

Tesis defendida por
Erika Elizabeth León Acosta
Y aprobada por el siguiente comité

Dra. Edna Sánchez Castrejón
Director del comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Miembro del comité

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
*Coordinador del Programa de Posgrado
en Biotecnología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

28 de febrero del 2013.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina

Obtención de fragmentos tipo vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de neutralización del veneno de la araña *Latrodectus mactans*

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Erika Elizabeth León Acosta

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Erika Elizabeth León Acosta, presentada para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Obtención de fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de neutralización del veneno de la araña *Latrodectus mactans*.

Resumen aprobado por:

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Directora de tesis

La araña viuda negra (*Latrodectus mactans*) es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de gran interés médico debido a las manifestaciones clínicas que provoca el envenenamiento de su mordedura en humanos. El cuadro clínico por envenenamiento de viuda negra, denominado latrodectismo, está representado por síntomas tales como contracciones musculares, dolor, problemas respiratorios y cardíacos, y en caso severos la muerte. Dado los problemas de salud que ocasiona la mordedura de esta araña, se ha puesto especial énfasis en la investigación y desarrollo de nuevos antivenenos que neutralicen de manera eficiente el efecto tóxico causado por este veneno. En este trabajo se propone el empleo de fragmentos de anticuerpos vNAR del tiburón *H. francisci* como una alternativa para la neutralización de los componentes del veneno de *L. mactans*, entre ellos la α -latrotoxina, ya que sus características, tales como tamaño, especificidad y afinidad los hace buenos candidatos para su empleo como antiveneno. A partir de un tiburón *H. francisci* inmunizado con veneno total de araña viuda negra, se obtuvo una biblioteca a partir de la cual se aislaron dos fragmentos vNAR mediante la técnica de despliegue en fagos.

Palabras clave: ***Latrodectus mactans*, veneno, anticuerpo, despliegue en fagos, IgNAR, *Heterodontus francisci*.**

Abstract of the thesis presented by Erika Elizabeth León Acosta as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science of Life with orientation in Marine Biotechnology.

Obtention of vNAR fragments of antibodies from shark *Heterodontus francisci* with neutralizing capacity of the spider *Latrodectus mactans* venom.

Accepted summary by:

Dra. Edna Sánchez Castrejón

Thesis director

The black widow spider (*Latrodectus mactans*) is considered by the World Health Organization (WHO) of great medical interest because the clinical manifestations resulting from its bite poisoning in humans. The clinical picture of black widow poisoning, called latrodectism, is represented by symptoms such as muscle contractions, pain, respiratory and cardiac problems, and in severe cases death. Given the health problems caused by the bite of this spider, has placed special emphasis on research and development of new antivenoms to neutralize efficiently the toxic effect caused by this poison. This paper proposes the use of antibody fragments vNAR from shark *H. francisci* as an alternative to neutralization of the venom components *L. mactans*, like α latrotoxin, as their characteristics, such as size, specificity and affinity makes them good candidates for use as anti-venom. From a shark *H. francisci* immunized with whole venom of black widow spider, was obtained from a library which vNAR two fragments were isolated by the phage display technique.

Key words: ***Latrodectus mactans*, venom, antibody, phage display, IgNAR, *Heterodontus francisci*.**

Dedicatoria

A mis papás, Gloria y Ezequiel.

A Beto.

Agradecimientos

Profesionales:

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por el apoyo, instalaciones y facilidades prestadas durante la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada.

A mi directora de tesis, Dra. Edna Sánchez Castrejón, por todo el apoyo durante estos años, te agradezco infinitamente tu paciencia y dedicación. Gracias por brindarme tu amistad.

Al Dr. Alexei Licea Navarro, por su apoyo, tiempo, consejos y por permitirme formar parte de su gran grupo de trabajo.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra, por los consejos, correcciones y apoyo durante este proyecto.

Personales:

A mis papás, Gloria Acosta y Ezequiel León, gracias por todo el amor que me han dado, por su apoyo y confianza infinita, ustedes son mi fortaleza y mi ejemplo a seguir. Los amo.

A ti Beker, mi mejor amigo, porque a tu lado soy la persona más feliz del mundo, por tu amor y tu apoyo incondicional. Love jah SMB.

A mis hermanos, Waldo y Gloria, gracias por estar conmigo y compartir tantos buenos momentos, sé que cuento con ustedes incondicionalmente. Los amo.

A mis sobrinos, Dante, Sabina y Dario, por todos esos momentos de felicidad que me dan. Los amo.

A toda mi familia, por el cariño y apoyo que siempre he recibido de ustedes, algunos que a pesar de la distancia están siempre presentes.

A mi suegra Yolanda, por todo el amor y apoyo que nos ha dado siempre.

A mis amigas del alma, Barbie, Fátima, Ericka, Mere, y Aime, por compartir toda una vida de alegrías, aventuras y momentos inolvidables, siempre las tengo en mi mente y en mi corazón a pesar de la distancia. Las quiero muchísimo.

A Jenny, David, Yun, Ricardo, Jannette y Elia, por brindarme su amistad, la atesoraré siempre.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y consejos en el lab, por los todos los buenos momentos que pasamos.

CONTENIDO

Resumen	2
Abstract.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos	5
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas.....	12
1. Introducción	13
1.1 <i>Latrodectus mactans</i>	13
1.1.1 Características.....	13
1.1.2 Toxinas del veneno de <i>Latrodectus mactans</i>	15
1.1.3 Mecanismo de acción de α latrotoxina	16
1.1.4 Latrodectismo	18
1.2 Anticuerpos de tiburón.....	19
2.2.1 Anticuerpos	19
1.2.2 Anticuerpos IgNAR	21
1.3 <i>Heterodontus francisci</i> (Girard, 1854).....	25
1.4 Técnica de Despliegue en fagos.....	27
2. Antecedentes	29
3. Justificación	32
4. Hipótesis	33
5. Objetivo general.....	34
5.1 Objetivos particulares	34
6. Materiales y métodos.....	35
6.1 Inmunización	35
6.1.1 Inmunización del tiburón <i>Heterodontus francisci</i> con veneno total de la araña <i>L. mactans</i>	35
6.1.2 Ensayo ELISA del suero de tiburón inmunizado con veneno total de la araña <i>L. mactans</i>	36
6.2 Obtención de una biblioteca inmune de fragmentos vNAR de anticuerpos de tiburón.....	37
6.2.1 Extracción del bazo del tiburón <i>Heterodontus francisci</i> inmunizado para obtención de ARN total.....	37

6.2.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y Amplificación del fragmento vNAR.....	37
6.2.3 Obtención del vector pComb3X.....	39
6.2.4 Digestión del fragmento vNAR y del vector de clonación pComb3x.....	40
6.2.5 Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> cepas ER2537.....	41
6.2.6 Ligación de la biblioteca de vNAR y del vector pComb3x a pequeña escala.....	42
6.2.7 Transformación	42
6.2.8 PCR de colonia	43
6.2.9 Secuenciación	44
6.2.10 Ligación de la biblioteca de vNAR y del vector pComb3x a gran escala	44
6.2.11 Precipitación de la reacción de ligación.....	45
6.3 Selección de fragmentos vNAR específicos de la biblioteca inmune.	45
6.3.1 Preparación de fago ayudador (VCSM13).....	45
6.3.2 Amplificación de la biblioteca inmune.....	46
6.3.3 Rondas de Selección.....	47
6.3.4 Búsqueda de clonas con el inserto vNAR por PCR y purificación de plásmido	48
6.4 Expresión de la proteína vNAR recombinante.....	49
6.4.1 Inducción	49
6.4.2 Extracción periplásmica de la proteína vNAR recombinante.....	49
6.4.3 Purificación de la proteína vNAR recombinante	50
6.5 Análisis de la proteína vNAR recombinante	51
6.5.1 ELISA de expresión.....	51
6.5.2 ELISA de reconocimiento de la proteína vNAR recombinante	51
6.5.3 Electroforesis desnaturalizantes en tricina (Tricina-SDS-PAGE.....	52
6.5.4 Inmunodetección (Western Blot)	52
6.5.5 Diálisis	53
6.5.6 Cuantificación	53
6.6 Evaluación de la actividad del veneno de <i>L. mactans</i> en ratones	54
7. Resultados	55
7.1 Inmunización del tiburón.....	55
7.2 Extracción del bazo del tiburón y obtención de ARN total.	56

7.3 Amplificación y del fragmento vNAR por PCR.....	56
7.4 Obtención de vector pComb3X-scFv.....	57
7.5 Digestión de los fragmentos vNAR y vector pComb3X-scFv.....	58
7.6 Ligación a pequeña escala y análisis de clonas.....	61
7.7 Ligación a gran escala.....	63
7.8 Rondas de selección y análisis de clonas positivas.....	63
7.9 Expresión y purificación de proteínas vNAR recombinantes.....	67
7.10 Evaluación de la actividad del veneno total de <i>L. mactans</i>	74
8. Discusión.....	76
Conclusiones.....	80
Perspectivas.....	81
Referencias bibliográficas.....	82

Lista de figuras

Figura		Pág.
1	<i>Latrodectus mactans</i> y su ooteca.....	14
2	α -latrotoxina.....	16
3	Múltiples mecanismos de acción de la α LTX al unirse a los receptores latrofilina y neurexina.....	17
4	Estructura en Y de un anticuerpo convencional.....	21
5	Representación esquemática de una IgG de ratón/humana y de un IgNAR.....	22
6	Dominio variable de una IgNAR.....	23
7	Distribución geográfica de <i>Heterodontus francisci</i>	25
8	<i>Heterodontus francisci</i>	26
9	Rondas de selección de un repertorio de anticuerpos expresado en la superficie de fagos.....	28
10	Desarrollo de antivenenos y generación de conocimiento del uso de antivenenos y de anticuerpos.....	30
11	Representación gráfica de los títulos de anticuerpos presentes en el suero del tiburón inmunizado con veneno total de <i>L. mactans</i>	55
12	Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de 3.9 μ g de ARN total de bazo del tiburón inmunizado con veneno total de la araña <i>L. mactans</i>	56
13	Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los fragmentos vNAR amplificados por PCR.....	57
14	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del vector pComb3X-scFv purificado mediante lisis alcalina.....	58
15	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de digestión del vector pComb3X-scFv con enzima <i>Sfi I</i>	59

16	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la purificación del vector pComb3X-scFv digerido y del fragmento de relleno purificado.....	60
17	Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los fragmento vNAR digerido y purificados.....	60
18	Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% del las reacciones de PCR de colonia de la ligación a pequeña escala.....	61
19	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las clonas positivas obtenidas en la ligación a pequeña escala...	62
20	Títulos de entrada de fagos en las rondas de selección.....	64
21	Títulos de salida de fagos en las rondas de selección.....	64
22	Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de la reacción PCR de colonia de la tercera ronda de selección.....	65
23	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las clonas de la ronda de selección 3.....	66
24	Alineamiento de las secuencias de las proteínas vNAR recombinantes obtenidas a partir de la biblioteca inmune (6 y 7) y no inmune (4.4 y 4.12) contra el veneno total de <i>L. mactans</i>	67
25	ELISA de expresión. Extractos periplásmicos correspondientes a las proteínas vNAR #6, #7, #4.4 y #4.12 y como control negativo células <i>E. coli</i> BL21(D3) sin transformar.....	68
26	Inmunodetección de las proteínas vNAR recombinantes obtenidos mediante extracción periplásmica.....	69
27	Inmunodetección de la purificación de las proteínas vNAR recombinantes #6 y #7.....	70
28	Inmunodetección de la purificación de las proteínas vNAR recombinantes #4.4 y #412.....	71
29	Electroforesis desnaturizante en geles de tricina (Tricina-	72

