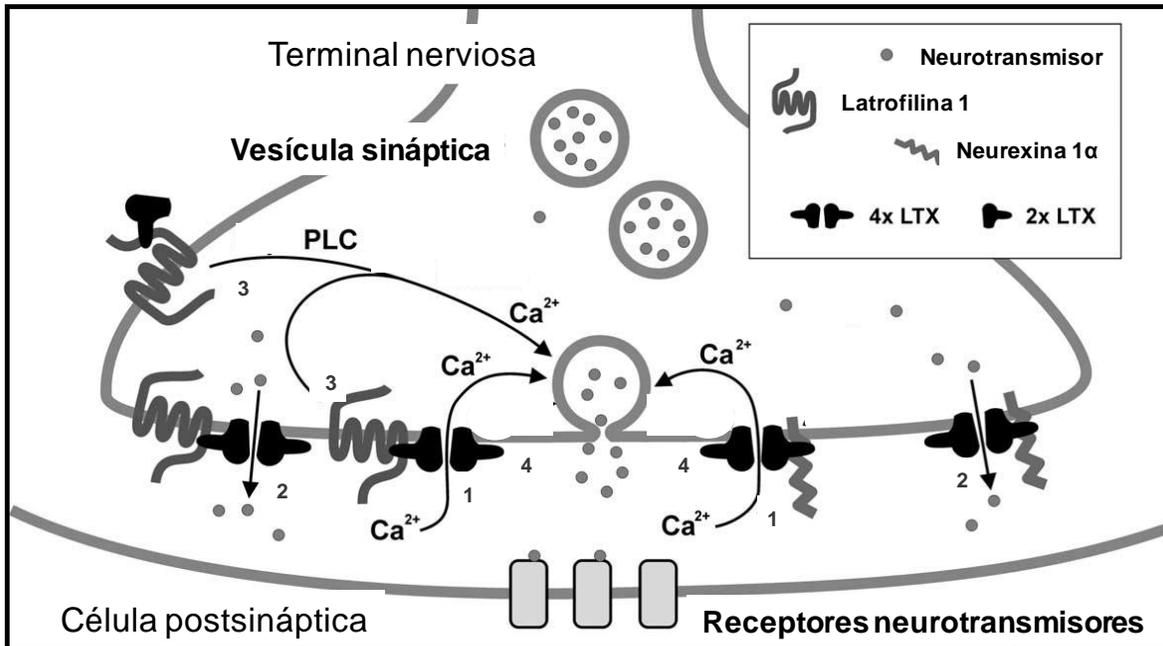
las cabezas se mantienen verticalmente alineadas a estos; en tanto que las alas descansan extendidas sobre la bicapa, ligeramente embebidas en la capa de cabezas lipídicas (Ushkaryov, 2002; Rohou y Ushkaryov, 2007).



**Fig. 2.** Estructuras de la  $\alpha$ -LTX como monómero (a) y dímero (b). Ambas estructuras presentan tres dominios principales: el ala, el cuerpo y la cabeza (Rohou et al., 2007).

La acción de la toxina (Fig. 3) se efectúa por dos mecanismos (uno dependiente y uno independiente de calcio), uniéndose a dos receptores diferentes presentes en la superficie de la membrana de las células blanco. El primero se inicia a partir de que la  $\alpha$ -LTX se une al receptor neurexina 1- $\alpha$  abriendo poros en la membrana de las células presinápticas, con lo que el  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular entra a las terminales presinápticas a través de estos poros y dirige la liberación de neurotransmisores (Ushkaryov et al., 2004). A su vez, la interacción  $\alpha$ -LTX-receptor y la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  incrementan la actividad catalítica de fosfolipasa C sensible a  $\text{Ca}^{+2}$  para generar inositol fosfatos (Kiyatkin et al., 1990; Hlubek et al., 2003) y movilizar  $\text{Ca}^{+2}$  de los almacenes intracelulares y, de ese modo, aumentar la respuesta secretoria; en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$ , la liberación de los neurotransmisores causada en la unión neuromuscular (NMJ) es mucho más alta que en ausencia de este (Hlubek et al., 2003). El segundo resulta de la señalización mediada por el receptor (latrofilina 1) para que la  $\alpha$ -LTX cause la liberación masiva de neurotransmisores de las vesículas presinápticas en neuronas (Ushkaryov et al., 2004). Lo anterior provoca la despolarización de la NMJ y el agotamiento de la acetilcolina, que resulta en el bloqueo de la transmisión nerviosa resultando en una parálisis muscular (Quintana-Castillo y Otero-Patiño, 2002; Sotelo-Cruz et al., 2006). Recientemente, un tercer receptor denominado proteína tirosina fosfatasa  $\sigma$  (PTP $\sigma$ ) se ha encontrado que se une a la  $\alpha$ -LTX de manera independiente de  $\text{Ca}^{+2}$ ; sin

embargo, parece representar un componente receptor menor, y su afinidad por la toxina no ha sido determinada (Ushkaryov et al., 2004).



**Fig. 3.** Mecanismo de acción de la  $\alpha$ -LTX. 1) Entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los poros formados por  $\alpha$ -LTX, después de su unión a CIRL o NRX. 2) Salida de neurotransmisores a través de los poros. 3) Señalización mediada por el receptor dependiente de  $Ca^{2+}$ , llevando a la liberación de  $Ca^{2+}$  citosólico. 4) Una interacción hipotéticamente directa de la  $\alpha$ -LTX con la maquinaria exocitótica (independiente de  $Ca^{2+}$ ) (modificado de Ushkaryov et al., 2004).

## 2.2 Sistema inmune de los vertebrados

La respuesta inmune de los vertebrados, clasificada en dos tipos: innata o natural y adaptativa o específica, proporciona un mecanismo de protección contra agentes nocivos (toxinas, microbios, etc.) denominados antígenos, que son reconocidos como extraños o ajenos al organismo.

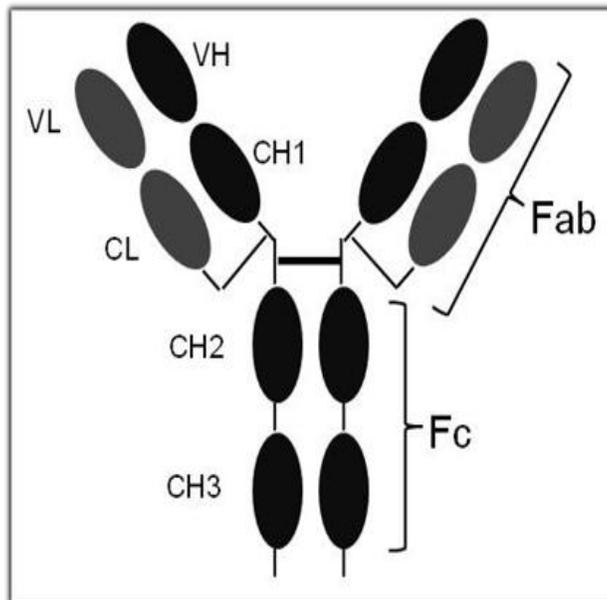
Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) forman parte de la respuesta inmune específica; estos son moléculas receptoras de los antígenos que tienen la capacidad de neutralizar sus efectos nocivos; pueden aparecer de dos formas: unidos a la membrana de los linfocitos B (células secretoras de anticuerpos) o secretados, residiendo en la circulación, los tejidos y las localizaciones mucosas (Abbas et al., 2008).

Existen inmunoglobulinas que se les conoce como anticuerpos comunes o convencionales debido a que cada molécula de anticuerpo tiene la misma estructura básica simétrica, pero muestran una cierta variabilidad en las regiones que se unen a los antígenos, mismas que les

confieren la característica de especificidad por diversos antígenos; ejemplos de estas son las denominadas IgA, IgD, IgE, IgG, IgM (Abbas et al., 2008).

Las inmunoglobulinas, generalmente constan de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), unidas por enlaces disulfuro; presentan forma en “Y” y se dividen en dos fracciones, una a cargo del reconocimiento y unión al antígeno (Fab) situada en ambos extremos superiores, y una fracción cristalizante (Fc) mediadora de las funciones efectoras del anticuerpo al interactuar con otras moléculas y células del sistema inmune (Fig. 4) (Holliger y Hudson, 2005; Machado et al., 2006; Abbas et al., 2008).

La fracción Fab se conforma de una región variable y otra conservada, la región variable tiene la capacidad de reconocer a una gran diversidad de antígenos gracias a las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3) altamente variables, mientras que la región conservada ayuda a estabilizar la reacción entre las CDRs con el antígeno (Machado et al., 2006; Abbas et al., 2008).



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura completa de un anticuerpo común. Anticuerpo compuesto de dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), que se ensamblan para formar la fracción cristalizante (Fc) y el fragmento de unión al antígeno (Fab); la cadena H tiene tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), y un dominio variable (VH); la cadena L tiene un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL); la región variable se conforma de un dominio variable ligero y un dominio variable pesado (VL y VH); la región constante se conforma de los tres dominios constantes pesados y el dominio constante ligero (CH1, CH2, CH3 y CL).

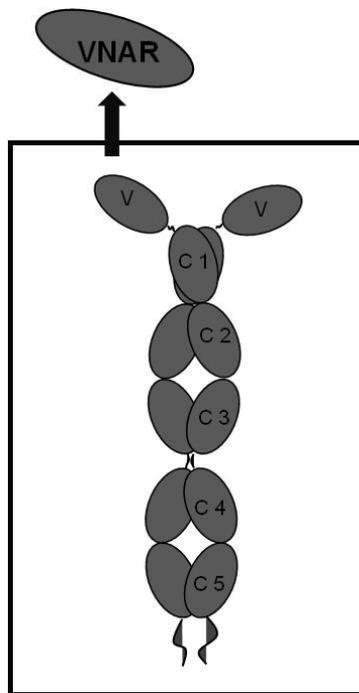
### 2.3. Inmunoglobulinas de tiburón

El origen evolutivo de las inmunoglobulinas es desconocido, pero el primer indicio de su aparición filogenética se encuentra en los peces cartilaginosos (Roux et al., 1998; Luer et

al., 2004). Está ampliamente visto que los miembros de la subclase de los elasmobranquios (tiburones y rayas) representan el grupo filogenético más antiguo que posee todos los componentes necesarios para un sistema inmune adaptativo; dentro de estos componentes están presentes las Igs. La primera Ig identificada en los elasmobranquios fue IgM, aislada inicialmente del tiburón cazón (*Mustelus canis*), y confirmada poco después en los tiburones limón (*Negaprion brevirostris*) y enfermera (*Ginglymostoma cirratum*), su existencia es en forma de pentámero, similar a la IgM de los mamíferos; también se han encontrado Igs monoméricas como la IgX (IgR), y la IgW (Luer et al., 2004); en base a lo anterior, se ha establecido que este grupo cuenta con un sistema inmune excesivamente complejo (Bernstein et al., 1996); revalidando este hecho, está el reciente descubrimiento de un nuevo tipo de inmunoglobulina denominada NAR (New Antigen Receptor, por sus siglas en inglés), aislada inicialmente del tiburón enfermera, esta Ig presenta una estructura bastante diferente respecto a las Igs comunes (Greenberg et al., 1993; Rumfelt et al., 2004; Rumfelt et al., 2004). Esta Ig que es secretada por los esplenocitos (células del bazo) (Roux et al., 1998) se encuentra en el suero de los tiburones como un homodímero de cadenas pesadas (H), donde cada cadena H tiene un dominio variable (V) soportado sobre cinco dominios constantes (C1, C2, C3, C4 y C5) (Fig. 5) (Bernstein et al., 1996; Roux et al., 1998; Diaz et al., 2002; Nuttall et al., 2003; Stanfield et al., 2004; Holliger y Hudson, 2005; Dooley et al., 2006).