	SDS-PAGE) al 12% de las eluciones obtenidas en la purificación de proteínas vNAR recombinantes.....	
30	Curva estándar de BSA.....	73
31	ELISA de reconocimiento.....	74

Lista de tablas

Tabla		Pág.
1	Efectos Clínicos del envenenamiento por <i>Latrodectus mactans</i>	18
2	Esquema de inmunización del tiburón <i>Heterodontus francisci</i> a partir de junio 2011.....	35
3	Oligonucleótidos utilizados en la amplificación y la secuenciación.....	38
4	Condiciones para la reacción de PCR.....	39
5	Condiciones de PCR de colonia.....	43

1. Introducción

1.1 *Latrodectus mactans*

1.1.1 Características

Las arañas son artrópodos quelicerados venenosos que se distribuyen en una gran variedad de ambientes alrededor de todo el mundo. La OMS (Organización Mundial de la Salud) considera de interés médico a cuatro géneros de araña debido a las manifestaciones clínicas y a la letalidad provocada por sus venenos. Uno de estos géneros es *Latrodectus* el cual incluye a más de treinta especies venenosas entre la que destaca *Latrodectus mactans* (Fabricius, 1775), también conocida la araña viuda negra o capulina (Garb *et al.*, 2004).

La distribución geográfica de *L. mactans* en norteamérica incluye principalmente Estados Unidos y México, siendo las zonas con climas cálidos y templados las preferidas por esta especie. Debido a que interactúan en los hábitats humanos, alrededor de las casas, jardines, graneros y zonas agrícolas se les considera sinantrópicas (Smithers, 1944; Costello y Daane, 1998; Muller, 1993).

El nombre de viuda negra se debe a que las hembras suele comerse al macho después del apareamiento (Andrade y Banta, 2002). Entre las características más notables de esta especie destaca su color negro intenso y brillante, una mancha roja en forma de reloj de arena y largas patas (Figura 1). El tamaño varía entre hembras y machos, mientras las primeras llegan a medir 35 mm de longitud con las patas extendidas, los machos sólo 12 mm. Se sabe que pueden llegar a vivir hasta 2 años (Álvarez del Toro, 1992).



Figura 1. *Latrodectus mactans* y su ooteca. Expresión de la alfa-latrotoxina recombinante activa de *Latrodectus mactans* utilizando un sistema de células de insecto-baculovirus. Rodríguez González, M. 2008. Tesis de maestría. Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México. 3.

El hábitat de esta araña es terrestre y suelen vivir en lugares ocultos y oscuros como grietas, hendiduras, debajo de las piedras, madrigueras abandonadas por otros animales y troncos. Es una especie solitaria y sólo atacan cuando se ven amenazadas o se encuentra en riesgo su ooteca la cual es una bolsa esférica y algodonosa donde protegen sus huevos (Figura 1). Se le considera un depredador generalista ya que se alimenta de insectos, arácnidos, así como pequeños vertebrados como lagartijas y ratones (Forster, 1995; Hodar y Sánchez Piñero, 2002). Desde un punto de vista evolutivo, la diversidad de toxinas en el veneno se explica en función a su amplia dieta y a la necesidad de protegerse de sus especies predatoras (Rash y Hodson, 2002; Garb *et al.* 2004).

1.1.2 Toxinas del veneno de *Latrodectus mactans*

La araña viuda negra posee un par de glándulas ponzoñosas con salida en los quelíceros con los cuales pueden morder, inyectar su veneno y paralizar a la presa, sin embargo, son las hembras las responsables de la toxicidad característica de esta especie, ya que debido al tamaño de los quelíceros de los machos, estos no pueden atravesar la piel de los vertebrados (Jelinek, 1997, Singletary, *et al.* 2005, Peterson, 2006).

El veneno de *L. mactans* es una mezcla compleja de sustancias biológicamente activas entre las que se encuentran, polipéptidos, enzimas, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, sales inorgánicas y neurotoxinas, siendo estas últimas las responsables de la toxicidad del veneno. Dentro de las neurotoxinas se han identificado tres tipos, α -latrotoxina, α -latroinsectotoxina y α -latrocrustáceotoxina, las cuales actúan de manera específica en vertebrados, insectos y crustáceos, respectivamente (Granata *et al.*, 1972; Frontali *et al.*, 1976; Knipper *et al.*, 1986).

La toxina de mayor interés científico y médico debido a su efecto neurotóxico en vertebrados y por lo tanto en humanos es la α -latrotoxina. Esta neurotoxina de ~130 kD está constituida por una cadena polipeptídica no glucosilada que puede encontrarse en forma monomérica o dimérica. La toxina se encuentra activa cuando está en forma de tetrámero, para lo cual es necesaria la presencia de cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} (Ashton *et al.*, 2000).

Los monómeros de la toxina tienen tres dominios diferentes denominados “ala”, “cuerpo” y “cabeza” (Figura 2). Cuando se ensamblan en dímeros asimétricos las alas quedan perpendiculares y los dímeros se unen para formar el tetrámero. Los tetrámeros formados, tienen una base hidrofóbica de unión a membrana, la cual forma un canal que la atraviesa y permite el paso de cationes mono y divalentes, así como de neurotransmisores (Orlova *et al.*, 2000).

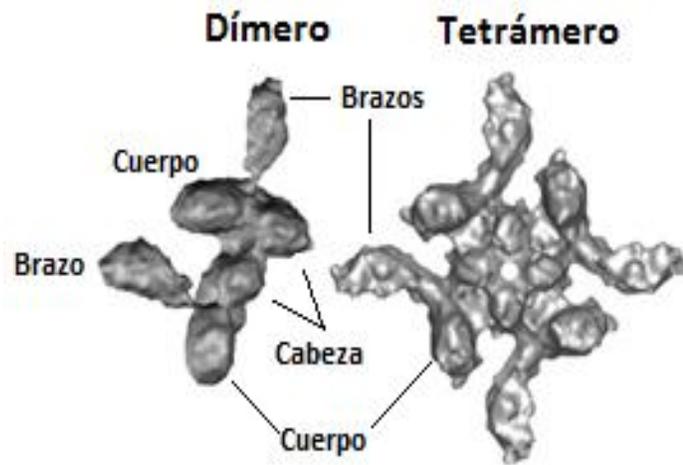


Figura 2. α -latrotoxina. Modificado de: “ α -latrotoxina: from structure to some functions” Ushkarov, Y. 2002. *Toxicon*, 40(1):2.

1.1.3 Mecanismo de acción de α latrotoxina

Una vez que el veneno de *L. mactans* es inyectado en el organismo, sus componentes son llevados por el sistema linfático hasta el torrente sanguíneo donde mediante circulación la α -latrotoxina es transportada y depositada en las terminaciones nerviosas de los músculos. El veneno también contiene sustancias como la hialuronidasa que permite la disgregación del tabique del tejido conectivo y que facilita la difusión de las toxinas; por lo tanto, una vez que se inyecta el veneno, no hay forma de disminuir la absorción ni de incrementar la eliminación de las toxinas (Castañeda Gómez *et al.*, 2012).

Existen dos mecanismos de acción de la α -latrotoxina a nivel de membrana celular. En el primero se inserta sobre la membrana plasmática, se forma un canal iónico no selectivo lo que provoca la despolarización de la membrana y el aumento del calcio intracelular (Finkelstein *et al.*, 1976; Rosenthal *et al.*, 1990; Hurlbut *et al.*, 1994).

En el segundo, la α -latrotoxina se une a receptores sinápticos específicos como neurexina 1 α (NRX 1 α), latrofilina 1 (LPH 1) y a un receptor tipo proteína tirosina fosfatasa σ (PTP σ) (Ushkaryov, 2008). Posteriormente ambos mecanismos desencadenan la liberación de neurotransmisores, como la acetilcolina y norepinefrina de las terminales nerviosas, causando espasmos musculares y dolor (Timms y Gibbons, 1986; Ushkaryov *et al.*, 2004).

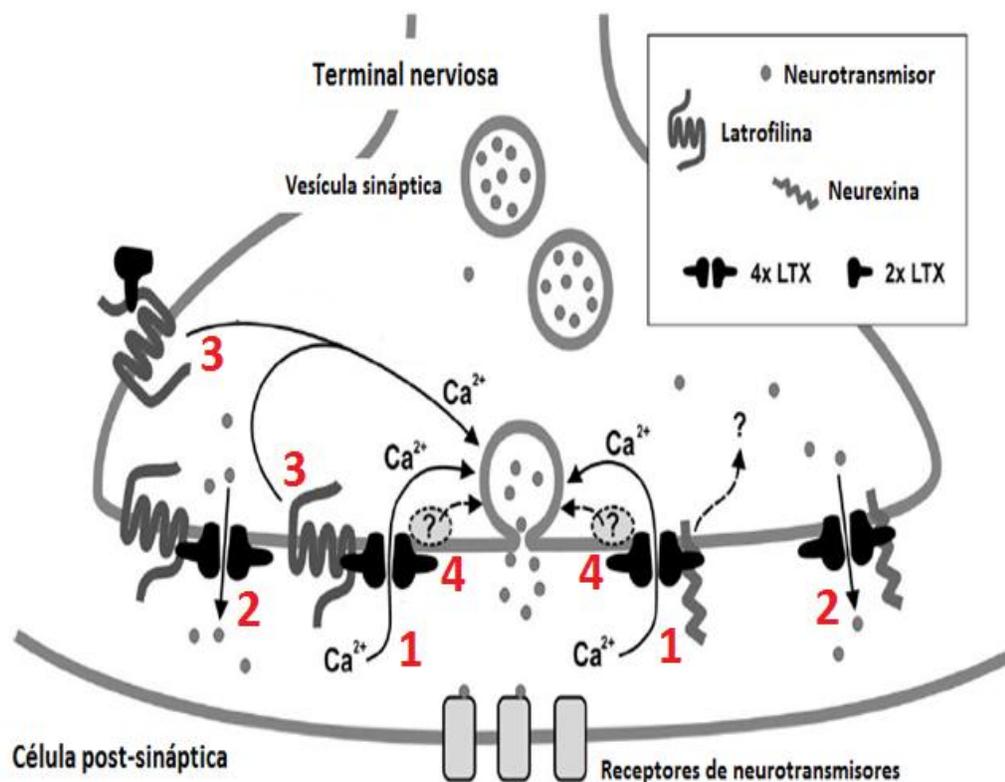


Figura 3. Múltiples mecanismos de acción de la α LTX al unirse a los receptores latrofilina y neurexina; 1) La α LTX se une a uno de los receptores y permite la entrada de calcio por el poro formado. 2) La α LTX se une a uno de los receptores y permite la salida de neurotransmisores a través del poro formado. 3) La α LTX se une a la latrofilina generando una señal para la liberación del calcio de los depósitos internos 4) Se propone una interacción directa entre la α LTX con el mecanismo de exocitosis independiente de calcio. Modificado de: "The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies". Ushkaryov Y.A., Volynski K.E., Ashton A.C *Toxicon*. 2004., 43 (5), 536.

1.1.4 Latroductismo

El latroductismo es el término clínico con que se conoce a los diversos síntomas que forman el cuadro clínico de una persona que ha sufrido envenenamiento por la mordedura de la araña *L. mactans* (Timms y Gibbons, 1986). La identificación de la mordedura se debe a la presencia de dos orificios pequeños provocados por la penetración de los quelíceros de la araña en la piel para inyectar el veneno.

Entre los principales síntomas del latroductismo se encuentran dolor local, enrojecimiento, inflamación y adormecimiento en la zona de la mordedura, los cuales, en algunas ocasiones, son seguidos de dolor de cabeza, calambres musculares, dolor abdominal así como de los músculos grandes (hombros y/o espalda), lo que resulta en un dolor considerable. En los casos severos se presentan náuseas, vómitos, desmayos, mareos, dificultades respiratorias, aceleración del ritmo cardiaco y aumento de la presión arterial (Timms y Gibbons 1986) (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos Clínicos del envenenamiento por *Latrodectus mactans*.

Sistema involucrado	Efecto
Cutáneo	Inicial (5 min-1 hora. después de la mordedura): dolor local. 1-2 horas: marca de la punción. Más de 2 horas: linfadenopatía, blanqueamiento central en el sitio de la mordedura con eritema circundante.
Cardiovascular	Taquicardia inicial seguida de bradicardia, arritmias, hipotensión e hipertensión.
Gastrointestinal	Náusea y vómito.
Hematológico	Leucositosis.
Metabólico	Hiper glucemia transitoria
Musculo esquelético	Hipertónia, rigidez abdominal, "facies latroductísmica"
Neurológico	Sistema nervioso central (SNC): psicosis, alucinación, alteración de la visión, convulsión. Sistema nervioso periférico (SNP): dolor local. Sistema nervioso autónomo (SNA): aumento en las secreciones, diaforesis, salivación, diarrea, lagrimeo, broncorrea, midriasis, miosis, priapismo.
Renal	Glomerulonefritis, oliguria y anuria.

Modificado de: Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 8va. Edición. 2006. McGraw-Hill, Medical Publishing Division. 1606.

La gravedad de la reacción ante la mordedura por viuda negra depende de la edad y condición física de la persona afectada, siendo los grupos más susceptibles los niños menores de 5 años y adultos mayores. La tasa de mortalidad por mordedura de viuda negra es baja sin embargo el número de casos clínicos de envenenamiento causados por esta araña es muy alto dada la frecuencia con que se está expuesto a estos organismos venenosos (Maretic, 1983; Muller, 1993).

En México, no se tiene un registro exacto de los casos de envenenamiento por viuda negra, ya que se reportan los accidentes como mordedura de araña sin especificar la especie, sin embargo se estima que de 3,000 a 5,000 personas son mordidas por alguna araña, entre ellas *L. mactans*. (Tay Zavala, *et al.*, 2004).

Sotelo Cruz y colaboradores (2006) mencionan la presencia de viuda negra principalmente en los estados de Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Sonora, Guanajuato, Jalisco, Aguascalientes, Morelos, Campeche, sin embargo en fechas recientes se ha observado un aumento importante de esta araña en Yucatán (Castañeda Gómez *et al.*, 2012). En el año 2010 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) publicó una alerta sobre el aumento de accidentes por mordedura de araña, en su mayoría por viuda negra y reportó que, cada año, en México alrededor de 3, 000 personas son víctimas del envenenamiento por *L. mactans* (Castañeda Gómez *et al.*, 2012).

1.2 Anticuerpos de tiburón

2.2.1 Anticuerpos

En vertebrados el sistema inmune es el encargado de la respuesta colectiva y coordinada a la introducción de elementos foráneos conocidos como antígenos, entre los que se incluyen microbios y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, entre otros. Las respuestas inmunes específicas generadas por la exposición a un antígeno, aumentan en magnitud y capacidad defensiva con cada

exposición, lo que genera la inmunidad adaptativa (Abbas *et al.*, 2007). Los anticuerpos son inmunoglobulinas (glucoproteínas) generadas por células plasmáticas en respuesta a un antígeno y contra todas las posibles sustancias extrañas que entran al organismo, además son los componentes principales de la inmunidad adaptativa humoral (Abbas *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008). Existen cinco clases de inmunoglobulinas (Igs) predominantes, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, las cuales difieren en sus propiedades biológicas, composición, tamaño y la forma en que se encuentran, ya sea como receptores de membrana o en circulación en el plasma (Alberts *et al.*, 2008).

Una anticuerpo convencional está constituido por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas, dos de ellas pesadas (H) y dos ligeras (L), las cuales se encuentran unidas mediante enlaces disulfuro (Figura 4). Tanto la cadena pesada como ligera presentan una región variable (V) localizada en el extremo amino-terminal así como una región constante (C) en el extremo carboxilo-terminal. En la región de unión a antígeno VH-VL se encuentran tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) las cuales interactúan con el antígeno, siendo la región CDR3 la de mayor variabilidad, confiriéndole al anticuerpo mayor especificidad y afinidad. Por lo tanto la región V es la responsable de la unión a antígeno y la región C definen las funciones efectoras de cada clase de Ig (Abbas *et al.*, 2007).

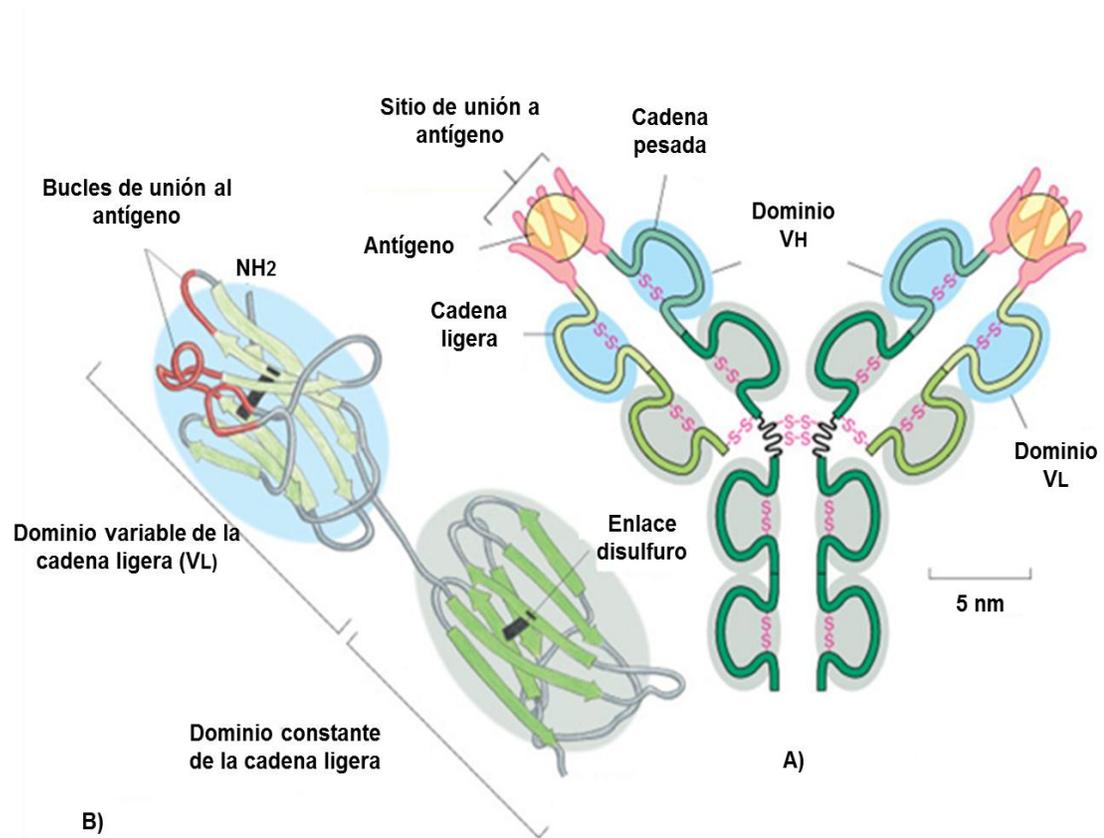


Figura 4. Estructura en Y de un anticuerpo convencional. A) Esquema de un anticuerpo convencional B) Dibujo de listón de una cadena ligera mostrando en color rojo las partes del dominio VL involucradas en la unión al antígeno. Modificado de: Essential Cell Biology, 2 edición. Alberts, *et al.* 2004. Garland Science. 150.

1.2.2 Anticuerpos IgNAR

Los peces cartilaginosos, como son los tiburones, poseen un avanzado sistema inmune adaptativo el cual se compone principalmente de inmunoglobulinas (Ig), receptores de células T (TCR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Dentro del grupo de las inmunoglobulinas se han identificados IgM, IgW y IgX así como un isotipo de anticuerpo poco convencional denominado IgNAR (por el término en inglés New Antigen Receptor) (Greenberg *et al.* 1995; Nuttall *et al.* 2001).

Los IgNAR fueron descubiertos en el tiburón nodriza (*Gynglymostoma cirratum*) (Greenberg *et al.* 1995), sin embargo estudios posteriores corroboraron la presencia de este isotipo en el suero de otras especies de tiburón tales como, *Orectolobus maculatus* (Nuttall *et al.* 2000; 2001), *Mustelus canis* y *Squalus acanthias* (Liu *et al.* 2007).

El anticuerpo IgNAR es un homodímero que se compone de dos cadenas pesadas unidad por enlaces disulfuro y no presenta cadenas ligeras (Figura 5). Las cadenas pesadas constan de cinco dominios constantes (cNAR) y uno variable (vNAR), estos últimos son independientes y cada uno funciona como un sitio de unión al antígeno (Roux *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1995). En el sistema inmunológico adaptativo en vertebrados, la especificidad y la memoria la proveen los dominios variables de los anticuerpos (Criscitiello *et al.*, 2006).