Se han encontrado tres tipos de IgNARs, caracterizados por el tiempo de aparición en el desarrollo del tiburón, y por el número y la posición de los residuos de cisteínas no canónicas (no conservadas) presentes en los dominios variables (cisteínas generalmente no encontradas en las regiones variables de las Igs de los vertebrados), que pueden formar enlaces disulfuro para estabilizar la única unidad de reconocimiento del antígeno. IgNAR tipo I forma parte del repertorio de un tiburón adulto, y presenta dos o cuatro cisteínas en la CDR3, y dos cisteínas más en las secuencias altamente conservadas (“framework”, FR, por sus siglas en inglés) 2 y 4 (Roux et al., 1998; Nuttall et al., 2003; Streltsov et al., 2004; Stanfield et al., 2004; Cui-Ying et al., 2007), las dos cisteínas que codifican a la CDR3 forman enlaces disulfuro intrabucles con las dos cisteínas de las FRs 2 y 4, cuando las cuatro cisteínas están presentes en la CDR3 es probable que dos de ellas formen un enlace disulfuro dentro del bucle CDR3, hasta la fecha, este tipo de IgNAR solo se ha encontrado

en el tiburón enfermera (Streltsov et al., 2004; Cui-Ying et al., 2007); la IgNAR tipo II, aunque también se encuentra en los tiburones adultos, presenta una cisteína no canónica en la CDR3 y una en la CDR1 (Roux et al., 1998; Nuttall et al., 2003; Streltsov et al., 2004; Stanfield et al., 2004; Cui-Ying et al., 2007), ambas cisteínas forman enlaces disulfuro interbucles (Cui-Ying et al., 2007); la IgNAR tipo III se ha encontrado en los tiburones cría, durante sus primeras etapas de desarrollo, probablemente como la primera línea de defensa, por lo que es de variabilidad reducida, y esta clase de IgNAR se pierde conforme se va desarrollando el tiburón debido a los eventos de reorganización que ocurren en la CDR3 (Roux et al., 1998; Nuttall et al., 2003; Streltsov et al., 2004; Stanfield et al., 2004; Cui-Ying et al., 2007). Los enlaces disulfuro poco comunes presentes en las IgNARs I y II, se cree que son críticos para la estabilización de las proteínas IgNARs y pueden influir en la estructura de la superficie de unión al antígeno (Cui-Ying et al., 2007).



**Figura 5.** Esquema de la estructura de IgNAR. IgNAR tiene dos cadenas pesadas, cada una constituida por un dominio variable (V) y cinco dominios constantes (C); cada dominio V constituye un módulo independiente de unión al antígeno.

Los dominios variables (V) de IgNAR (VNAR) no tienden a dimerizarse, por lo que actúan de manera independiente y son más flexibles (Roux et al., 1998), pudiendo actuar como fragmentos de anticuerpos capaces de reconocer antígenos con alta afinidad y especificidad (Cui-Ying et al., 2007). Los VNARs, son conocidos como anticuerpos de dominio sencillo

(sdAbs, por sus siglas en inglés), se pueden producir fácilmente como proteínas recombinantes mediante la tecnología de despliegue en fagos (aunque también se han usado células de levaduras), y expresarse en la superficie de células, asegurando que siempre se obtenga la misma proteína (por proceder de un mismo clon específico) (Wesolowski et al., 2009). Su CDR3 es más extensa (18 residuos en promedio) que la de los anticuerpos comunes (7 residuos), y bastante diversa, esto se debe a cuatro eventos de reordenamiento entre los genes de variabilidad, diversidad y unión de su línea germinal (Díaz et al., 2002); además, su forma convexa permite que tenga mayor capacidad de penetrar cavidades en los antígenos; esta región es estable gracias a un enlace disulfuro con CDR1 (Wesolowski et al., 2009). En lugar del CDR2 (presente en los anticuerpos comunes), VNAR posee dos segmentos más cortos hipervariables (HRVs), que pueden contribuir para la unión al antígeno, y esta disminución le confiere a VNAR su tamaño característicamente pequeño (aproximadamente 12 kDa) (Roux et al., 1998; Stanfield et al., 2004; Cui-Ying et al., 2007; Wesolowski et al., 2009), siendo las unidades de reconocimiento más pequeñas basadas en inmunoglobulinas (Liu et al., 2007); debido a su tamaño pequeño, pueden ser capaces de acceder sitios de antígenos generalmente no reconocidos por anticuerpos recombinantes convencionales (Liu et al., 2007). Si bien los VNARs presentan variabilidad en sus CDR 1 y 3, estos concentran su mayor diversidad en su CDR3 gracias a los eventos de recombinación de sus genes que incluyen la adición de nucleótidos, así como a la elevada tasa de hipermutación dirigida por el antígeno, lo que permite generar suficiente diversidad estructural en los VNARs para que sean capaces de reconocer una amplia gama de antígenos (Greenberg et al., 1995; Díaz et al., 1998; Stanfield et al., 2004; Dooley y Flajnik, 2005; Criscitiello et al., 2006). La ausencia de cadenas ligeras en su estructura, le confiere a los VNARs un carácter hidrofílico (Nuttall et al., 2003), proporcionándole mayor solubilidad con respecto a los anticuerpos comunes, que presentan una interface hidrofóbica por la asociación de las cadenas pesadas con las ligeras. También se ha visto que a partir de una biblioteca del repertorio natural del tiburón se pueden obtener VNARs con alta afinidad y especificidad por antígenos y que son altamente resistentes a la desnaturalización por calor (Nuttall et al., 2001), reteniendo estabilidad conformacional cuando se calientan (Nuttall et al., 2001; Liu et al., 2007); otra característica favorable es que este tipo de anticuerpos de dominio sencillo son fácilmente eliminados del organismo gracias a su

tamaño pequeño, reduciéndose así la posibilidad de que se generen reacciones adversas. Asimismo, se ha logrado su expresión en células bacterianas a niveles mucho más elevados que los correspondientes dominios de los anticuerpos comunes (Wesolowski et al., 2009); todas estas ventajas presentes en los VNARs los sitúa como agentes potenciales para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas.

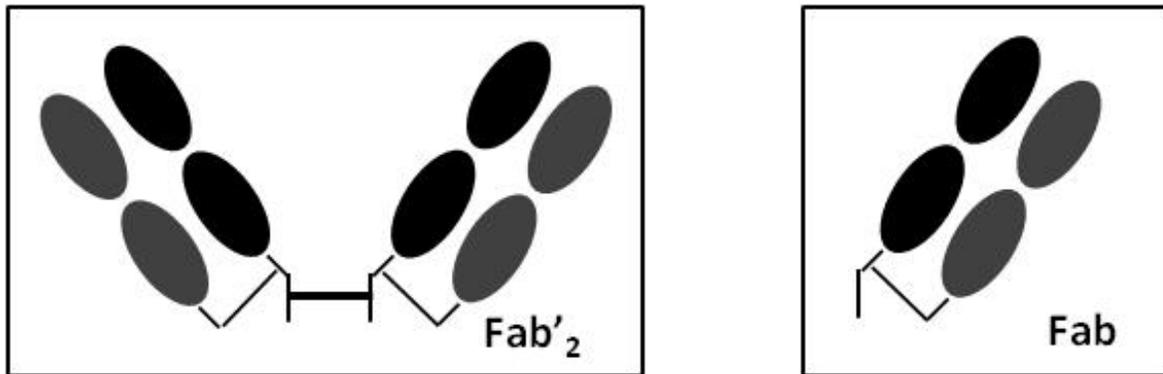
En lo que respecta a la morfología de estos organismos generadores de las IgNARs, los tiburones presentan tres partes principales: cabeza (desde el hocico hasta el inicio de la aleta pectoral), tronco (desde el inicio de la aleta pectoral hasta la cloaca), y cola (desde la cloaca hasta la punta de la aleta caudal). En la parte inferior de la cabeza están las narinas, que son dos orificios pertenecientes a la parte exterior del sentido olfativo; más abajo está la boca, que puede ser más ancha o más larga, en algunas especies llegan a haber pliegues labiales; los ojos pueden ser redondos o alargados, muchos tiburones pueden contar con membrana nictitante que protege de estímulos mecánicos; en algunas especies mexicanas puede haber un espiráculo posterior al ojo; más atrás del ojo o el espiráculo (si está presente) están las branquias, que pueden ser cortas o largas (cubriendo todo el flanco del cuerpo), la mayoría de los tiburones tienen cinco aberturas branquiales, pero algunos llegan a tener seis o siete; debajo de las branquias están las aletas pectorales, que les permiten desplazarse tanto de arriba abajo como verticalmente, en el caso de las especies pelágicas, las aletas son muy largas, mientras que las especies que andan en el fondo las tienen cortas y redondeadas; inmediatamente posterior a las aletas pectorales está el vientre, que termina en la cloaca, que es el orificio donde desembocan los sistemas excretor, digestivo y reproductor (saliendo las crías o huevos, y los espermatozoides) (Applegate et al., 1979); a los lados de la cloaca están las aletas pélvicas, en los machos se denominan cláspers (conductos por donde pasan los espermatozoides) (Bessonart y Rodríguez, 2007), en las hembras sexualmente maduras presentan cicatrices de copulación, mientras que en las sexualmente inmaduras presentan una membrana llamada himen (Applegate et al., 1979); un poco más atrás, en dirección de la cloaca, está la aleta anal (Bessonart y Rodríguez, 2007); en algunos tiburones, posterior a esta, en el pedúnculo caudal se encuentra una muesca, que marca el inicio de la aleta caudal (Applegate et al., 1979; Bessonart y Rodríguez, 2007); la aleta caudal presenta dos lóbulos (inferior=ventral y superior=dorsal), el primero corto y ancho, el segundo elongado; la mayoría de las especies presentan dos

aletas dorsales, la primera generalmente se ubica sobre las aletas pectorales, la segunda por lo regular se encuentra sobre la anal; algunas aletas dorsales pueden tener una espina enfrente, como en el caso de *Heterodontus*, *Squalus* y *Centrophorus* (Applegate et al., 1979). Particularmente, la especie *Heterodontus francisci* perteneciente a la siguiente clasificación filogenética: Filo Chordata; Subfilo Vertebrata; Superclase Gnathostomata; Clase Elasmobranquiomorfos; Subclase Condrictios; Infraclass Elasmobranquios; Superorden Euselachii; Orden Heterodontiformes; Familia Heterodontidae; Género *Heterodontus* (Applegate et al., 1979), y conocida comúnmente como tiburón cornudo, tiburón gato, se localiza en la Costa Oeste de toda la Península de Baja California y en el Golfo de California. En cuanto a su descripción morfológica, esta especie presenta prominentes espinas enfrente de ambas aletas dorsales; con evidente protubercencia sobre los ojos; espiráculo pequeño abajo, casi posterior al ojo; aleta caudal con lóbulo inferior triangular; el lóbulo superior es sesgado; el inicio de la aleta anal se localiza en dirección vertical hacia debajo de la segunda aleta dorsal; la primera dorsal inicia a un tercio de la aleta pectoral en dirección vertical ascendente; con manchas aisladas y de menor tamaño que el ojo, que se desvanecen con la edad; su aleta anal es puntiaguda. Comercialmente se aprovecha su carne y sus espinas. Hábitos y hábitat: Son tiburones que habitan cuevas y oquedades que se encuentran en las rocas; se distribuyen desde aguas de muy poca profundidad hasta 150 m; su dieta se basa en invertebrados como erizos, cangrejos, moluscos, etc, y en peces es poco frecuente; son ovíparos; alcanzan los 90 cm de longitud (Applegate et al., 1979).

#### **2.4. Aplicaciones clínicas de los anticuerpos de dominio sencillo del tiburón**

Como agentes neutralizantes capaces de inactivar o neutralizar los componentes tóxicos de venenos específicos y acelerar su eliminación del organismo, se han elaborado los antivenenos basados en preparaciones de anticuerpos (Stock-Silberman, 2007). Actualmente, se han empleado fragmentos de anticuerpos denominados faboterápicos (Fig. 6) como antídotos (Isbister et al., 2003; Espino-Solís et al., 2009); sin embargo, aunque estos anticuerpos se han usado con resultados benéficos en humanos, han llegado a producir efectos inmunológicos no deseables, como fiebre y reacciones adversas cardiopulmonares (Sobrevilla-Calvo y Rivas-Vera, 2007; Espino-Solís et al., 2009). Además, se han

presentado problemas de estabilidad en este tipo de moléculas, debido a la interface hidrofóbica entre los dominios variable pesado/variable ligero (VH/VL) (Nuttall et al., 2001).



**Fig. 6.** Faboterápicos. Son moléculas que actúan como anticuerpos, por ser una parte de ellos; conforman la fracción de unión al antígeno, pudiendo ser doble (Fab'<sub>2</sub>), o sencilla (Fab).