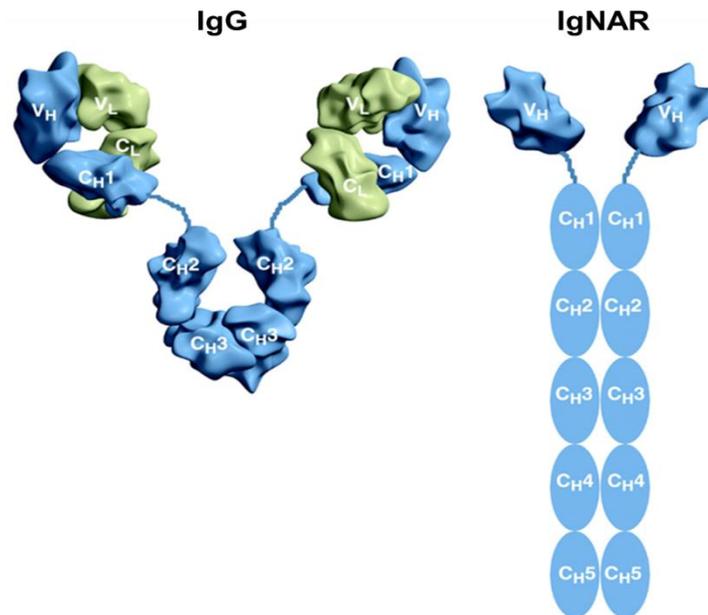


Figura 5. Representación esquemática de una IgG de ratón/humana y de un IgNAR. Modificado de: "Crystal structure of a shark single-domain antibody V región in complex with lysozyme", Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A. 2004. Science. 305 (569): 1770.

La región variable del IgNAR (Figura 6) es generada por cuatro eventos de recombinación, dando como resultado un repertorio CDR3 altamente diverso, en términos de longitud y de secuencia y una vez que se tiene contacto con un antígeno, este repertorio aumenta rápidamente a consecuencia de mutaciones (Díaz, 1998). El CDR3 de los fragmentos de anticuerpo vNAR es normalmente mucho más largo que el de los dominios variables convencionales, lo cual les permite penetrar en sitios de los antígenos inaccesibles para otros anticuerpos. Además el enlace disulfuro entre esta región y el CDR1 le confieren mayor estabilidad (Wesolowski *et al.*, 2009).

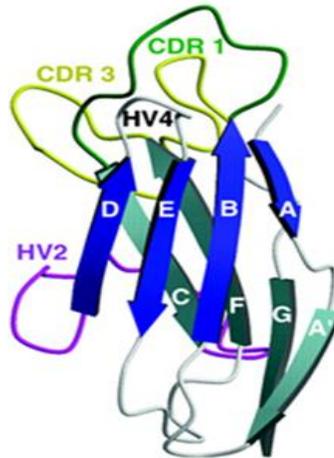


Figura 6. Dominio variable de un IgNAR. Modificado de: “Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme”, Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik, M.F., Wilson, I.A. 2004. Science. 305 (569): 1772.

Se han identificado tres isotipos de IgNAR con variaciones en el número y configuración de residuos de cisteínas, así como en el tiempo en el que aparecen y se desarrollan en el tiburón (Rumfelt *et al.* 2004). El IgNAR clase I presenta dos o cuatro cisteínas en el CDR3 y dos cisteínas más en las secuencias altamente conservadas o “framework” (FR) dos y cuatro, este isotipo forma del repertorio del tiburón adulto. El IgNAR clase II, presenta una cisteína no canónica en el

CDR3 y una en el CDR1, también se encuentra en tiburones adultos. Por último el IgNAR clase III presenta un residuo de triptófano en el CDR1 y solo se encuentra en las primeras etapas del desarrollo de los tiburones como defensa antes de la aparición de las otras clases de inmunoglobulinas NAR y desaparece cuando han llegado a la etapa adulta (Roux *et al.*, 1998; Nuttall *et al.*, 2001, 2003; Streltsov *et al.*, 2004).

En general los anticuerpos son una herramienta muy importante en la investigación experimental y en las aplicaciones médicas. Gracias a la tecnología de ADN recombinante es posible obtener estos anticuerpos y producirlos en un sistema de expresión bacteriano. Las limitantes que presentan los anticuerpos completos al ser utilizados como terapia o en el área de diagnóstico, han generado la necesidad de utilizar fragmentos más pequeños y con menor vida media (EIBakri *et al.*, 2010).

Los anticuerpos de cadena pesada de los tiburones poseen una región variable (vNAR) que se puede obtener como fragmento de anticuerpo recombinante y conservar la especificidad que poseen los IgNAR, además debido a sus características estructurales, los dominios vNAR muestran alta estabilidad bajo condiciones que de otro modo podrían comprometer la integridad de los anticuerpos tradicionales (Griffiths *et al.*, 2013). Estos fragmentos tienen otras ventajas como alta especificidad, termoestabilidad, tamaño más pequeño (~12 a 15 kDa), rapidez de difusión y de permeabilidad en los tejidos, mayor distribución corporal de un Fab o una IgG, así como la posibilidad de tener menores costos en su producción. Estas características los convierten en candidatos para su utilización en una gran variedad de aplicaciones terapéuticas, entre ellas la neutralización de venenos.

1.3 *Heterodontus francisci* (Girard, 1854)

El tiburón cornudo (*Heterodontus francisci*) es una especie endémica de la costa occidental de América del Norte con una distribución que abarca desde California (EUA) hasta el Golfo de California (Mex) (Figura 7). Habita la zona intermareal entre los 2 y 11 m de profundidad, sin embargo en invierno es común encontrarlo a más de 30 m. Las características morfológicas distintivas de este organismo incluyen una cabeza corta con crestas sobre sus ojos, dos espinas en su dorso y una coloración marrón o gris, con manchas oscuras (Figura 8). El tamaño promedio de estos organismos es de 97 cm.



Figura 7. Distribución geográfica de *Heterodontus francisci*. “Native Distribution Map for *Heterodontus francisci* (Horn shark)”. www.aquamaps.org, version de Aug. 2010.

El tiburón cornudo es un depredador solitario que cazan en la noche y se refugia durante el día, son inofensivos a menos que sean acosados. Se alimenta de una gran variedad de invertebrados bentónicos (gasterópodos, cangrejos, camarones y calamares) y de pequeños peces teleósteos. (Compagno, 1984, 2001; Castro, 1983; Stevens, 1987).



Figura 8. *Heterodontus francisci*. “Catálogo de tiburones, rayas y quimeras (Chondrichthyes) que habitan en las aguas del norte del Golfo de California”, Santana Morales, O., Castillo Géniz, J.L., Sosa Nishizaki, O., Rodríguez Medrano, C. 2004. Laboratorio de Ecología Pesquera. CICESE. 44.

Esta especie no posee valor comercial, sin embargo su importancia radica en su empleo con fines de investigación. Debido a su fácil manejo y mantenimiento en cautiverio, así como longevidad en estas condiciones (10 años aproximadamente), el tiburón cornudo es un candidato idóneo para su empleo en el área de investigación (Compagno, 1984, 2001; Castro, 1983; Stevens, 1987).

Esta especie no posee valor comercial, sin embargo su importancia radica en su empleo en el área de investigación. La Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza (UICN) ubica a *H. francisci* en la categoría de Datos Insuficientes (DD) por lo que no se considera en peligro de riesgo, como lo pueden estar otras especies de tiburón. Por otro lado, considerando que se distribuye en la región norte de Baja California, la obtención de organismos en condiciones óptimas no representa un problema logístico mayor, lo que aunado a su fácil manejo y mantenimiento en cautiverio, así como a su longevidad en estas condiciones (10 años aproximadamente), hacen del tiburón cornudo un candidato idóneo para su empleo con fines científicos (Compagno, 1984, 2001; Castro, 1983; Stevens, 1987).

1.4 Técnica de Despliegue en fagos

Los bacteriófagos filamentosos son un grupo de virus que infectan bacterias y que contienen ADN circular de una sola hebra. Existe una clase de bacteriófagos que infecta solo bacterias de las cepas de *E. coli* y que durante la infección, ensamblaje en la membrana de la bacteria así como en la salida de las partículas virales, no causa la lisis celular o muerte bacteriana (Vispo, 2004). Estos fagos presentan una proteína de la cubierta denominada pIII, la cual es la responsable de la unión del fago con el pilus de la bacteria, iniciándose así el proceso de infección durante el cual el ADN viral de cadena sencilla es replicado (Smith y Petrenko, 1997).

La tecnología o sistema de despliegue en fagos consiste en la exposición de proteínas (péptidos o anticuerpos) en la superficie de partículas de fagos, mediante la fusión del gen de esta proteína al gen que codifica una proteína de la cápside del fago como la proteína pIII o pVIII (Smith y Petrenko, 1997).

Los fagos que presentan anticuerpos en su superficie, pueden ser seleccionados con un antígeno de interés, el cual debe tener cierta afinidad a dicho anticuerpo. Para este proceso de selección de fagos (Figura 9), comúnmente llamado *panning*, es necesario contar con una biblioteca de anticuerpos a partir de la cual se seleccionaran anticuerpos de interés (Barbas, et al. 2001). Todos los fagos que no se unan al antígeno son eliminados mediante sucesivos lavados, mientras que los fagos capturados son eluidos y utilizados para infectar *E. coli*. Este proceso permite la amplificación de estos fagos para ser utilizados en un nuevo ciclo de selección. De esta forma, se puede seleccionar una gran población de fagos que expresen anticuerpos en su superficie que se unan de forma específica al antígeno de interés (Smith y Petrenko, 1997, Barbas, et al. 2001).

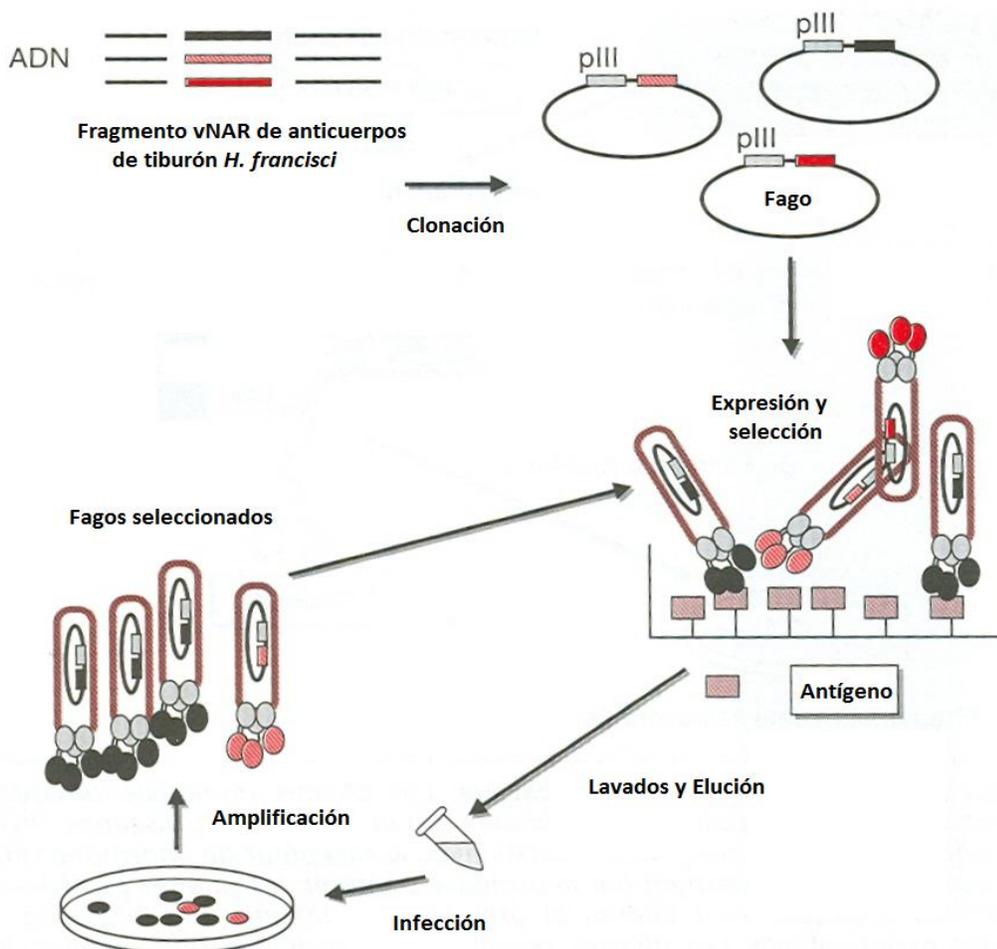


Figura 9. Rondas de selección de un repertorio de anticuerpos expresado en la superficie de fagos. Modificado de "Presentation a la surface de phages filamenteux: les multiples applications du phage display", Soriau, C., Hua, T.D., Lefranc, M.P. Weill, M. 1998. *Médecine/sciences*. 3 (14): 303.