En la búsqueda de conseguir proteínas de unión más pequeñas, basadas en moléculas de dominio variable sencillo que conserven especificidad y afinidad por antígenos diana, se descubren los anticuerpos de tiburón denominados IgNARs, cuyo dominio variable (V) funciona como un dominio de unión al antígeno con alta especificidad y afinidad (Dooley et al., 2003). Se ha comprobado que la obtención de anticuerpos de dominio sencillo, a partir del repertorio natural del tiburón, capaces de reconocer antígenos con alta especificidad y conservando sus propiedades funcionales descritas anteriormente, es posible a partir de bibliotecas producidas por medio de bacteriófagos filamentosos (Nuttall et al., 2002). El acoplamiento de las bibliotecas moleculares creadas por asignación al azar de péptidos o bucles proteínicos para potentes sistemas de selección, tales como el despliegue en la superficie de bacteriófagos, ha resultado en el aislamiento de muchos reactivos proteínicos nuevos (Nuttall et al., 2001). Los bacteriófagos filamentosos (del género *Inovirus*) son un grupo de virus que contienen el genoma de DNA circular de cadena sencilla; dentro de las características que presentan están: su capacidad para sobrevivir al ser expuestos a condiciones extremas (95°C, pH 2) y que no llegan a matar a la célula huésped (Cesareni, 1992). Estas propiedades han favorecido el desarrollo de la tecnología basada en el despliegue de bibliotecas de anticuerpos en la superficies de bacteriófagos filamentosos. Las bibliotecas permiten la selección de anticuerpos con alta especificidad y afinidad por antígenos (Tan et al., 2007). Incluso, esta tecnología se ha llegado a emplear

para aislar anticuerpos de dominio sencillo (sdAbs), como es el caso de los dominios variables de los anticuerpos de tiburón, conocidos comúnmente como VNARs.

De manera similar, en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE, se han obtenido mediante la técnica de despliegue en fagos fragmentos VNARs de anticuerpos de tiburón dirigidos contra diversos antígenos, mismos que se han producido a partir tanto de bibliotecas inmunes generadas como del repertorio natural (naive) del tiburón. Entre éstos destacan, en el caso de las bibliotecas inmunes, la obtención de VNARs dirigidos contra la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman (García Gómez, 2005), y VNARs contra péptidos de la telomerasa (Quezada Iñiguez, 2008). Respecto de las bibliotecas naive se pueden mencionar a los VNARs dirigidos contra el veneno del alacrán *Androctonus australis* (Montoya Bonillas, 2009), y VNARs con afinidad por la IL-18 humana (Vargas Peralta, 2010). Los VNARs obtenidos en estos trabajos (tanto de bibliotecas inmunes como no inmunes) muestran afinidad por los antígenos a los que van dirigidos, incluso tienen la capacidad de neutralizar sus efectos. Por lo que se confirma la extensa utilización de este tipo de anticuerpos como herramientas para múltiples aplicaciones en el campo de la investigación, medicina, y biotecnología.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El latrosectismo es un problema de salud pública y de elevada incidencia a nivel mundial, al que se le atribuye un cuadro clínico bastante doloroso y prolongado, con serias complicaciones que pueden llevar a la muerte del paciente. La falta de optimización de las pocas herramientas existentes para tratarlo hace necesaria la obtención de anticuerpos sencillos eficaces y capaces de inactivar o neutralizar los componentes tóxicos de venenos específicos y acelerar su eliminación del organismo. De esta forma y considerando las características (tamaño pequeño, termoestabilidad, alta especificidad, capacidad de penetración, fácil eliminación del organismo, altos niveles de expresión, CDR3 extenso, fácil producción a menor costo, entre otras) que poseen los fragmentos VNAR de anticuerpos de tiburón y que los muestran como anticuerpos de dominio sencillo con gran utilidad en estudios de inmunodiagnóstico e inmunoterapia; se plantea el uso de fragmentos VNARs como una posible estrategia para combatir los efectos nocivos del latrosectismo.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los fragmentos de anticuerpos tipo VNAR obtenidos de un tiburón *Heterodontus francisci* no inmunizado como proteínas recombinantes empleando la tecnología de despliegue en fagos, tienen la capacidad de reconocer con alta especificidad a la  $\alpha$ -latrotoxina presente en el veneno de *Latrodectus mactans*, por su capacidad de penetración de cavidades en los antígenos, extensa y altamente diversa CDR3; así como de neutralizar rápidamente sus efectos nocivos en el organismo, evitando efectos adversos, gracias a su tamaño pequeño.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general**

Obtener y seleccionar los fragmentos de anticuerpo tipo VNAR de tiburón que tengan la capacidad de reconocer y neutralizar la  $\alpha$ -LTX presente en el veneno de *Latrodectus mactans*.

### **5.2. Objetivos específicos**

- Seleccionar fragmentos VNAR obtenidos de una biblioteca no inmune, proveniente de un tiburón *Heterodontus francisci*, que reconozcan el veneno de *L. mactans*.
- Probar la capacidad que tienen los fragmentos VNAR para reconocer el veneno de *L. mactans*.
- Analizar el potencial que tienen los fragmentos VNAR para neutralizar el veneno de *L. mactans* mediante bioensayos.

## **6. MATERIAL Y MÉTODO**

La parte experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE. Con respecto al espécimen escogido para obtener los anticuerpos, este fue un tiburón *Heterodontus francisci*, cuya descripción sobre sus generalidades se describieron previamente en el apartado 2.3, la decisión de trabajar con este tiburón es debido a que es una especie endémica del lugar, lo que facilita su obtención; y el antígeno empleado fue veneno total de la especie *Latrodectus mactans* (Lm), proporcionado por la empresa SILANES. Las líneas celulares usadas para la propagación y selección y expresión de las proteínas VNARs pertenecían a *Escherichia coli* (*E. coli*), estas bacterias están modificadas genéticamente de manera que sea posible inducir en el laboratorio la competencia de las células así como mantener el plásmido de forma estable en su interior.

De manera general, el protocolo que se llevó a cabo para obtener y seleccionar los fragmentos de anticuerpos tipo VNAR con capacidad de reconocer y neutralizar el veneno de la araña Lm partió del empleo de una biblioteca ya existente, procedente de un tiburón *Heterodontus francisci* sin inmunizar; con esta biblioteca se realizaron las rondas de selección contra el veneno total de Lm. Posteriormente, entre las colonias procedentes de las dos últimas rondas se buscaron aquellas que contenían el inserto (VNAR), y de las que presuntivamente lo tenían, se realizó la extracción del plásmido para determinar su secuencia. A partir de las colonias que se confirmó presentaban el VNAR, se procedió con la expresión de la proteína soluble. Con los extractos crudos obtenidos se realizó un ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, por sus siglas en inglés) para probar la capacidad de los VNARs para reconocer el veneno de Lm. Los VNARs se purificaron y cuantificaron. Por último, se analizó el potencial de neutralización de los VNARs sobre la actividad biológica de la  $\alpha$ -LTX presente en el veneno de Lm, para lo cual se realizaron ensayos con ratones correspondientes a la cepa CD1.

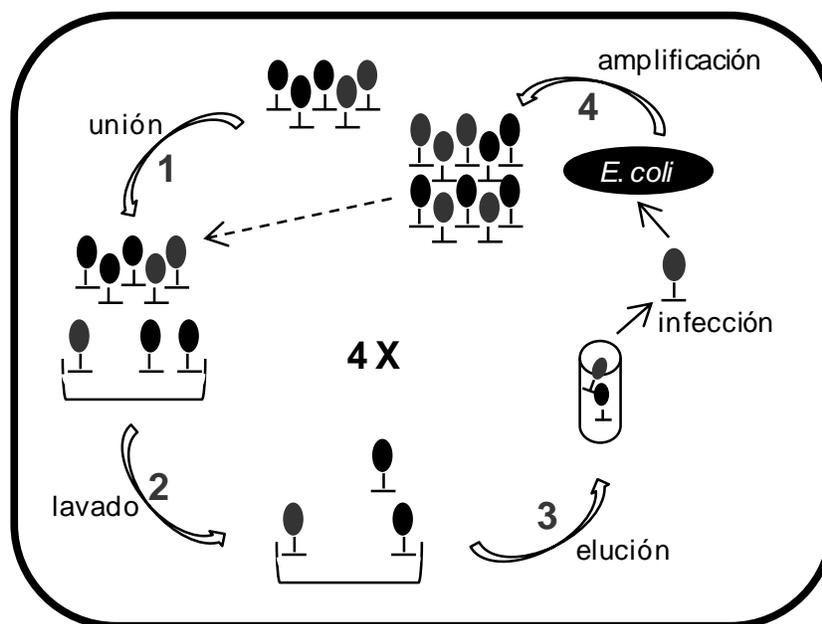
### **6.1 Rondas de selección contra el veneno de Lm con biblioteca no inmune**

Debido a que hay evidencia sustancial sobre el uso de bibliotecas no inmunes para obtener fragmentos de anticuerpos tipo VNAR usando la tecnología de despliegue en fagos (Nuttall et al., 2002), se partió de una biblioteca no inmune obtenida por esta misma técnica. Esta

biblioteca se había producido en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE; el tiburón *Heterodontus francisci* que se sacrificó se mantuvo con vida en cautiverio dentro de un estanque con agua de mar a una temperatura aproximada de 22°C, con oxigenación constante; este era un macho de un peso aproximado de 1 kg y de una talla de 30 cm; el espécimen se sacrificó para obtener el bazo, del cual se extrajo el ARN total, a partir de este se hizo la síntesis de la primera cadena de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, del inglés reverse transcription polymerase chain reaction) usando oligonucleótidos específicos; posteriormente, a partir del ADN se hizo la amplificación de los fragmentos VNARs mediante PCR con oligonucleótidos específicos, los productos de PCR se purificaron; después, se digirieron con enzimas de restricción específicas, a la vez, el vector (pComb3X) de clonación también fue digerido con endonucleasas, este vector contenía las características necesarias (el promotor del operón Lac, el gen de resistencia a la ampicilina, sitios de restricción, una combinación de las secuencias líder ompA y *pelB* para la expresión directa de anticuerpos, entre otras) para producir los VNARs; consecuentemente, se hizo la ligación del vector con el producto de PCR; se prosiguió después con la transformación por electroporación del material ligado y purificado en células *E. coli* electrocompetentes; las células transformadas se cultivaron y se pusieron a crecer, de estas, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -80°C; estas alícuotas se emplearon para cultivarlas, hacerlas crecer e infectarlas con fago ayudador; los fagos se precipitaron y usaron para el proceso de selección. Teniendo ya la biblioteca, en este trabajo, se inició con la reamplificación de la misma (Anexo 2), para lo cual se emplearon células electrocompetentes *Escherichia coli* ER2738 preparadas previamente conforme al protocolo de Barbas III et al., 2001 (Anexo 1). Las rondas de selección (Fig. 7) posteriores se hicieron basándose en el protocolo de Barbas III et al., 2001 (Anexo 3) y como antígeno se utilizó el veneno total de Lm. El proceso de bioselección consistió en realizar cuatro rondas de selección donde se pone en contacto el antígeno (veneno de *Latrodectus mactans*) con el conjunto fago-VNAR, dando como resultado la selección de colonias con fago-VNAR con alta afinidad por el antígeno diana (veneno de Lm); los fago-VNAR unidos al antígeno inmovilizado en una placa de ELISA, se someten a una serie de lavados que se van incrementando en cada ciclo y se hacen eluciones de los mismos, luego se hace

la infección de células *E. coli* con los fagos recuperados haciéndolas resistentes a antibióticos (carbencilina, en este caso), y se siembran; las colonias crecidas se analizan por PCR y evalúan en gel de agarosa para saber cuáles son positivas; estas se inducen para posteriormente realizar la extracción periplásmica, estos y los siguientes pasos son descritos más adelante.

Se tomó una muestra aleatoria representativa de las dos últimas rondas para evaluarlas por PCR con la finalidad de verificar si poseían el inserto fago-VNAR, siguiendo el procedimiento con las enzimas de restricción específicas, así como el de clonación y de enriquecimiento del cultivo. De las colonias que revelaban un tamaño de la banda definido para el inserto (~600 pb) se realizó la extracción del plásmido.



**Fig. 7.** Rondas de selección dirigidas contra el veneno total de *Latrodectus mactans*. De la biblioteca de fagos empleada solo algunos de ellos se unen al antígeno (1); se realizan lavados para que se eliminen los fagos con menor o nula afinidad por el antígeno (2); se recuperan los fagos más afines al veneno y se infecta un cultivo de *Escherichia coli* con los fagos que se recuperaron (3); se amplifican los fragmentos codificantes (4) para emplearlos en la siguiente ronda.

La reacción de PCR fue de 25 µl para cada colonia y se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Cantidad
Buffer Green 5X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	3 µl
dNTP's [2.5 mM]	2 µl
Primer F OmpSeq [10 µM]	1 µl

Primer R Gback [10 µM]	1 µl
Go Taq Polimerasa [5 U/µl]	0.12 µl
Plantilla	5 µl
Agua	7.88 µl
Total	25 µl

---

Las secuencias de los cebadores sentido (F) y antisentido (R) que se utilizaron fueron:

---

**OmpSeq (F):** 5' AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G 3'

**Gback (R):** 5' GCC CCC TTA TTA GCG TTT GCC ATC 3'

---

Las condiciones para el termociclador fueron las siguientes:

Fase	Ciclo	Paso	Temperatura	Tiempo (min)
1	1	1	95°C	2: 00
2	30	1	95°C	0: 30
		2	57°C	0: 30
		3	72°C	0: 45
3	1	1	72°C	5: 00
		2	4°C	Hold

Posteriormente, los productos de PCR se evaluaron en un gel de agarosa al 1.5% disuelta en solución TBE1X (Anexo 4), que fue teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 3.5 µl de muestra en cada pozo, que se dejaron correr en la cámara electroforética por 45 minutos a 80 V. Después se usó un transiluminador de luz ultravioleta para ver las bandas en el gel.

## 6.2 Extracción del plásmido y secuenciación

La extracción del plásmido de las colonias que reamplificaron el fragmento se realizó por lisis alcalina precipitando con etanol al 100%. El protocolo (Anexo 5) que se siguió fue modificado y establecido por el Laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas del CICESE.

Después de obtener los plásmidos, estos se evaluaron en gel de agarosa al 1% disuelta en solución TBE1X (Anexo 4). Para cargar se emplearon 10 µl de mezcla (5 µl de agua + 2 µl

de solución de carga 6X + 3 µl de muestra). Se dejó correr bajo las mismas condiciones que el gel anterior, y se utilizó el mismo transiluminador para ver las bandas.

Los plásmidos se mandaron a secuenciar a la empresa Seqxcel, San Diego, California. Las reacciones que se prepararon fueron de 12 µl (1 µg de plásmido y 1 µl de cebador antisentido (R) + agua).

### **6.3 Transformación de células BL21(D3)**

Con las secuencias que se confirmaron como VNAR se realizó la transformación de células electrocompetentes BL21(D3) preparadas de acuerdo con el protocolo de Barbas III et al., 2001 (Anexo 1), para obtener el anticuerpo como proteína soluble.

### **6.4 Expresión y obtención de la proteína soluble**

Se realizó la inducción del VNAR como proteína soluble empleando el isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), para posteriormente realizar la extracción de la proteína periplásmica. Se manejó un protocolo modificado de Barbas III et al., 2001 tanto para la inducción como para la expresión periplásmica con MgSO<sub>4</sub> (Anexo 6).

### **6.5 Ensayos ELISA**

Se realizó un ELISA de expresión con el extracto proteínico crudo (Anexo 7), para confirmar que realmente se expresaron los fragmentos VNARs.

Posteriormente, se realizó un ELISA de reconocimiento (Anexo 8) para probar si los fragmentos VNAR extraídos eran capaces de reconocer el veneno de *Latrodectus mactans*. Los ELISA se realizaron basándose en un protocolo modificado de Barbas III et al., 2001.

### **6.6 Ensayos de neutralización *in vivo* en ratones**

Se realizó un bioensayo en ratones (CD-1) con la finalidad de probar la capacidad de neutralización de tres fragmentos de anticuerpos tipo VNAR de tiburón (4-4, 4-12, 4-15).

El peso de los ratones estaba entre los 18-20g.

Se hicieron 6 grupos de 3 ratones cada uno, siendo dos grupos de ratones por cada preparación de anticuerpo, debido a que había 2 soluciones stock de cada anticuerpo.

Primeramente se prepararon las soluciones a inocular, que consistían en una mezcla de veneno con anticuerpo. Cada mezcla (diluida en PBS1X) contenía 200µl de anticuerpo procedente de una solución stock a una concentración alrededor de los 20µg/mL + lo equivalente a 2DL<sub>50</sub> (16µg de veneno), dando un total de 500µl; esto multiplicado cuatro veces (por la cantidad de ratones por grupo más uno). Se empleó veneno total proporcionado por Octolab.

Se inyectaron vía intravenosa los 500µl de la mezcla preparada a cada ratón. El tiempo de observación fue de 48 h post-inoculación.

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Debido a la importancia clínica del cuadro sintomatológico por latroductismo con conclusiones fatales, y sus elevada incidencia a nivel mundial, sumado a la búsqueda de alternativas óptimas para combatirlo; el objetivo principal de este estudio fue aislar dominios variables de anticuerpos NAR de un tiburón *Heterodontus francisci* sin inmunizar, mediante la tecnología de despliegue en fagos, que funcionaran como unidades de alta afinidad y especificidad por el veneno de la araña *Latrodectus mactans* para emplearlos en el diagnóstico del latroductismo; ya que a diferencia del método de inmunización, el despliegue in vitro permite el uso de condiciones de selección definida y proporciona una disponibilidad inmediata de las secuencias codificantes de los anticuerpos, mismos que muestran propiedades que podrían ser muy difíciles, si es que no imposibles, de obtener por inmunización de animales (Bradbury et al., 2011). Dada la evidencia existente sobre la actuación que exhiben los fragmentos VNAR de anticuerpos de tiburón respecto a su alta afinidad y su capacidad de neutralización por diversos antígenos, como previos trabajos realizados en CICESE lo confirman (Montoya Bonillas, 2009; Vargas Peralta, 2010), y gracias a las bondades y ventajas que ofrecen respecto a los anticuerpos comunes, como su tamaño pequeño, alta estabilidad térmica, y gran afinidad por diversos antígenos, presente incluso en los anticuerpos obtenidos del repertorio natural del tiburón (Nuttall et al., 2002), se ha decidido elaborar el presente trabajo empleando una biblioteca virgen (“naive”) generada por la tecnología de despliegue en fagos para la obtención de un VNAR con afinidad por la  $\alpha$ -latrotoxina del veneno de la araña *Latrodectus mactans* (Lm); esto, debido también a que se ha comprobado que usando la tecnología de despliegue en fagos y la amplificación por PCR, el repertorio natural de VNARs de animales tanto inmunizados como sin inmunizar puede usarse para selección contra antígenos diana diferentes (Nuttall, et al., 2001, 2002, 2003; Dooley et al., 2003; Liu et al., 2007), lo que confirma a las inmunoglobulinas IgNAR de tiburón como moléculas de anticuerpos funcionales.

### **7.1 Rondas de selección contra el veneno de Lm con biblioteca no inmune**

La eficiencia de los fagos en un cribado (“panning”) se analiza realizando titulaciones de entrada y salida después de cada ronda de selección contra el antígeno que se está

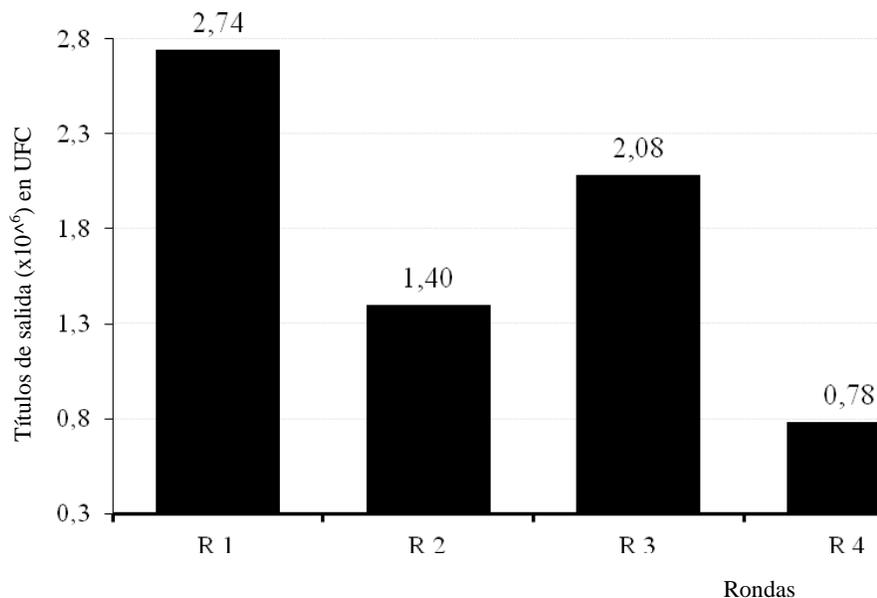
empleando. Estas titulaciones nos permiten estimar la cantidad de fagos con la que se está iniciando cada ronda (títulos de entrada), y la cantidad de fagos reamplificados después de los lavados de cada ronda (títulos de salida).

Partiendo de un tamaño de biblioteca de  $1.19 \times 10^9$  UFC, considerando el trabajo de Nuttall y colaboradores (2002) que emplearon una biblioteca menor, se realizaron 4 rondas de selección, esperando que hubiese un aumento de las unidades formadoras de colonia en las últimas rondas de selección, producto de la amplificación de los fagos con mayor afinidad por el antígeno de acuerdo con Barbas III et al., 2001. Los fagos producidos en cada ronda se titularon para averiguar si reaccionaban específicamente con el veneno de Lm, y al parecer así fue, ya que un clásico comportamiento de enriquecimiento de fagos con unión específica se observó, según lo descrito a continuación.

El título es elevado al principio del procedimiento del cribado, lo cual es representativo de la existencia de la población de fagos completa procedente de la biblioteca inicial. Después de cada ronda, se observa una diferencia significativa con respecto al inicial, incrementando a su vez la cantidad de fagos afines al antígeno.

De la ronda 1 (R1) a la ronda 2 (R2) hubo una disminución significativa, lo cual era de esperarse debido a que por medio de los lavados se eliminaron aquellos fagos con menor o nula afinidad por el antígeno, lo que refleja también la falta de selectividad por la biblioteca inicial; sin embargo, entre las rondas 2 (R2) y 3 (R3) se observa un incremento, lo que parece indicar que hubo un aumento de los fagos con más afinidad, debido a la replicación de fagos específicos, de acuerdo con Nuttall y colaboradores (2001), este comportamiento es común para la selección positiva de los miembros de las bibliotecas de bacteriófagos específicos al antígeno; no obstante, el descenso que se observa en la última ronda (R4) con respecto a la R3, podría ser indicativo de que los fagos con mayor afinidad se hayan concentrado y mantenido, manifestándose una disminución debida a la selección específica de los fagos con capacidad de unión al antígeno diana, descartándose aquellos menos afines, aunque también, pudo ocurrir que no haya habido una adecuada unión fago-antígeno por cuestiones de error en el procedimiento, y que por medio de los lavados estos se eliminaran (Fig. 8), o bien, pudo pasar que con el incremento de los lavados se haya perdido la afinidad de los fagos. Al observar estos resultados, se decidió proceder con la siguiente parte que fue la búsqueda de colonias positivas, es decir, aquellas colonias que