2. Antecedentes

La generación de nuevo conocimiento así como el desarrollo de técnicas biotecnológicas innovadoras han ido de la mano con la generación de antivenenos empleados en el tratamiento de mordeduras de animales venenosos, siendo las inmunoglobulinas parte fundamental de este desarrollo.

Los antivenenos de primera generación son sueros de animales inmunizados. En 1890 se desarrolló el primer antiveneno, dando inicio a la seroterapia, pero fue unos años más tarde que se comercializó el primero de origen equino. El protocolo a seguir (sigue siendo) es la inmunización de animales (principalmente caballos) con dosis crecientes de veneno, con el objetivo de aumentar los anticuerpos neutralizantes sin afectar al animal en cuestión. Calmette desarrolló este protocolo en 1895 y fue uno de los pioneros en el uso de antivenenos. Los de segunda generación consisten de inmunoglobulinas G (IgG) purificadas y concentradas, los cuales se siguen utilizando hasta la fecha. Finalmente, la tercera generación de antivenenos o faboterapia, consiste en el uso de los fragmentos $F(ab)_2$ (por el término en inglés antigen-binding fragment) de las IgG. Se utiliza la digestión enzimática con pepsina o papaína para la obtención de estos fragmentos (Espino Solís *et al.* 2009). (Figura 10). El antiveneno que actualmente se comercializa para el envenenamiento por mordedura de viuda negra, pertenece la tercera generación, tal es el caso de Aramyn Plus® hecho en México por Instituto Bioclon S.A. de C.V. y distribuido por Laboratorios Silanes S.A. de C.V.

La utilización de todos estos tipos de anticuerpos sigue presentando desventajas como antivenenos. Una de estas desventajas es la variación en el poder neutralizante según la respuesta inmune del animal inmunizado, provocando variaciones entre un lote a otro (Chippaux y Goyffon, 1991). Además se corre el riesgo de que la persona a la que se le ha administrado el antiveneno, sufra una reacción alérgica o choque anafiláctico causado por las proteínas presentes en el suero del animal inmunizado (Newcombe y Newcombe, 2007).

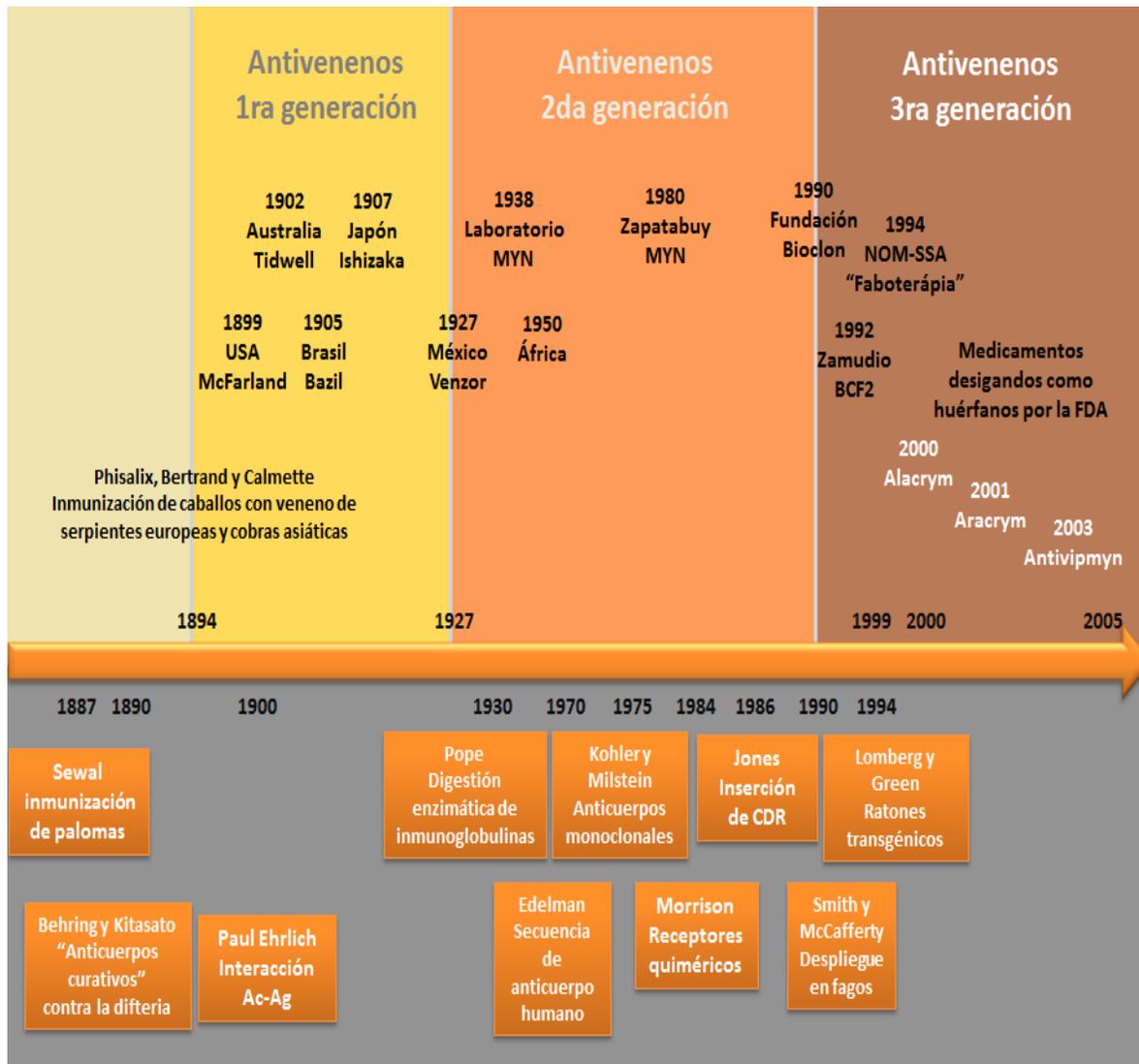


Figura. 10. Desarrollo de antivenenos y generación de conocimiento del uso de antivenenos y de anticuerpos. Modificado de: "Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives" Espino-Solís, G.P., L. Riaño-Umbarila, B. Becerril y L.D. Possani. 2009. Journal of Proteomics. 72 (2): 185.

Los anticuerpos recombinantes o antivenenos de cuarta generación, representan la posibilidad de utilizar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con capacidad de reconocimiento y neutralización del veneno, sin necesidad de utilizar animales inmunizados. Sin embargo, para que estos antivenenos sean efectivos, es indispensable la identificación de los componentes responsables de la toxicidad del veneno (Possani, 2001; ElBakri *et al.*, 2010).

En el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada se han obtenido fragmentos tipo vNAR de anticuerpos de tiburón a partir de bibliotecas inmunes y no inmunes, neutralizantes de venenos de alacrán (García Gómez, 2005; Montoya Bonillas, 2009) y de araña (Olivares Quintero, 2012; Barrón García, 2012).

Una ventaja de utilizar fragmentos de anticuerpos recombinantes es que permite generar diferentes formatos de unión al antígeno, así sus propiedades farmacocinéticas se podrán ajustar a los perfiles toxicocinéticos de cada tipo de veneno (Gutiérrez *et al.*, 2003), lo que aumentará la eficiencia de neutralización del veneno e inactivación rápida de las toxinas presentes en el veneno (Holliger y Hudson, 2005; Wesolowski *et al.*, 2009). Además pueden reducir el riesgo de provocar reacciones inmunológicas indeseadas en el organismo, como aquellas causadas por los antivenenos de segunda y tercera generación.

3. Justificación

Actualmente en el tratamiento contra el envenenamiento por mordedura de la araña viuda negra se emplean antivenenos de tercera generación los cuales consisten de fragmentos $F(ab)_2$ de origen equino. Aun cuando se emplean con éxito, su principal desventaja es la potencial reacción alérgica o choque anafiláctico que pudieran generar en algunos pacientes debido a la presencia de algunos componentes del suero del caballo. Con respecto a su producción, se tiene el inconveniente de la variación en el poder neutralizante así como en los tiempos para su obtención.

Dadas las características de los fragmentos vNAR, como son tamaño pequeño (~12 a 15 kDa), rapidez de difusión y permeabilidad en tejidos, alta especificidad, termoestabilidad, CDR3 diverso y largo, los convierten en candidatos idóneos para su empleo en la neutralización de venenos. Adicionalmente al ser proteínas recombinantes se tiene la ventaja de producirlos de manera rápida, eficiente y con menores costos, por lo que en este proyecto se propone la obtención de un vNAR con capacidad de neutralizar el veneno de *L. mactans* que pueda ser utilizado como una alternativa en el tratamiento del envenenamiento por esta araña.

4. Hipótesis

En el repertorio inmunológico *Heterodontus francisci* existe al menos un IgNAR capaz de neutralizar el veneno de *Latrodectus mactans*.

5. Objetivo general

Obtener fragmentos tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad neutralizante de las toxinas presentes en el veneno de la araña *Latrodectus mactans*.

5.1 Objetivos particulares

- Obtener una biblioteca inmune de fragmentos vNAR de anticuerpos del tiburón *H. francisci*, inmunizado con veneno total de la araña *Latrodectus mactans*.
- Bioseleccionar los fragmentos vNAR de anticuerpo mediante la técnica de despliegue en fagos.
- Evaluar de la capacidad de reconocimiento y afinidad de los fragmentos vNAR para el veneno de *L. mactans* mediante ensayos *in vitro*.
- Evaluar el potencial de neutralización de los fragmentos vNAR para el veneno de la araña *L. mactans* mediante ensayos *in vivo* en ratones.