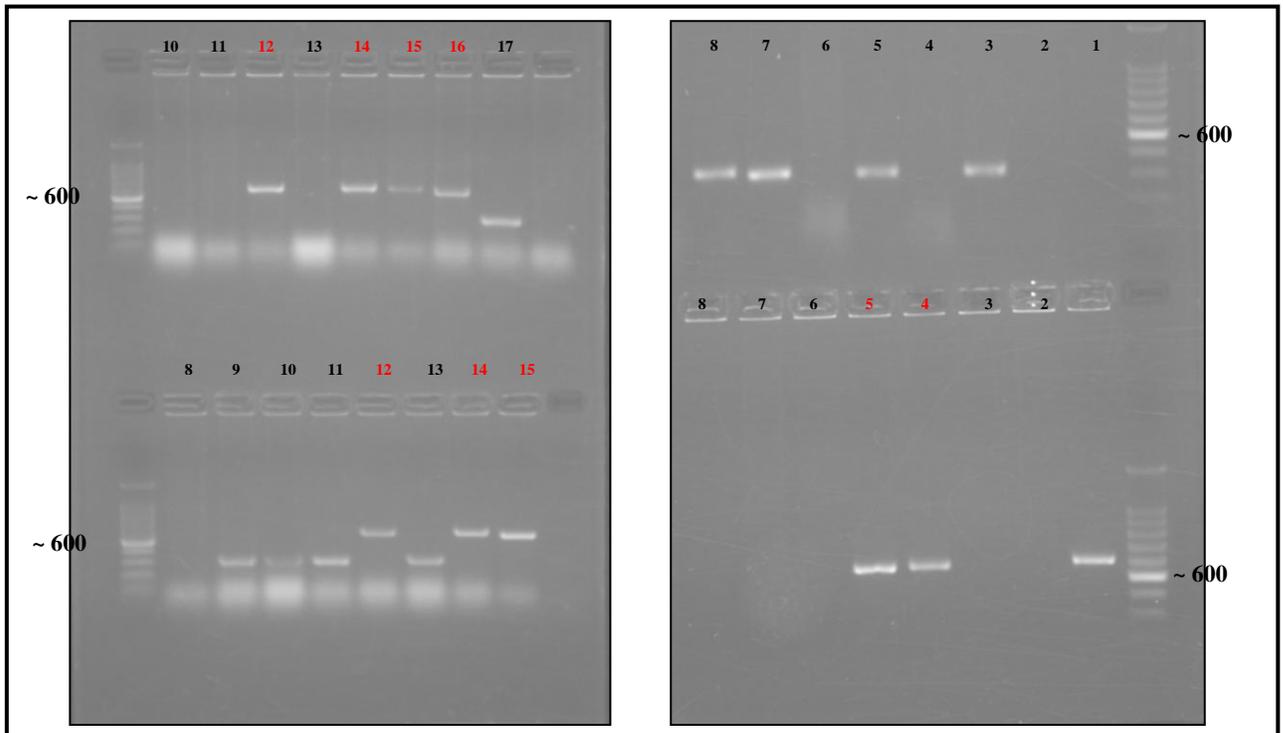
tuvieran insertado el VNAR, presentando un tamaño de 600 pb (Fig. 9), tomando al azar colonias de las rondas 3 y 4.



**Figura 8.** Resultados de los títulos de salida durante las rondas de selección dirigidas contra el veneno de *Latrodectus mactans*.

## 7.2 Búsqueda de colonias positivas de las rondas 3 y 4

Del total de colonias obtenidas durante las rondas 3 y 4, se tomaron al azar una cantidad representativa del total de ambas rondas, siendo 18 colonias de la ronda 3 y 15 de la ronda 4 las que se seleccionaron para evaluar por PCR cuáles eran positivas al inserto, es decir, cuáles presentaban el fragmento VNAR, lo que se corroboró evaluándolas posteriormente en gel de agarosa al 1.5%. De todas las colonias analizadas, el 22 % correspondiente a 4 colonias de la ronda 3, y el 40% correspondiente a 6 colonias de la ronda 4 fueron positivas al inserto, lo que se determinó en base al tamaño de la banda (600 pb) (Fig. 9). Aún cuando se observaron variaciones en el tamaño de las bandas, estas se consideraron poco significativas. El resto, es decir, aquellas que presentaban un tamaño diferente, significativamente visible (~200 pb), se descartaron, porque no incluían el fragmento VNAR. Aún cuando las bandas mostraban el tamaño esperado, se debe realizar un análisis de la secuencia como confirmativo de que correspondan a un VNAR o no. Después de obtener las colonias positivas se procedió a realizar la extracción del plásmido de cada una de ellas, para posteriormente determinar su secuencia y de este modo confirmar si realmente cada secuencia correspondía a un VNAR.



**Figura 9.** Colonias reamplificadas reveladas en gel de agarosa al 1.5%. Las filas de arriba en ambos gels corresponden a colonias de la ronda 3, las dos segundas filas corresponden a colonias de la ronda 4. Las colonias positivas que reamplificaron el fragmento de un tamaño característico de un VNAR están marcadas con rojo, se obtuvieron cuatro colonias positivas de la ronda 3 y seis de la ronda 4.

### 7.3 Extracción del plásmido y secuenciación

Después del análisis de colonias por PCR, se tomaron las diez colonias que fueron positivas al inserto para proceder con la extracción del plásmido. Se extrajeron 10 plásmidos por el método de extracción por lisis alcalina y se precipitaron con etanol al 100%. El plásmido extraído se cuantificó (Tabla 2) y posteriormente se prepararon las reacciones para enviarlas a secuenciar utilizando 1 µg de plásmido, esto son la finalidad de definir si el inserto clonado correspondía a un fragmento VNAR.

Tabla 2. Cuantificación de la concentración de los plásmidos extraídos de las colonias positivas al inserto VNAR.

Colonia	[µg/µl]
3-12	5.27
3-14	3.78
3-15	5.38
3-16	0.54

4-1	0.15
4-4	4.39
4-5	4.52
4-12	2.15
4-14	0.4
4-15	0.6

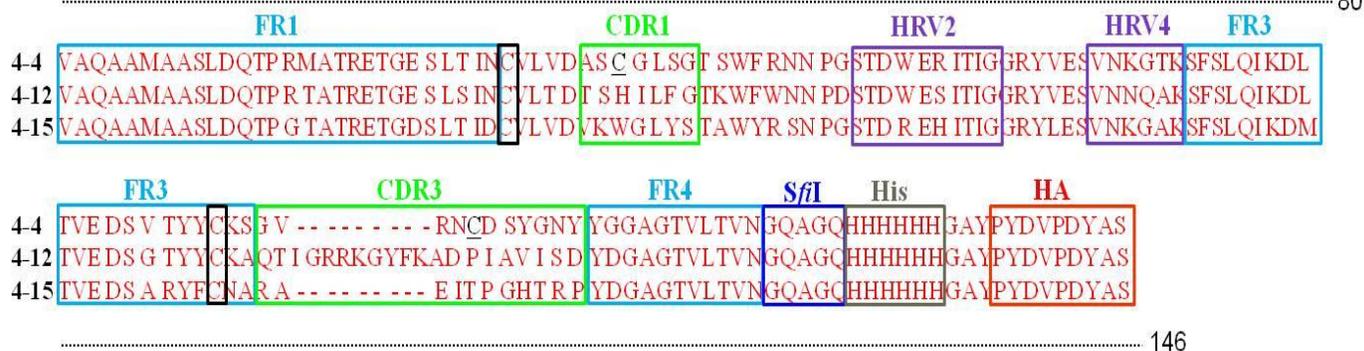
---

De las diez colonias que fueron analizadas, para determinar su secuencia, el 30% fueron identificadas como VNARs (4-4, 4-12, 4-15); todas pertenecientes a los plásmidos de la ronda 4. El resto de las secuencias se descartaron porque presentaban codones de paro y sitios de cambio que afectaron el marco de lectura. Sin embargo, el hecho de que dentro de todas las secuencias se observó variabilidad, y el resultado de que del total de secuencias, el 30% hayan sido VNARs, son indicativos de que es necesario continuar analizando las colonias en búsqueda de más secuencias positivas.

Además, la variabilidad entre las tres proteínas VNARs identificadas, también confirma que estos tipos de anticuerpos incluyen una alta diversidad dentro de sus regiones de complementariedad. Se hizo la traducción de las tres secuencias VNAR a aminoácidos y se alinearon (Fig. 5), el análisis de las secuencias no reveló secuencias repetidas, indicando que la biblioteca estuvo libre de colonias contaminantes. Se identificó cada región característica de un VNAR, las dos regiones de determinación de la complementariedad 1 y 3 (CDR 1 y CDR3), las cisteínas no conservadas, las regiones altamente conservadas 1, 3 y 4 (“Frameworks”: FR1, FR3, FR4) con sus cisteínas canónicas, las regiones hipervariables 2 y 4 (HRV2, HRV4) (Nuttall et al., 2001), así como las etiquetas necesarias para la purificación (cola de 6 histidinas: 6xHis), y la inmunodetección (HA), y el sitio de reconocimiento por la enzima (*Sfi*I) (Fig. 10). De acuerdo con Nuttall y colaboradores (2001), las regiones conservadas se identificaron en las FRs, en las que los aminoácidos presentes, fueron ligeramente diferentes entre sí, también se confirma la presencia de las cisteínas canónicas pertenecientes a las FR1 y FR3. Otra observación es que los tres VNARs presentan variabilidad menor en su CDR1, mientras que la mayor variabilidad se observa en su CDR3, esto debido a los procesos de recombinación, así como las mutaciones dirigidas por el antígeno (Greenberg et al., 1995; Díaz et al., 1998; Stanfield et al., 2004; Dooley y Flajnik, 2005; Criscitiello et al., 2006). Con respecto al VNAR 4-4, este presenta una cisteína no canónica en sus CDR 1 y 3 (Roux et al., 1998; Nuttall et al., 2003; Streltsov

et al., 2004; Stanfield et al., 2004; Cui-Ying et al., 2007), por lo que ambos residuos participan en el enlace disulfuro interbucle de acuerdo con lo descrito por Cui-Ying y colaboradores (2007), lo que confirma que se trata de una IgNAR tipo II (Roux et al., 1998).

En lo que respecta a los otros dos clones (4-12 y 4-15), no presentaron ninguna de las dos cisteínas no canónica en la posición central de los CDRs 1 y 3, pudiendo tratarse de una supresión por selección positiva o negativa al antígeno, siendo significativo en la unión al antígeno diana (veneno de *Latrodectus mactans*), (Nuttall et al., 2001); incluso, se observa una similitud en la secuencia de su CDR3, desde la posición 3 a la 11, esta similitud la comparten las tres proteínas.



**Figura 10.** Secuencia de aminoácidos de los VNARs con sus sitios característicos. Regiones “framework” (FR); regiones de determinación de la complementariedad (CDR); regiones hipervariables (HRV); cisteínas conservadas (C); cisteínas no canónicas (C); etiquetas (S/I, His, HA).

También se estableció el tamaño de cada VNAR en base al número de aminoácidos y pares de bases (pb); dos de ellos (4-4 y 4-15) tuvieron un tamaño de 137 aminoácidos y 411 pb, mientras que el clon 4-12 fue de 146 aminoácidos y 438 pb.

En cuanto a la longitud de la CDR3 de cada fragmento VNAR, las características tanto de longitud como de composición de aminoácidos de estas CDRs son propias de las IgNARs presentes de manera natural en el repertorio del tiburón, acorde con el trabajo de Cui-Ying y colaboradores (2007).

Se empleó un programa especializado en análisis de secuencias de proteínas denominado Basic BLAST para analizar las secuencias de los tres VNARs obtenidos; este programa contiene una base de datos de secuencias de VNAR y permite estimar el valor del porcentaje de identidad de los VNARs obtenidos en este trabajo con los de la base. Los valores obtenidos fueron del 80% para el VNAR 4-4, 82% para el VNAR 4-12, y 70% para

el VNAR 4-15. En base a la variabilidad presente en cada secuencia, tanto de talla como de composición, se confirma la diversidad existente en este tipo de Igs. El siguiente paso fue la transformación de los tres fragmentos VNARs en células electrocompetentes BL21(D3) para realizar después la inducción a proteína soluble y por último hacer su extracción.

#### **7.4 Transformación, expresión, y extracción de los VNARs**

Después de analizar las secuencias y determinar cuáles eran VNARs, los tres plásmidos (4-4, 4-12 y 4-15) se transformaron en células *E. coli* BL21 (D3) para expresar las proteínas recombinantes. De las colonias transformadas que crecieron, se seleccionó una de cada plásmido y se procedió a realizar la inducción de la proteína soluble con IPTG y consecuentemente su extracción por lisis alcalina.

Aún con la dificultad que existe en la expresión de genes VNAR, se logró la expresión de las tres proteínas VNAR solubles, rindiendo un total de 40 ml de extracto crudo por proteína soluble.

El concentrado crudo extraído se empleó después para realizar los ELISAs de expresión y de reconocimiento por el veneno de *Latrodectus mactans* (Lm).

#### **7.5 Ensayo ELISA**

Para confirmar que si se haya obtenido la proteína, se realizó un ELISA de expresión con los extractos crudos, el cual fue positivo, lo que nos indicó que los VNARs se expresaron correctamente.

Después, se hizo una prueba de reconocimiento del veneno de *Latrodectus mactans* (Lm) por los VNARs recombinantes mediante un ensayo ELISA (Fig. 11), para confirmar si en efecto, al menos uno de los VNARs presentaba afinidad por el veneno de Lm. Para realizar los ELISAs se emplearon un control negativo (BSA) y un blanco (PBS). De los tres clones que se probaron en el ELISA de reconocimiento, se obtuvo que el clon 4-4 presentó la mayor afinidad por el veneno de Lm, lo que nos permite corroborar que en efecto, los fragmentos VNAR de anticuerpos de tiburón, obtenidos a partir de bibliotecas no inmunes, son capaces de reconocer antígenos específicos, como lo fue el caso del reporte de Nuttall y colaboradores en el 2002, que a partir de una biblioteca no inmune de tiburón, se lograron aislar dos fragmentos VNAR con capacidad de reconocimiento por la proteasa Kgp de la

bacteria *Porphyrromonas gingivalis*, así como también se han logrado trabajos exitosos, anteriormente citados, en el Laboratorio de Inmunología Molecular y Toxinas del Departamento de Biotecnología Marina del CICESE con VNARs obtenidos a partir de bibliotecas “naive”.

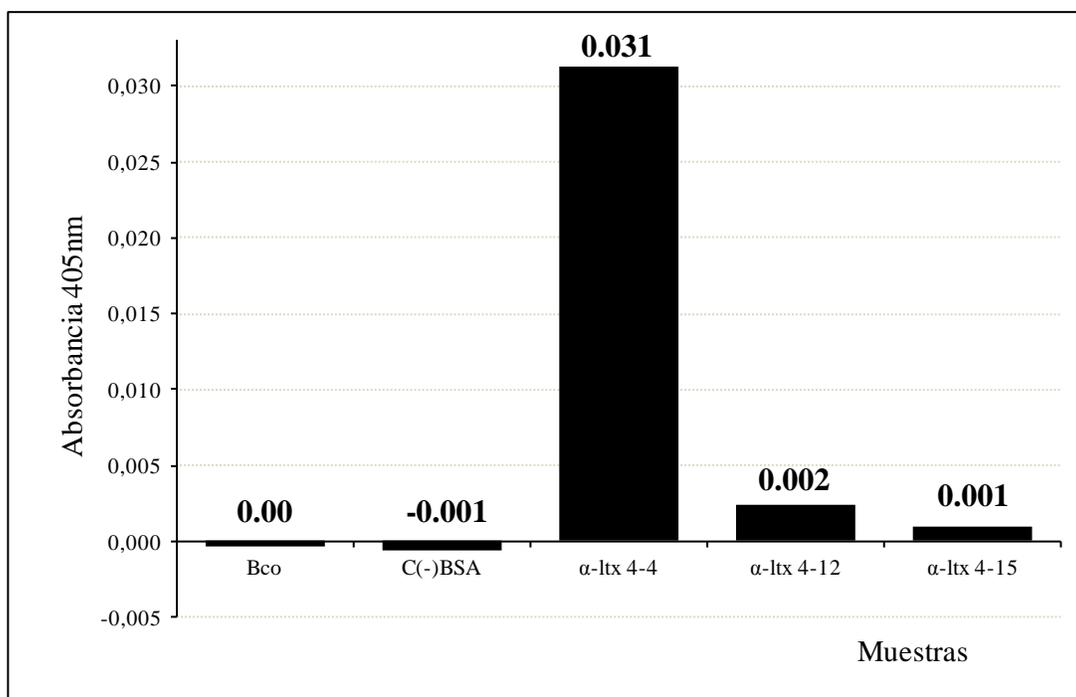
Sin embargo, los resultados en el reconocimiento del veneno de Lm por los tres fragmentos VNAR no fueron altamente significativos, esto pudo deberse a bajos niveles de expresión, algo que es común en este tipo de anticuerpos de tiburón. En base al resultado del ELISA de expresión, podríamos pensar que aún cuando se expresaron correctamente las proteínas, estas no presentaron alta especificidad por el veneno de Lm; la selección de estas proteínas con más expresión sin afinidad de unión, es común en los experimentos de despliegue en fagos (Nuttall et al., 2001).

La capacidad de reconocimiento del clon 4-4 estuvo por debajo de 1. Sin embargo, en base a la baja respuesta del fragmento VNAR4-4 de reconocer el veneno de Lm, podemos inferir que dentro de las colonias faltantes por analizar se pueden encontrar más fragmentos VNAR que reconozcan el veneno, incluso con mayor potencial.

Aunque en otros trabajos, como los de Nuttall y colaboradores (2001,2002), y los de estudiantes de CICESE, por mencionar algunos, los valores de afinidad se han dado por arriba de 0.1 (siendo muy cercanos o sobrepasando a 1), se consideró como positivo este resultado, por el simple hecho de no haber sido un valor nulo (de cero).

En base a lo mencionado anteriormente, existe la posibilidad de que estos resultados tan bajos en cuanto a la respuesta de reconocimiento por parte de los VNARs, se deba a que no se ha logrado obtener el suficiente rendimiento en la expresión y producción de dichas proteínas.

No obstante, otra situación que pudo ocurrir, es que las proteínas recombinantes, no hayan reconocido significativamente al veneno de Lm, lo que sugeriría que reconocen sitios con diferente conformación estructural, según lo señalado por Nuttall y colaboradores (2001).



**Figura 11.** Resultado del ELISA de reconocimiento empleando el extracto crudo de los tres fragmentos VNAR recombinantes (4-4, 4-12, 4-15). También se usó un blanco (PBS1x) y un control negativo (BSA). El clon 4-4 es el que presenta afinidad por el veneno de *Latrodectus mactans*.

## 7.6 Ensayos de neutralización *in vivo* en ratones

Para la elaboración de los bioensayos, se requirió producir mayor cantidad de proteína recombinante, así como purificarla. Previo al bioensayo, se realizó la cuantificación de los VNARs solubles, así como su evaluación en gel de poliacrilamida al 12.5% teñido con plata, el rendimiento de la producción de los tres VNARs estuvo alrededor de los 20 µg/ml, por lo que fue muy bajo, y las bandas en el gel no fueron visibles. Es posible que este bajo rendimiento de producción de los VNARs se deba a reacciones negativas entre la secuencia VNAR y la cadena bacteriana durante la expresión de la proteína soluble en las células electrocompetentes *E. coli*; ya que según lo mencionado en el reciente trabajo de Karla Juárez (2011), hay dos posibles explicaciones del porque hay tan bajo rendimiento en cuanto a la expresión de los VNARs en *E. coli*, una es debido a las diferencias en el uso de codones preferenciales entre las bacterias y los tiburones, es posible que las diferencias en el uso de los tRNAs influya en las expresión de los VNARs; la otra posibilidad podría ser la inestabilidad de los VNARs como transcritos, o la toxicidad que estas secuencias podrían tener para las cadenas bacterianas. No obstante, se ha visto que la expresión de los VNARs en células bacterianas refleja cierto grado de dificultad (Dr. Licea, comunicación personal),

lo que muestra que en efecto, este tipo de anticuerpos de dominio sencillo son difíciles de expresar. Aún así se decidió realizar el bioensayo, cuyos resultados fueron inconclusos, debido precisamente a la falta de proteína para el análisis.

## 8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres fragmentos de anticuerpos tipo VNAR (4-4, 4-12, 4-15) a partir de una biblioteca no inmune procedente del tiburón *Heterodontus francisci*.

Se logró la expresión de tres proteínas VNAR recombinantes en *E. coli*, esto se confirmó mediante el análisis de las secuencias, que permitió identificar tres de ellas como VNARs. Aún cuando generalmente los anticuerpos de tiburón no se expresan adecuadamente en *E. coli*.

A partir del ELISA de reconocimiento, se consiguió una proteína recombinante (4-4) que presenta reconocimiento por el veneno de la araña *Latrodectus mactans*.

El resultado del bioensayo para analizar el potencial de neutralización de los VNARs obtenidos en este trabajo fue inconcluso, debido a que la cantidad de anticuerpo recombinante era insuficiente.

El presente estudio confirma que el aislamiento de ligandos con afinidad a antígenos de bibliotecas de dominios sencillos tipo VNAR de tiburón es posible.

## **9. PERSPECTIVAS**

Aún cuando los resultados en este trabajo no hayan sido los esperados, se manifestaron opciones prometedoras, que dan pie a que a partir de lo que se ha hecho se continúe con la búsqueda de más colonias, ya que existe la posibilidad de encontrar otras que tengan la capacidad de reconocer el veneno de *Latrodectus mactans*, incluso con mayor potencial.

De igual forma, se sugiere que se produzca la suficiente cantidad de anticuerpo para probar la farmacocinética de los VNARs aquí obtenidos mediante bioensayos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman y S. Pillai. 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. 6a edición. Elsevier Saunders, Madrid. 566 pp.
- Applegate, S.P., L. Espinosa, L. Menchaca y F. Sotelo. 1979. *Tiburones mexicanos*. 1a edición. Azteca, S. A., México, D. F. 146 pp.
- Barbas III, C.F., D.R. Burton, J.K. Scott y G.J. Silverman. 2001. *Phage Display. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Primera edición. Cold Spring Harbor, New York. 763 pp.
- Bayram, A., N. YİĞİT, T. Danişman İ. Çorak, Z. Sancak y D. Ulaşoğlu. 2007. Venomous spiders of Turkey (Araneae). *Journal of Applied Biological Sciences* 1: 33-36.
- Beleboni, R. de O., A.B. Pizzo, A.C.K. Fontana, R. de O.G. Carolino, J. Coutinho-Netto, y W.F. dos Santos. 2004. Spider and wasp neurotoxins: pharmacological and biochemical aspects. *European Journal of Pharmacology* 493: 1-17.
- Bernstein, R.M., S.F. Schluter, S. Shen y J.J. Marchalonis. 1996. A new high molecular weight immunoglobulin class from the carcharhine shark: Implications for the properties of the primordial immunoglobulin. *Immunology* 93: 3289-3293.
- Bessonart, M. y A. Rodríguez. 2007. *Agnatos y Condrictios*. Curso Biología Animal, Facultad de Ciencias 1-14.
- Borda, C.E., M.S. Delgado y M.J.F. Rea. 2005. Arácnidos de importancia médica de las especies *Loxosceles* en la región de influencia de la Universidad Nacional del Nordeste. Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Resumen: M-141.
- Bugli, F., R. Graffeo, F.P. Sterbini, R. Torelli, L. Masucci, M. Sali, A. Grasso, S. Rufini, E. Ricci, G. Fadda, y M. Pescatori. 2008. Monoclonal antibody fragment from combinatorial phage display library neutralizes alpha-latrotoxin activity and abolishes black widow spider venom lethality, in mice. *Toxicon* 51: 547-554.
- Cesareni, G. 1992. Peptide display on filamentous phage capsids: A new powerful tool to study protein-ligand interaction. *Federation of European Biochemical Societies* 30: 66-70.

- Criscitello, M.F., M. Saltis y M.F. Flajnik. 2006. An evolutionarily mobile antigen receptor variable region gene: Doubly rearranging NAR-TcR genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5036-5041.
- Cui-Ying, S., C.J. Secombes, y A.J. Porter. 2007. Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library. *Molecular Immunology* 44: 656-665.
- Díaz, M., A.S. Greenberg y M.F. Flajnik. 1998. Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does generate the repertoire: Possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14343-14348.
- Diaz, M., R.L. Stanfield, A.S. Greenberg y M.F. Flajnik. 2002. Structural analysis, selection, and ontogeny of the shark new antigen receptor (IgNAR): identification of a new locus preferentially expressed in early development. *Immunogenetics* 54: 501-512.
- Dooley, H., M.F. Flajnik y A.J. Porter. 2003. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Molecular Immunology* 40: 25-33.
- Dooley, H. y M.F. Flajnik. 2005. Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. *European Journal of Immunology* 35: 936-945.
- Dooley, H., R.L. Stanfield, R.A. Brady y M.F. Flajnik. 2006. First molecular and biochemical analysis of *in vivo* affinity maturation in an ectothermic vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1846-1851.
- Escoubas, P., S. Diocot, y G. Corzo. 2000. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* 82: 893-907.
- Espino-Solís, G.P., L. Riaño-Umbarila, B. Becerril y L.D. Possani. 2009. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *Journal of Proteomics* 72: 183-199.
- Forrester, M.B. y S.K. Stanley. 2004. Epidemiology of spider bites in Texas, 1998-2002. *Journal of the Royal Institute of Public Health* 118: 506-507.