6. Materiales y métodos

6.1 Inmunización

6.1.1 Inmunización del tiburón *Heterodontus francisci* con veneno total de la araña *L. mactans*.

Se utilizó un tiburón *Heterodontus francisci* al cual se le administraron previamente 24 dosis de 200 ng de veneno total de la araña *L. mactans* proporcionado por Laboratorios Silanes, S.A. de C.V. A partir del junio del 2011 se continuó con la inmunización del tiburón con tres dosis más, las cuales se aplicaron por vía intravenosa empleando como vehículo amortiguador PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 1.8 mM, pH 7.4). Con el propósito de evaluar los títulos de anticuerpos, entre cada inmunización, se extrajo sangre de la vena caudal a partir de la cual se recuperó el suero mediante centrifugación (1,000 x g, 5 min). Los sueros fueron almacenados a -70 °C hasta su evaluación.

Tabla 2. Esquema de inmunización del tiburón *Heterodontus francisci* a partir de junio 2011.

Fecha	Sangrado	Inmunización
10 de junio del 2011		X
17 de junio del 2011	X	
24 de junio del 2011		X
1 de julio del 2011	X	
22 de Julio del 2011		X
29 de julio del 2011	X	

6.1.2 Ensayo ELISA del suero de tiburón inmunizado con veneno total de la araña *L. mactans*

La presencia de anticuerpos contra el veneno de la araña *L. mactans* en los sueros del tiburón inmunizado se evaluó mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA (acrónimo del inglés de Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay).

Para ello se utilizó una placa ELISA Costar EI/RI de poliestireno (Corning, Inc.) donde se inmovilizó 250 ng de veneno total de la araña *durante* 1 h a 37 °C. Posteriormente se bloqueó con 150 µl de con BSA 3% (Albúmina de Suero Bovino) en PBST (Tween-20 0.05% en PBS 1X), se incubó en las mismas condiciones y se lavó tres veces con PBST. Se agregó el suero del tiburón [1 µl de suero y 49 µl de BSA 1% (p/v)] se incubó en las mismas condiciones y se hicieron tres lavados con PBST. Un volumen de 50 µl de anticuerpo anti-tiburón (1:5 000) fue agregado, se incubó mismas condiciones y lavó tres veces con PBST. Se adicionaron 50 µl de anticuerpo anti-anti-tiburón RAY-HRP (1:1 000), se incubó misma condiciones y se hicieron tres lavados con PBST. Finalmente se adicionaron 50 µl de solución reveladora ABTS 20 mg/ml (ácido 2,2'-azino-bis(3-elitbenzotiazolin-6-sulfónico) en buffer de citratos (ácido cítrico 50 mM, Na₃C₆H₅O₇ ·H₂O 50 mM, pH 4.1) y peróxido de oxígeno al 30% (H₂O₂), se incubó en oscuridad a temperatura ambiente por 15 min y se determinó su absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA (BioRad). El ensayo se realizó por triplicado, como control negativo se utilizó BSA al 1% y como positivo el suero de un tiburón inmunizado contra otro antígeno.

6.2 Obtención de una biblioteca inmune de fragmentos vNAR de anticuerpos de tiburón.

6.2.1 Extracción del bazo del tiburón *Heterodontus francisci* inmunizado para obtención de ARN total.

En condiciones de asepsia se sacrificó el tiburón *Heterodontus francisci* previamente inmunizado. El material empleado fue lavado con agua con dietil-pirocarbonato al 0.1% (DEPC) para evitar la acción de las enzimas ribonucleasas (ARNasas). Por disección se extrajo el bazo, se lavó con agua con DEPC 0.1% y se homogenizó en 20 ml de TRI Reagent (Sigma) con un homogenizador mecánico. La muestra se centrifugó (12, 000 x g, 10 min, 4 °C), se recuperó el sobrenadante en un tubo cónico limpio y se agregaron 10 ml de isopropanol. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante se decantó y el precipitado formado en el fondo del tubo se lavó con 20 ml de etanol 75%. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 1 ml de agua con DEPC. Se hicieron alícuotas tres alícuotas y se almacenaron a -80 °C. La concentración del RNA se determinó mediante un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare). La calidad de ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a la metodología propuesta por Masek y colaboradores (2005).

6.2.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y Amplificación del fragmento vNAR.

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizaron 2 reacciones de retrotranscripción empleando el kit Superscript® III First Strand Synthesis Supermix de Invitrogen. En un tubo estéril de 0.2 ml se mezclaron 5 µg de ARN total de bazo de tiburón, 1 µl de dNTP 10mM y 0.5 µl de oligonucleótido reverso R564 10 mM (Tabla 3) y se completó la reacción con agua con DEPC para un

volumen final de 8 μ l. Se incubó a 65°C por 5 min y en hielo por 1 min. Posteriormente se agregaron 4 μ l de 5X First strand buffer, 1 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l del RNase OUT y 2 μ l de enzima SuperScript III RT. La mezcla se incubó a 55 °C por 60 min y a 70 °C por 15 min. Las reacciones se almacenaron a -20° hasta su posterior análisis.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación y la secuenciación.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
F557	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCGCACGGCTTGAACAAACACC
F558	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCCAACGGGTTGAACAAACACC
F559	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCACAAGGGTAGACCAAACACC
F560	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCGCAAGGGTGGACCAAACACC
F561	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCGCATGGGTAGACCAAACACC
F562	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCGCAAGCCTGGACCAAACACC
F563	AGGCGGGGCC C AGGCGGCCATGGCCGCATTGACGGACCAAACACC
R564	GTGGAGCAGG CCGGCCTGGCCCG TTTCACAGTCAGCACGGTGCCAGCTC
Ompseq	AAGACAGCTATCGCGATTGCAG
Gback	GCCCCCTTATTAGCGTTTGCCATC

*En negritas se indica el sitio de restricción para la enzima Sfi I

Los fragmentos variables de IgNAR (vNAR) fueron amplificados mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR del término en inglés Polymerase Chain Reaction) con una mezcla de siete oligonucleótidos sentido (F557, F558, F559, F560, F561, F562 y F563) y uno antisentido (R564) los cuales son

específicos para amplificar los fragmentos variables de IgNAR e incluyen un sitio de restricción para la endonucleasa *Sfi* I (Tabla 3). El volumen de cada reacción de PCR fue de 25 μ l la contenía amortiguador de Green GoTaq Flexi 1X, $MgCl_2$ 3 mM, 0.2 mM de cada nucleótido, 0.4 μ M de cada oligonucleótidos sentido, 0.8 μ M de oligonucleótido antisentido, 1U de GoTaq® DNA Flexi polimerasa (Promega) y 2 μ l de ADNc. Las condiciones del PCR empleadas se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para la reacción de PCR.

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	2 min
	95 °C	30 s
30	49 °C	45 s
	72 °C	45 s
1	72 °C	10 min
	4 °C	∞

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en un gel de agarosa (1.8 %). Una vez que se corroboró el tamaño de las bandas, se procedió con su recuperación mediante el kit comercial QIAquick gel purification (Quiagen).

6.2.3 Obtención del vector pComb3X

El vector utilizado en este trabajo fue el pComb3X-scFv (Barbas *et al.* 2001). Algunas de las características de este vector incluyen: sitios de restricción para la endonucleasa *Sfi* I para la inserción de un gen y su despliegue en fago, el promotor LacZ inducible por IPTG (isopropil- β -D-tio-galactósido) que promueve su expresión, un gen de resistencia a ampicilina, secuencias específicas que

permiten su purificación (6xHis) e inmunodetección (HA) así como un codón de paro ámbar para detener la traducción de la proteína de interés.

Con el propósito de obtener plásmido en cantidad suficiente para este trabajo, se llevó a cabo su purificación mediante lisis alcalina a partir de células *E. coli* TOP 10 que contenían este vector. Se inocularon por triplicado 3 ml de medio LB (Luria Bertani) con carbencilina (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, Carbencilina 100 µg/ml) con una colonia aislada y se incubó a 37°C por 12 hrs a 250 rpm. Las células del cultivo fueron recuperadas en un tubo de microcentrífuga mediante centrifugación (16,000 x g, 5 min) y resuspendidas en 100 µl de solución GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH8 25mM, EDTA 10mM) y ribonucleasa A 10 mg/ml (2%). Se agregaron 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH) y dodecilsulfato sódico (SDS) [NaOH 0.2M, SDS 1%], se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Se adicionaron 150 µl de Acetato de potasio 5M pH 4.8, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó (16,000 x g, 15 min) y el sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga (≈400 µl). Se adicionaron 800 µl de etanol, se incubó a -75 °C por 30 minutos y se centrifugó (16, 000 x g, 15 min). El sobrenadante se descartó, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó. Nuevamente se descartó el sobrenadante y el precipitado (ADN) una vez secado, se resuspendió en 30 µl de agua desionizada estéril. El vector purificado fue cuantificado con un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare) y evaluado su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%).

6.2.4 Digestión del fragmento vNAR y del vector de clonación pComb3x

Los fragmentos vNAR y el plásmido pComb3X-scFv obtenidos en los apartados 6.2.2 y 6.2.3, respectivamente, fueron digeridos con la endonucleasa *Sfi I* (Promega).

El volumen de reacción fue de 20 μ l y contenía 10 μ g de vector, 5 U de la enzima Sfi I, amortiguador de la enzima de restricción 1X y BSA acetilado 0.1 μ g/ μ l. La reacción se incubó 5 hrs a 50 °C e inactivada a 65 °C por 10 min. En el caso de los fragmentos de vNAR la cantidad utilizada fue de 1.8 μ g.

Una vez concluida la digestión del vector, esta fue analizada mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa (1%). Las bandas correspondientes a los fragmentos de 3,350 pb (vector cortado en sus dos sitios de restricción) y 750 pb (fragmento de relleno) fueron escindidas y purificadas mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen). En el caso de los fragmentos vNAR estos fueron purificados directamente mediante el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen).

6.2.5 Preparación de células electrocompetentes *E. coli* cepas ER2537.

Se prepararon alícuotas de células electrocompetentes de *E. coli* cepas ER2537 y TOP10F'. A partir de una colonia aisladas en placas con medio LB sin antibiótico se inocularon 15 ml de medio Super Broth (SB) sin antibiótico (Tryptona 3.2%, Extracto levadura 2%, NaCl 0.5%, pH 7.5) y se incubó con agitación (250 rpm) a 37 °C por 12 h. Posterior al tiempo de incubación se tomaron 3.0 ml del cultivo para inocular 500 ml de medio SB suplementado con 10 ml de glucosa 20% y 5 ml de MgCl₂ 1 M y se incubó mismas condiciones. Cuando el cultivo alcanzó una densidad de DO₆₀₀= 0.7 fue transferido a tubos cónicos de 50 ml los cuales se incubaron en hielo por 20 min. Se centrifugó (4,500 rpm, 20 min, 4 °C) y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 50 ml de glicerol al 10% frío, se centrifugó nuevamente, mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. El proceso descrito anteriormente se repitió tres veces más reduciendo el número de tubos a 5, 2 y 1, respectivamente. Cabe mencionar que en este proceso los tubos siempre se mantuvieron en hielo. El concentrado final

de células se resuspendió con 2.0 ml glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 50 μ l, 100 μ l y 300 μ l las cuales se almacenaron a -75 °C.