- Garb, J.E., A. González, y R.G. Gillespie. 2004. The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): phylogeny, biogeography, and invasion history. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1127-1142.
- García Gómez, A. 2005. Obtención de fragmentos variables tipo IgNAR de tiburón *Heterodontus francisci* contra la toxina Cn2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y Superior de Ensenada, B.C., México. 93 pp.
- Greenberg, A.S., L. Steiner, M. Kasahara y M.F. Flajnik. 1993. Isolation of a shark immunoglobulin light chain cDNA clone encoding a protein resembling mammalian  $k$  lights chains: Implications for the evolution of light chains. *Immunology* 90: 10603-10607.
- Greenberg, A.S., D. Avila, M. Hughes, A. Hughes, E.C. McKinney y M.F. Flajnik. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 374: 168-173.
- Hickman, C.P., L. Roberts y A. Larson. 2002. Principios Integrales de Zoología. 11a. edición. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. 895 pp.
- Hlubek, M., D. Tian, E.L. Stuenkel. 2003. Mechanism of  $\alpha$ -latrotoxin action at nerve endings of neurohypophysis. *Brain Research* 992: 30-42.
- Holliger, P., y P.J. Hudson. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136.
- Isbister, G.K., A. Graudins, J. White y D. Warrell. 2003. Antivenom treatment in arachnidism. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 41: 291-300.
- Isbister, G.K., S.G.A. Brown, M. Miller, A. Tankel, E. Macdonald, B. Stokes, R. Ellis, Y. Nagree, G.J. Wilkes, R. James, A. Short y A. Holdgate. 2008. A randomized controlled trial of intramuscular vs. intravenous antivenom for lactrodectism-the RAVE study. *Quarterly Journal of Medicine* 101: 557-565.
- Juárez Moreno, K.O. 2001. Isolation and characterization of heavy chain single-domain antibodies from the horn shark *Heterodontus francisci* against murine CD38. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y Superior de Ensenada, B.C., México. 158 pp.

- Kiyatkin, N.I., I.E. Dulubova, I.A. Chekhovskaya y E.V. Grishin. 1990. Cloning and structure of cDNA encoding  $\alpha$ -latrotoxin from black widow spider venom. *Federation European Biochemical Societies* 270: 127-131.
- Liu, J.L., J.P. Anderson, E.R. Goldman. 2007. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library. *BioMed Central Biotechnology* 7: 1-10.
- Luer, C.A., C.J. Walsh y A.B. Bodine. 2004. Cap. 13. The Immune System of Sharks, Skates, and Rays. 369-395 pp, *in* Carrier, J.C., J.A. Musick & M.R. Heithaus, (eds.). *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press. 596 pp.
- Machado, N.P., G.A. Téllez y J.C. Castaño. 2006. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio* 10: 186-197.
- Montoya Bonillas, D.A. 2009. Obtención de anticuerpos tipo VNAR que reconocen y neutralizan venenos de alacrán. Tesis de maestría, CICESE. B.C., México. 87 pp.
- Nuttall, S.D., U.V. Krishnan, M. Hattarki, R. de Gori, R.A. Irving, y P.J. Hudson. 2001. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries. *Molecular Immunology* 38: 313-326.
- Nuttall, S., U.V. Krishnan, L. Doughty, A. Nathanielsz, N. Ally, R.N. Pike, P.J. Hudson, A.A. Kortt, y R.A. Irving. 2002. A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Letters* 516: 80-86.
- Nuttall, S.D., U.V. Krishnan, L. Doughty, K. Pearson, M.T. Ryan, N.J. Hoogenraad, M. Hattarki, J.A. Carmichael, R.A. Irving y P.J. Hudson. 2003. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *European Journal of Biochemistry* 270: 3543-3554.
- Parpura, V., F. Liub, S. Brethorst, K. Jeftinija, S. Jeftinija y P.G. Haydon. 1995.  $\alpha$ -Latrotoxin stimulates glutamate release from cortical astrocytes in cell culture. *Federation of European Biochemical Societies* 360: 266-270.
- Quezada Iñiguez, R.M. 2008. Obtención de anticuerpos de dominio sencillo tipo VNAR del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de unión al complejo HLA-B7/péptidos de la telomerasa. Tesis de maestría. CICESE. B.C., México. 93 pp.
- Quintana-Castillo, J.C. y R. Otero-Patiño. 2002. Envenenamiento aracnídico en las Américas. *Medunab* 5: 14-22.

- Rohou, A., J. Nield y Y.A. Ushkaryov. 2007. Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon* 49: 531-549.
- Roques, L.F., G. Abriata y D.D. Martinez. 2007. Envenenamiento por animales ponzoñosos: Impacto del envenenamiento por animales ponzoñosos en la salud de la República Argentina. *Boletín Epidemiológico Periódico* 9-19.
- Roux, K.H., A.S. Greenberg, L. Greene, L. Strelets, D. Avila, E.C. McKinney y M.F. Flajnik. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11804-11809.
- Rumfelt, L.L., R.L. Lohr, H. Dooley y M.F. Flajnik. 2004. Diversity and repertoire of IgW and IgM *VH* families in the newborn nurse shark. *Immunology* 5: 1-15.
- Rumfelt, L.L., M. Diaz, R.L. Lohr, E. Mochon y M.F. Flajnik. 2004. Unprecedented Multiplicity of Ig transmembrane and secretory mRNA forms in the cartilaginous fish. *Immunology* 173: 1129-1139.
- Sobrevilla-Calvo, P.J. y S. Rivas-Vera. 2007. Anticuerpos Monoclonales en Linfomas. Subdirección de Medicina y Depto. de Hematología. Instituto Nacional de Cancerología 2: 149-158.
- Sotelo-Cruz, N., J.G. Hurtado-Valenzuela y N. Gómez-Rivera. 2006. Envenenamiento en niños por mordedura de la araña "*Latrodectus mactans*" (Viuda Negra). Características clínicas y tratamiento. *Gaceta Médica México*, 142: 103-108.
- Stanfield, R.L., H. Dooley, M.F. Flajnik y I.A. Wilson. 2004. Crystal structure of a shark single-domain antibody V región in complex with lysozyme. *Science* 305: 1770-1773.
- Stock-Silberman, R.P. 2007. Biotecnología y antivenenos: El caso de África. *Biotecnología* 14: 315-326.
- Streltsov, V.A., J.N. Varghese, J.A. Carmichael, R.A. Irving, P.J. Hudson y S.D. Nuttall. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 12444-12449.

- Tan, G.H., K. Yussof, H.F. Seow y W.S. Tan. 2007. A phage-displayed single chain variable fragment that interacts with hepatitis B core antigen: Library construction, selection and diagnosis. *Journal of Clinical Virology* 38: 49-56.
- Ushkaryov, Y. 2002.  $\alpha$ -Latrotoxin: from structure to some functions. *Toxicon* 40: 1-5.
- Ushkaryov, Y.A., K.E. Volynski, A.C. Ashton. 2004. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon* 43: 527-542.
- Vargas Peralta C.E. 2010. Obtención de fragmentos VNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con afinidad por IL-18 humana. CICESE. B.C., México. 77 pp.
- Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D.V. Serreze, F.A. Goldbaum, F. Haag y F. Koch-Nolte. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medicine Microbiology and Immunology* 198: 157-174.
- Woll, P. y E. López. 2003. Las arañas del género *Latrodectus* (“viuda negra”) en las zonas rural y urbana de la ciudad de Arequipa. *Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú* 64: 52-58.

## ANEXOS

### **Anexo 1: Preparación de células electrocompetentes**

- 1) Inocular una colonia aislada de la cepa de *E. coli* (*ER2738/BL21 (D3)*) en 3 ml de medio SB, y dejar incubar toda la noche a 37°C con agitación constante a 250 rpm.
- 2) Al otro día se inoculan 500 ml de medio SB (con 10 ml de glucosa al 20% <sup>w/v</sup> + 5 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M) con 2.5 ml del cultivo que se preparó el día anterior.
- 3) Poner a incubar con agitación (37°C a 250 rpm) hasta que alcance una densidad óptica de ~1.0 en el espectrofotómetro (600 nm) (tiempo estimado de 2-2.5 h).
- 4) Distribuir el cultivo en 5 tubos para centrífuga estériles (de 50 ml), y mantener en hielo por 15 minutos.
- 5) Centrifugar a 3,000g/4°C/20 min. Descartar el sobrenadante y vaciar el cultivo restante a los tubos. Centrifugar bajos las mismas condiciones y descartar sobrenadante. Resuspender el sedimento con 50 ml de glicerol 10% frío.
- 6) Centrifugar a 3,000g/4°C/20 min. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el sedimento con 25 ml de glicerol 10% frío, combinar los dos concentrados en un solo tubo; quedan en total 3 tubos (al último tubo se le completan los 50 ml con glicerol 10% frío).
- 7) Centrifugar a 3,000g/4°C/20 min. Eliminar sobrenadante. Resuspender el sedimento con 25 ml de glicerol 10% frío. Combinar los dos concentrados en un tubo; quedan 2 tubos en total (al último tubo se le completan los 50 ml con glicerol 10% frío).
- 8) Centrifugar a 3,000g/4°C/20 min. Eliminar sobrenadante. Resuspender el sedimento con 25 ml de glicerol 10% frío. Combinar los dos concentrados en un tubo de 50 ml; queda 1 tubo al final.
- 9) Centrifugar a 2,500g/4°C/15 min. Eliminar el sobrenadante cuidando que no se pierda el sedimento (quedan ~3 ml). Resuspender el sedimento completamente con el volumen que quedó en el tubo; realizar alícuotas de 50 µl en tubitos de 0.6 ml estériles que se mantuvieron en una cama de hielo seco con etanol ~15 min antes de hacer las alícuotas.
- 10) Inmediatamente, conservar las alícuotas a -70°C.

### *Test de competencia*

Este test se realiza para confirmar que las células sean aptas para transformarse con el plásmido por electroporación.

- 1) Colocar una alícuota de 50  $\mu$ l de células (ER2738/BL21(D3)) en hielo, y agregarle 1  $\mu$ l de pUC19 (plásmido cuantificado); dejar en hielo por 10 min.
- 2) Transferir el volumen total (~51  $\mu$ ) a una celda de electroporación estéril previamente enfriada. Dejar en hielo 2 min.
- 3) Electroporar empleando un electroporador Bio-Rad MicroPulser a 2.5 kV, y 200  $\Omega$ , en una celda de 2 mm.
- 4) Recuperar con 3 ml de medio SOC (1 ml +1 ml +1 ml) en un tubo cónico estéril de 50 ml. Incubar a 37°C con agitación (250 rpm) por 1 h.
- 5) Adicionar 7 ml de medio SB al cultivo, y mezclar con inversión (con movimientos de arriba hacia abajo).
- 6) Sembrar en 3 placas con agar LB+carbencilina (100  $\mu$ g/ml), 1  $\mu$ l de células ER2537 (+49  $\mu$ l de medio SOC), 10  $\mu$ l (+40  $\mu$ l de medio SOC), y 100  $\mu$ l, respectivamente. Sembrar en una placa de agar LB+kanamicina (30  $\mu$ g/ml), 10  $\mu$ l de cultivo y 10  $\mu$ l en agar LB. Incubar toda la noche a 37°C.
- 7) Al siguiente día, calcular el número de células transformadas. La competencia debe estar por arriba de  $1 \times 10^9$  colonias/ $\mu$ g de plásmido.

### *Test de contaminación*

De una alícuota de células *E. coli* sin electroporar, tomar con el asa y sembrar en agar LB+carb, repetirlo en una placa con agar LB+kan (30  $\mu$ g/ml). Incubar a 37°C toda la noche. No debe haber crecimiento de bacterias.

Agregar 25  $\mu$ l de cultivo *E. coli* a un tubo cónico de 15 ml con 5 ml de LB top agar y mezclar por inversión; después, vaciar el volumen total en una placa con agar LB sin antibiótico. Dejar que solidifique e incubar a 37°C toda la noche. No deben presentarse los círculos si la bacteria no está contaminada con fagos líticos, que es lo esperado.

## **Anexo 2: Reamplificación de biblioteca**

- 1) Inocular 50 ml de SB con 50  $\mu$ l de *ER2738*. Incubar a 37°C por 1.5- 2.5 h hasta alcanzar una densidad óptica = 1.0
- 2) Agregar 10  $\mu$ l de biblioteca de fagos. Dejar a temperatura ambiente por 15 min.
- 3) Agregar 10  $\mu$ l de carbencilina [100 mg/ml]. Transferir a matraz de 500 ml y dejar incubar a 37°C por 1 h con agitación constante. Alternadamente, realizar la titulación plaqueando 1 y 10  $\mu$ l (por duplicado) de una dilución  $10^{-4}$  (10  $\mu$ l de cultivo + 1 ml de SB =  $[10^{-2}]$ , 10  $\mu$ l de  $[10^{-2}]$  + 1ml de SB =  $[10^{-4}]$ ) del cultivo en placas con agar LB+carbencilina. Dejar incubar las placas a 37°C toda la noche. Al día siguiente calcular el número de transformantes ( $[\# \text{ de colonias} \times \text{volumen de cultivo}] / \text{volumen plaqueado}$ ).
- 4) Agregar al cultivo en agitación 15  $\mu$ l de carbencilina [100 mg/ml]. Incubar 1 h a 37°C con agitación constante.
- 5) Agregar 5 ml de fago ayudador M13K07 + 145 ml de SB + 75  $\mu$ l de carbencilina [100 mg/ml]. Incubar a 37°C por 2 h con agitación constante.
- 6) Agregar 280  $\mu$ l de kanamicina [50 mg/ml]. Incubar a 37°C toda la noche con agitación constante.
- 7) Centrifugar los ~200  $\mu$ l de cultivo a 13, 000 g por 15 min a 4°C. Transferir sobrenadante a matraz de 500 ml.
- 8) Agregar 8 g de PEG-8000 (polietilenglicol) y 6 g de NaCl. Incubar a 37°C por 5 min. Dejar en hielo 30 min.
- 9) Centrifugar a 15, 000 g por 15 min a 4°C. Descartar sobrenadante. Dejar secar sedimento.
- 10) Recuperar sedimento con 2 ml de BSA 1% diluida en PBS1X en un tubo (2 ml) para microcentrífuga.
- 11) Centrifugar a 13, 000 rpm por 5 min a 4°C. Recuperar sobrenadante con una jeringa y filtrar con un filtro de 0.2  $\mu$ m en un nuevo tubo de 2 ml. La biblioteca está lista para usarse en el cribado.

### **Anexo 3: Rondas de bioselección**

- 1) Para la primer ronda se cubren dos pozos de una placa para ELISA con 50  $\mu$ l de antígeno (veneno) diluido en PBS1X. Incubar a 37°C toda la noche. Para las siguientes rondas se cubre un solo pozo.
- 2) Descartar antígeno. Bloquear con 150  $\mu$ l de BSA al 3% diluido en PBS1X. Incubar a 37°C por 1 h.
- 3) Descartar solución bloqueadora. Agregar 50  $\mu$ l de biblioteca de fagos reamplificada. Incubar 2 h a 37°C. Alternadamente, al haber transcurrido la primera hora, inocular 10 ml de SB con 10  $\mu$ l de células *ER2738* y dejar incubar a 37°C hasta que alcance una densidad óptica = 1.0 aproximadamente por 1.5-2 h.
- 4) Descartar fagos. Agregar 150  $\mu$ l de PBSTween20 al 0.05% y pipetear 5 veces. Esperar 5 min, descartar y repetir el lavado 4 veces más. Para la segunda ronda se deben hacer 10 lavados, para las rondas 3 y 4 se realizan 15 lavados.
- 5) Descartar último lavado. Agregar 50  $\mu$ l de tripsina [10 mg/ml] diluida en PBS1X. Incubar a 37°C por 30 min. Pipetear 10 veces.
- 6) Recuperar los dos eluidos e inocularlos en 2 ml del cultivo de *ER2738* y dejarlo 15 min en reposo.
- 7) Agregar al cultivo 6 ml de SB + 1.6  $\mu$ l de carbencilina [100 mg/ml]. Alternadamente, realizar la titulación de salida: diluir 4  $\mu$ l del cultivo de *ER2738* (sin inocular) en 400  $\mu$ l de SB y plaquear 10 y 100  $\mu$ l (por triplicado) en placas con agar LB + carbencilina [100  $\mu$ g/ml], dejar incubar las placas a 37°C toda la noche. Al día siguiente calcular los títulos de salida ( $[\# \text{ de colonias} * \text{volumen de cultivo}] / \text{volumen plaqueado}$ ).
- 8) Incubar el cultivo a 37°C por 1 h con agitación constante. Mientras, realizar la titulación de entrada: Mezclar 50  $\mu$ l del cultivo de *ER2738* (sin inocular) con 1  $\mu$ l de una dilución  $10^8$  de la biblioteca de fagos reamplificada (1  $\mu$ l de biblioteca + 1 ml de SB =  $[10^{-3}]$ , 1  $\mu$ l de  $[10^{-3}]$  + 1 ml de SB =  $[10^{-6}]$ , 10  $\mu$ l de  $[10^{-6}]$  + 1 ml de SB =  $[10^{-8}]$ ), hacerlo por triplicado y dejar en reposo 15 min. Plaquear en placas de LB + carbencilina [100 mg/ml], incubar las placas a 37°C toda la noche y al día siguiente calcular los títulos de entrada ( $[\# \text{ de colonias} * \text{volumen de cultivo}] / \text{volumen plaqueado}$ ).
- 9) Agregar al cultivo 2.4  $\mu$ l de carbencilina [100 mg/ml]. Incubar 1 h a 37°C con agitación constante.

- 10) Transferir el cultivo a un matraz de 500 ml. Agregar 2.5 ml de fago ayudador M13K07 + 89.5 ml de SB + 46  $\mu$ l de carbencilina [100 mg/ml]. Incubar por 2 h a 37°C.
- 11) Agregar 140  $\mu$ l de kanamicina [50 mg/ml]. Incubar a 37°C toda la noche con agitación constante.
- 12) Centrifugar a 3,000 g por 15 min a 4°C. Pasar sobrenadante a matraz de 500 ml y agregar 4 g de PEG-8000 y 3 g de NaCl. Incubar a 37°C por 5 min.
- 13) Dejar en hielo por 30 min. Centrifugar a 15, 000 g por 15 min a 4°C. Descartar sobrenadante. Dejar secar el sedimento.
- 14) Resuspender el sedimento en 2 ml de BSA al 1%. Centrifugar a 13, 000 rpm por 5 min a 4°C. Filtrar sobrenadante con un filtro de 0.2  $\mu$ m. Almacenar a 4°C.

#### **Anexo 4: Electroforesis en gel de agarosa**

- 1) Pesar la cantidad requerida de agarosa y agregarla a un matraz en conjunto con 50 ml de solución TBE1X. Si se requiere un gel al 1.5% pesar 0.75 g de agarosa, pero si es al 1% se pesan 0.5 g.
- 2) Se pone a calentar la mezcla en un horno de microondas y posteriormente se le agregan 10  $\mu$ l de bromuro de etidio [0.5 mg/ml].
- 3) Se vierte en el molde y se colocan los peines para hacer los pozos. Dejar que se solidifique.
- 4) Pasar el molde con el gel ya hecho a la cámara de electroforesis y cargar las muestras (una por pozo).
- 5) Agregar solución TBE1X a la cámara. Correr las muestras por 45 min a 80 V. El tiempo y la intensidad de voltaje están sujetos a los requerimientos, por lo que pueden modificarse.

### **Anexo 5: Extracción de plásmido**

- 1) Inocular 3 ml de medio SB + carbencilina con cada colonia y dejar incubando toda la noche a 37°C con agitación constante.
- 2) Centrifugar 3 minutos a 13, 000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender en 100 µl de GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 10 mM) + RNasa [0.2 mg/ml]. Mezclar.
- 4) Agregar 200 µl de NaOH 0.2 N + SDS 1%. Mezclar por inversión y dejar 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente 5 minutos en hielo.
- 5) Adicionar 150 µl de acetato de potasio 3 M pH=4.8. Mezclar por inversión y dejar en hielo 10 minutos.
- 6) Centrifugar 15 minutos a 13, 000 rpm. Recuperar el sobrenadante (~400 µl) y adicionar 800 µl de etanol al 100%. Mezclar. Dejar 30 minutos en hielo.
- 7) Centrifugar por 15 minutos a 13, 000 rpm. Descartar el sobrenadante. Lavar sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
- 8) Centrifugar 15 minutos a 13, 000 rpm. Descartar el sobrenadante. Dejar secar sedimento hasta que se torne a un color amarillo claro.
- 9) Resuspender en 50 µl de agua libre de nucleasas.

## **Anexo 6: Expresión del fragmento VNAR como proteína soluble y extracción periplásmica de la proteína**

- 1) Inocular 3 ml de SB + carbencilina con una colonia. Dejar incubando toda la noche a 37°C con agitación constante.
- 2) Tomar 500 µl de cultivo e inocular 50 ml de SB + carbencilina. Incubar a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 (~2-3 h).
- 3) Agregar 100 µl de IPTG 0.5 M. Incubar 5 h a 37°C con agitación constante.
- 4) Centrifugar 15 minutos a 4, 000 g. Descartar el sobrenadante. Resuspender sedimento en 40 ml de Tris 30 mM/glucosa 20% pH= 8 sobre una cama de hielo y con agitación constante.
- 5) Agregar poco a poco 80 µl de EDTA 0.5 M. Dejar 10 minutos en agitación suave sobre la cama de hielo.
- 6) Centrifugar 20 minutos a 8, 000 g a una temperatura de 4°C. Guardar el sobrenadante. Resuspender sedimento en 40 ml de MgSO<sub>4</sub> 5 mM. Agitar 10 minutos en baño de hielo.
- 7) Centrifugar 20 minutos a 8, 000 g a 4°C. Recuperar el sobrenadante y almacenarlo a -20°C.

### **Anexo 7: ELISA de expresión**

- 1) Inmovilizar 50 µl de extracto proteínico crudo por triplicado en una placa para ELISA durante 2 h a 37°C.
- 2) Bloquear con 150 µl de BSA al 3% (en PBS1X) por 2 h a 37°C.
- 3) Añadir 50 µl de una dilución 1:1000 de anti-HA (en BSA 1%), este es un anticuerpo asociado a peroxidasa que reconoce la etiqueta de HA del fragmento VNAR. Incubar a 37°C por 1 h.
- 4) Lavar con PBST al 0.05% (Tween20 en PBS1X) por triplicado.
- 5) Revelar con 50 µl de sustrato ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en amortiguador de citratos (ácido cítrico 50 mM, citrato de sodio 50 mM, pH 4.1) y peróxido de hidrógeno al 30%. Incubar por 15-30 min a 37°C.
- 6) Leer absorbancia a 405 nm en un lector de placas ELISA (BioRad).

### **Anexo 8: ELISA de reconocimiento**

- 1) Inmovilizar 50 µl de veneno (a una concentración de 10 µg/ml diluido con PBS1X) por triplicado. Dejar toda la noche a 4°C.
- 2) Bloquear con 150 µl de BSA al 3%. Incubar 2 h a 37°C.
- 3) Agregar 50 µl de extracto proteínico crudo (VNAR). Incubar 1 h a 37°C.
- 4) Lavar con PBST al 0.05% tres veces. Descartar en cada lavado.
- 5) Agregar 50 µl de anticuerpo anti-HA. Incubar 1 h a 37°C.
- 6) Lavar con PBST al 0.05% tres veces. Descartar en cada lavado.
- 7) Revelar con 50 µl de sustrato ABTS.
- 8) Leer absorbancia a 405 nm en el lector de placas ELISA BioRad.