6.2.6 Ligación de la biblioteca de vNAR y del vector pComb3x a pequeña escala.

A partir de los fragmentos vNAR y el vector obtenido previamente (6.2.4) se procedió a su ligación a pequeña escala empleando la enzima T4 ligasa (Promega). Como control positivo se la reacción de ligación se empleó el vector digerido y el fragmento de relleno. El volumen de cada reacción fue de 20 μ l y se emplearon 5 U de T4 ligasa, amortiguador de ligación 1X y 100 ng de vector en una proporción 1:1, 1:3 y 1:5 (vector:inserto). Posterior a su incubación por 12 h a temperatura ambiente, la enzima fue inactivada a 65 °C por 15 min y la reacción almacenada a -20 °C hasta su empleo posterior.

6.2.7 Transformación

Los productos de cada ligación se emplearon para transformar de células electrocompetentes *E. coli* ER2537. La mezcla de 50 μ l de células electrocompetentes y 2 μ l de la reacción de ligación fue transferida a una celda para electroporar estéril (0.2 mm) previamente enfriada y se electroporó con un electroporador Micropulser (BioRad) a 200 Ω , 2.5kV y 25 μ F y 4 ms. Las células se recuperaron con 3 ml de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa) e incubaron durante 1 h a 37 °C y 250 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 7 ml de medio SB, se tomaron 10 μ l y 100 μ l del cultivo y se sembraron en placas con medio LB agar con carbenicilina (100 μ g/ μ l) las cuales se incubaron por 12 h a 37 °C. Dado que el vector posee el gen de resistencia a este antibiótico, el crecimiento de colonias nos indicaría que las células fueron transformadas

exitosamente. La eficiencia de la ligación y transformación se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC).

El cálculo del tamaño de la biblioteca se realizó por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{volumen final de la ligación}}{\text{volumen de la ligación transformada}} \times \text{número de UFC} \times \frac{\text{volumen de cultivo}}{\text{volumen de siembra}} = \frac{\text{número total}}{\text{de transformantes}} \quad (1)$$

6.2.8 PCR de colonia

Se seleccionaron 15 colonias al azar obtenidas en el paso anterior (6.2.6) para su análisis mediante PCR de colonia y determinar la presencia de fragmentos vNAR. Para la reacción de PCR de colonia se emplearon los oligonucleótidos ompseq y gback (Tabla 2). El volumen de reacción de PCR fue 25 μ l, la cual contenía amortiguador de PCR 1X, MgCl₂ 3 mM, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP's) 0.2 mM, oligonucleótidos ompseq 0.2 μ M, oligonucleótido gback 0.2 μ M, 1.25 U de GoTaq Flexi DNA polimerasa (Promega) y como templado un fragmento de la colonia. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las especificadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de PCR de colonia

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95° C	2 min
30	95° C	30 s
	58° C	45 s
	72° C	45 s
1	72° C	10 min
	4° C	∞

Los productos de la amplificación fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.8%.

A partir de las clonas que presentaron el fragmento de tamaño esperado se hizo un cultivo con 3 ml de medio LB con carbenicilina (100 mg/ml) y se purificó el plásmido mediante lisis alcalina (Sambrook y Russel, 2001). El ADN purificado fue evaluado en un gel de agarosa (0.8%) y cuantificado con un espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare).

6.2.9 Secuenciación

Los plásmidos purificados fueron enviados a la empresa Seqxcel, (San Diego, California) para su secuenciación de acuerdo a las indicaciones sugeridas por la misma. Cada reacción consistió de 1µg de plásmido y 6.4 pmol de oligonucleótido gback en un volumen final de 12µl.

Una vez que se recibieron las secuencias, estas fueron analizadas con los servidores Expasy Bioinformatic Resource Portal (<http://expasy.org/>) y el paquete informático Multiple Sequence Alignment (Corpet, 1988). Las características analizadas en cada secuencia fueron: la presencia de fragmentos vNAR, la ausencia de sitios de paro dentro del fragmento vNAR y su correcto marco de lectura. Finalmente las secuencias con estas características fueron seleccionadas y comparadas con las previamente aisladas en trabajos previos.

6.2.10 Ligación de la biblioteca de vNAR y del vector pComb3x a gran escala

La reacción de ligación a gran escala se realizó en un volumen final de 200 µl los cuales contenían amortiguador de ligación 1X, 1.3 µg de vector pCOMb3X digerido, 400 ng de los fragmentos vNAR y 10 U de T4 ligasa. La reacción se incubó por 12 h a temperatura ambiente.

6.2.11 Precipitación de la reacción de ligación

El volumen total de ligación a gran escala se mezcló con las ligaciones a pequeña con el propósito de concentrarla mediante precipitación. A los 250 μ l de reacción de ligación se adicionó 1 μ l de glicógeno, 25 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 550 μ l de etanol. La mezcla se incubó (12 h, -80 °C) y se centrifugó (16, 000 x g, 15 min, 4 °C). Se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado dos veces con 1 ml de etanol 70% y se secó. El precipitado se resuspendió en 30 μ l de agua desionizada estéril y se almacenó a -20 °C hasta su empleo.

6.3 Selección de fragmentos vNAR específicos de la biblioteca inmune.

6.3.1 Preparación de fago ayudador (VCSM13)

Con el propósito de contar con fago ayudador (VCSM13) recién preparado, 2 ml de medio SB inoculado con 2 μ l de células *E. coli* ER2738 e incubado por 1 h a 37 °C fue infectado con 1 μ l de una dilución de 10^{-4} de fago ayudador VCSM13. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y se sembró en placas de LB agar las cuales fueron incubadas por 12 h a 37 °C. Al siguiente día, 10 ml de medio SB inoculados con 10 μ L de células *E. coli* ER2738 fueron incubados por 1 h a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, al cultivo se agregó una colonia aislada, de las placas LB sembradas el día anterior, y se incubó por 2 h, a 37 °C y 250 rpm). El cultivo fue transferido a un matraz de 2 L con 500 ml de medio SB y 700 μ L de kanamicina (50 mg/ml), y se incubó por 12 h, mismas condicione. El cultivo se vació a tubos cónicos de 50 ml y centrifugado (3, 000 x g, 20 min) previa incubación a 70 °C por 20 min. El sobrenadante se decantó a tubos nuevos y se almacenó a 4 °C.

Para determinar la eficiencia de infección, se hizo un cultivo de 2 ml de medio SB con 2 μ l de células y se incubó 1 h a 37 °C y 250 rpm. Un volumen de 50 μ l de este cultivo se infectó con diferentes diluciones del fago ayudador (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}),

se incubaron por 15 min a temperatura ambiente y se sembraron en cajas de LB agar por 12h a 37 °C. Se registró el número de colonias y se calculó la eficiencia de transformación.

6.3.2 Amplificación de la biblioteca inmune

A partir de los 30 µl de la ligación obtenida en el paso anterior se llevaron a cabo cuatro electroporaciones como se describe en el apartado 6.2.7. En cada electroporación se emplearon 7.5 µl de la reacción ligación y 100 µl de células electrocompetentes *E. coli* ER2738 las cuales fueron recuperadas con 2 ml de medio SOC. Las células recuperadas se incubaron por 1 h (37 °C, 250 rpm) en un tubo cónico, posterior a este tiempo se adicionaron 7 ml de medio SB y 3.0 µl de carbenicilina (100 µg/µl). Se tomaron alícuotas de 10 µL y 100 µL del cultivo y se sembraron en placas con medio LB agar con carbenicilina (100 µg/µl) las cuales se incubaron a 37 °C por 12 h. El resto del cultivo (15 ml) se incubó por 1 h más, mismas condiciones. Posterior a ese tiempo se adicionó 4.5 µl de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó por otra 1 h. El cultivo fue transferido a un matraz de 500 ml al que se le agregaron 2 ml de fago ayudador VSCM13, 185 ml de medio SB y 92.5 µl de carbenicilina. Se incubó por 2h, se adicionaron 280 µl de kanamicina (50 mg/ml) y se dejó incubando por 12 h.

El cultivo se transfirió a tubos cónicos de 50 ml y se centrifugaron (4,000 x g, 15 min, 4 °C). Para precipitar los fagos, el sobrenadante se decantó a un matraz estéril de 250 ml, se agregaron 8 g de glicolpolietileno 8000 (PEG 8000) y 4 g de cloruro de sodio (NaCl) y se mezcló (5 min, 37°C, 300 rpm). El matraz se incubó en hielo por 30 min, posterior a ese tiempo su contenido fue vertido a tubos cónicos de 50 ml. Previa centrifugación (10,000 x g, 20 min, 4 °C), el sobrenadante fue descartado y el botón de fagos secado a temperatura ambiente. Los fagos fueron resuspendidos en 2 ml de BSA 1 % en PBS y centrifugado nuevamente (14,000 x g, 15 min). Finalmente el sobrenadante fue filtrado (0.2

µm), etiquetado como la ronda 0 (R0) y empleado para la ronda 1 de selección. Se hizo el conteo del número de colonias en placas de LB, se calculó la eficiencia de la transformación y el resultado se expresó como unidades formadoras de colonias (UFC).

6.3.3 Rondas de Selección

Se inmovilizaron 50 µl de veneno total de *L. mactans* (5 µg/ µl) en dos pozos de una placa de ELISA Costar EI/RI (Corning, Inc.) durante 12 h a 4 °C. Se descartó el veneno, se bloqueó por 1 hr a 37°C con 150 µl de BSA 3% en PBST y se incubó 1 hr a 37 °C. Posterior al bloqueo, se descartó el contenido de los pozos y se agregaron 50 µl de los fagos obtenidos previamente (R0) y se incubó por 2 h a 37 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación se procedió con los lavados astringentes, los cuales consistieron en subir y bajar cinco veces 150 µl de PBST en cada pozo, incubando 5 min a temperatura ambiente entre cada lavado. Este proceso se repitió en cada una de las rondas de la siguiente manera, 5 lavados para la ronda 1, 10 para la ronda 2, 15 para la ronda 3 y 20 para la ronda 4. Después de los lavados, se agregaron 50 µl de tripsina (10 mg/ml en PBS) recién preparada y se incubó por 30 min a 37 °C. Se lavó vigorosamente 10 veces y los fagos fueron transferidos a un cultivo de *E. coli* cepa ER 2738 de 2 ml con una OD₆₀₀=1. Se incubó a temperatura ambiente 15 min para permitir la infección y se agregaron 6 ml de medio SB y 1.6 µl de carbenicilina (100mg/ml).

Para establecer el título de entrada, en paralelo se creció un cultivo de *E.coli* cepa ER2738 en 2 ml de medio SB a una DO₆₀₀=1, se tomaron 50 µl y se infectaron con 1 µl de una dilución 10⁻⁸ de la preparación de fagos (obtenida en la ronda 0 ó a la ronda anterior a la que se va a obtener). Las células infectadas fueron incubadas 15 min a temperatura ambiente y sembradas en un placa de LB con carbenicilina (100 mg/ml) la cual se incubó 12 h a 37 °C.

El título de salida, es decir, la estimación de las clonas infectadas después de los lavados, se calculó a partir del cultivo de 8 ml. Para lo cual se tomaron 2 μ l y se diluyó en 200 μ l de medio SB, de los cuales se sembraron 10 y 100 μ l en placas de LB agar con carbenicilina (100 mg/ml). Los títulos de entrada y salida se determinaron mediante el número de transformantes al multiplicar el número de colonias por el volumen de cultivo y dividir entre el volumen extendido en placa, todo multiplicado por el factor de dilución.

El cultivo de 8 ml se incubó por 1 hr a 37 °C y 250 rpm, se agregaron 2.4 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se continuó con la incubación bajo las mismas condiciones. Posteriormente se transfirió a un matraz de 500 ml, se adicionó 1 ml de fago ayudador VCSM13, 91 ml de medio SB y 46 μ l de carbenicilina (100 mg/ml) y se incubó por 2 h más. Finalmente se agregaron 140 μ l de kanamicina (50 mg/ml) y se por 12 h a 37 °C y 250 rpm.

La precipitación de los fagos a partir del cultivo se realizó como se describe en el apartado 6.3.1. Con la diferencia que a partir de esta ronda se emplearon 4 g de PEG y 3 g de NaCl. Los fagos obtenidos fueron empleados para la ronda subsecuente. Este procedimiento de selección de fagos fue el mismo para las siguientes 4 rondas.

6.3.4 Búsqueda de clonas con el inserto vNAR por PCR y purificación de plásmido

A partir de la última ronda de selección (Ronda 4) se seleccionaron veinte clonas y se evaluaron mediante PCR de colonia para corroborar la presencia del fragmento vNAR. A partir de las clonas que presentaron el fragmento del tamaño esperado se purificó el plásmido por lisis alcalina para su posterior análisis de secuenciación. Se procedió de acuerdo a lo descrito en los apartados 6.2.8. y 6.2.9.

6.4 Expresión de la proteína vNAR recombinante

Una vez que se seleccionaron aquellos plásmido con los vNAR en correcto marco de lectura, estos fueron empleados para transformar células *E. coli* cepa BL21 (D3) y proceder con la expresión de la proteína recombinante. La proteína vNAR recombinante expresada bajo el control del promotor inducible por IPTG presenta secuencias específicas para su inmunodetección (epítipo HA) y purificación (6xHis).

La transformación se realizó como se describe en el apartado 6.2.7. Con el propósito de confirmar la presencia del inserto de interés, se analizaron cinco colonias mediante PCR como se describe en el apartado 6.2.8.

6.4.1 Inducción

Las clonas seleccionadas se crecieron en 5 ml de medio SB con 5 μ l de carbenicilina (100 mg/ml), durante 12 h a 37 °C y 250 rpm. El cultivo se vació en un matraz Fernbach que contenía 500 ml de medio SB y 500 μ l de carbenicilina (100 mg/ml), incubó a 37 °C y 250 rpm hasta que alcanzó un $DO_{600} = 0.6$. Una vez que alcanzó la DO, se indujo agregando 1 ml de IPTG 0.5 M e incubando por 6 horas, mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de inducción se centrifugó el cultivo (4,000 x g, 20 min, 4 °C). Se descartó el sobrenadante y el botón celular se almacenó a -20°C hasta su procesamiento. Adicionalmente, como control negativo se empleó un cultivo de la cepa BL21 (DE3) sin transformar, el cual se indujo de la misma manera, excepto porque en este caso no se adicionó carbenicilina.

6.4.2 Extracción periplásmica de la proteína vNAR recombinante

El botón celular correspondiente a 100 ml de cultivo se resuspendió en 50 ml de una solución de 30 mM Tris-HCl y 20% sacarosa a pH 8.0. La mezcla se transfirió

a un vaso de precipitado en un baño con hielo con agitación suave, se agregó 100 μ l de EDTA 500 mM y se incubó por 10 min más. La mezcla se centrifugó (8,000 x g, 20 min, 4 °C) y se descartó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 50 ml de $MgSO_4$ 5 mM frío y se transfirió a un vaso de precipitado en un baño para su incubación con hielo durante 10 minutos y agitación suave. Se centrifugó (8,000 x g, 20 min, 4 °C), se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

6.4.3 Purificación de la proteína vNAR recombinante

El extracto periplásmico se purificó mediante cromatografía de afinidad empleando la resina Ni-NTA (Quiagen) la cual tiene afinidad por la secuencia de histidinas que presenta la proteína vNAR recombinante.

En una columna de plástico con 15 ml de capacidad se agregó 1 ml de resina Ni-NTA y se dejó sedimentar por gravedad. Una vez que se descartó el sobrenadante, la resina se lavó con 3 ml de PBS 1X y se equilibró con 12 ml de amortiguador de lavado (50 mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0). Posteriormente, la columna fue transferida a un cuarto frío (4 °C) donde mediante gravedad se pasó dos veces el extracto periplásmico. Se procedió con el lavado de la columna con 20 ml de amortiguador de lavado y con la elución de la proteína recombinante con amortiguador de elución (50 mM NaH_2PO_4 , 300mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) en cinco fracciones de 0.5 ml cada uno. Finalmente la columna se lavó con 15 ml de amortiguador de lavado y se almacenó a 4 °C con etanol al 20%.

6.5 Análisis de la proteína vNAR recombinante

6.5.1 ELISA de expresión

La expresión de la proteína recombinante en los extractos periplásmicos se evaluó mediante un inmunoensayo ELISA. Para ello, se inmovilizó 50 µl de extracto crudo en una placa de ELISA por triplicado durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, se agregaron 150 µl de solución de bloqueo (BSA 3% en PBS 1X) y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se descartó el contenido de los pozos, se hicieron tres lavados con PBST y se agregaron 50 µl de una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti-HA-HRP (Roche) en BSA1% en PBS 1X. Se incubó por 1 h a 37 °C, se descartó el contenido de los pozos y se lavó tres veces con PBST. Finalmente, se llevó a cabo el revelado con 50 µl de sustrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) e incubando por 15 min a temperatura, se agregó 50 µl de ácido sulfúrico 1M (H₂SO₄) y se determinó su absorbancia a 450 nm en un lector para placas de ELISA (BioRad). Como control negativo de la expresión se utilizó extracto periplásmico de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar.

6.5.2 ELISA de reconocimiento de la proteína vNAR recombinante

Se realizó un ELISA de reconocimiento con los extractos periplásmicos por triplicado. Se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos donde se inmovilizaron 50 µl de veneno total de *L. mactans* (25 µg/ml) durante 12 h a 4 °C. Posteriormente se bloqueó con 150 µl de BSA 3% en PBS 1X durante 1 h a 37 °C y se lavó tres veces con PBST. Se agregaron 50 µl de cada uno de los extractos crudos obtenidos en la extracción periplásmica y se incubó a 37 °C por 1 hora. El resto del procedimiento se realizó como se describe en el apartado 6.5.1.

6.5.3 Electroforesis desnaturalizantes en tricina (Tricina-SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo a lo descrito por Schägger y von Jagow (1987). Las condiciones de corrida fueron de 50 mA con un voltaje ≥ 150 V, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó la base del gel. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250 y secados en un desecador de Gel Dryer (BioRad). El extracto periplásmico de las células BL21 sin transformar se empleó como control negativo.

6.5.4 Inmunodetección (Western Blot)

La presencia de las proteínas vNAR recombinantes tanto en los extractos crudo como en las fracciones purificadas, fue evaluada por el método de Western blot. Para ello, como primer paso, fue necesario realizar su electroforesis desnaturalizante en tricina como se describe en el apartado 6.5.3.

Posterior a la electroforesis se realizó una electrotransferencia semiseca mediante un sistema de transferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP), una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de $0.45 \mu\text{m}$ (BioRad) y amortiguador Towbin 1X (25 mM Tris base, 192 mM glicina, y 20% metanol) (Harlow y Lane, 1988). Las condiciones de transferencia fueron 200 mA constante por 1 h, manteniendo el voltaje menor a 20 V.

Una vez concluida la transferencia, se procedió con la inmunodetección empleando el anticuerpo anti-Ha (Roche). Para ello la membrana fue lavada con PBST durante 5 min y posteriormente bloqueada con leche descremada 5% (Svelty) en PBST por 2 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Posteriormente se incubó mismas condiciones, con leche descremada 1% en PBST y el anticuerpo anti-HA (Roche) en una dilución 1.1000. La membrana se lavó tres veces con PBST por 5 minutos y se procedió con su detección

colorimétrica mediante el reactivo Novex HRP Chromogenic Substrate (TMB) (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

6.5.5 Diálisis

Las fracciones purificadas donde se detectó la presencia de la proteína vNAR recombinante fueron dializadas mediante un cartucho de diálisis Slide-A-Lyzer G2 de 7,000 MWCO (Pierce) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor y empleando PBS 1X como amortiguador.

6.5.6 Cuantificación

Para determinar la concentración de las proteínas se utilizó el kit de Micro BCA Protein Assay (Pierce), en la cual se determina las proteínas totales presentes en la muestra. Este método emplea el ácido bicinconínico (BCA), un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} unidos a ciertos aminoácidos presentes en las proteínas. Se utilizó (BSA) como proteína estándar y a partir de una solución madre (2 mg/ml) se hicieron diluciones para obtener las concentraciones de 200 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizó una placa de ELISA de 96 pozos a la que se agregaron, por triplicado, 150 μl de cada proteína estándar y de las muestras problema. Se procedió de acuerdo a las instrucciones dadas por proveedor. La placa se leyó en un espectrofotómetro de placa (Thermo Scientific) a una absorbancia de 562 nm. Finalmente, los datos fueron graficados y se construyó la curva estándar.

6.6 Evaluación de la actividad del veneno de *L. mactans* en ratones

Previo al bioensayo para evaluar la capacidad neutralizante del veneno de *L. mactans* mediante las proteínas vNAR recombinantes purificadas, se realizó una prueba para determinar la dosis letal media era $DL_{50} = 8 \mu\text{g/ ratón}$ (Daly, *et al.*, 2001). Para este ensayo se utilizaron grupos de ratones de la cepa CD1, los cuales fueron pesados y marcados para su identificación. El veneno total de viuda negra fue diluido en 200 μl PBS 1X e inyectado vía intraperitoneal a dos ratones con $2DL_{50}$, $3DL_{50}$, $4DL_{50}$, $6DL_{50}$, $8DL_{50}$ y $10DL_{50}$, como control negativo se inyectó un ratón con 200 μl de PBS 1X. El comportamiento de los ratones fue evaluado y registrado por un periodo de 48 hrs.

7. Resultados

7.1 Inmunización del tiburón

Los títulos de anticuerpos de tiburón *H. francisci* re-inmunizado con veneno total de la araña *L. mactans* durante el periodo de junio a julio de 2011 se presentan en la figura 11. La tendencia mostró un claro incremento conforme se realizaron las inmunizaciones por lo que se decidió a sacrificar al organismo para la extracción del bazo.

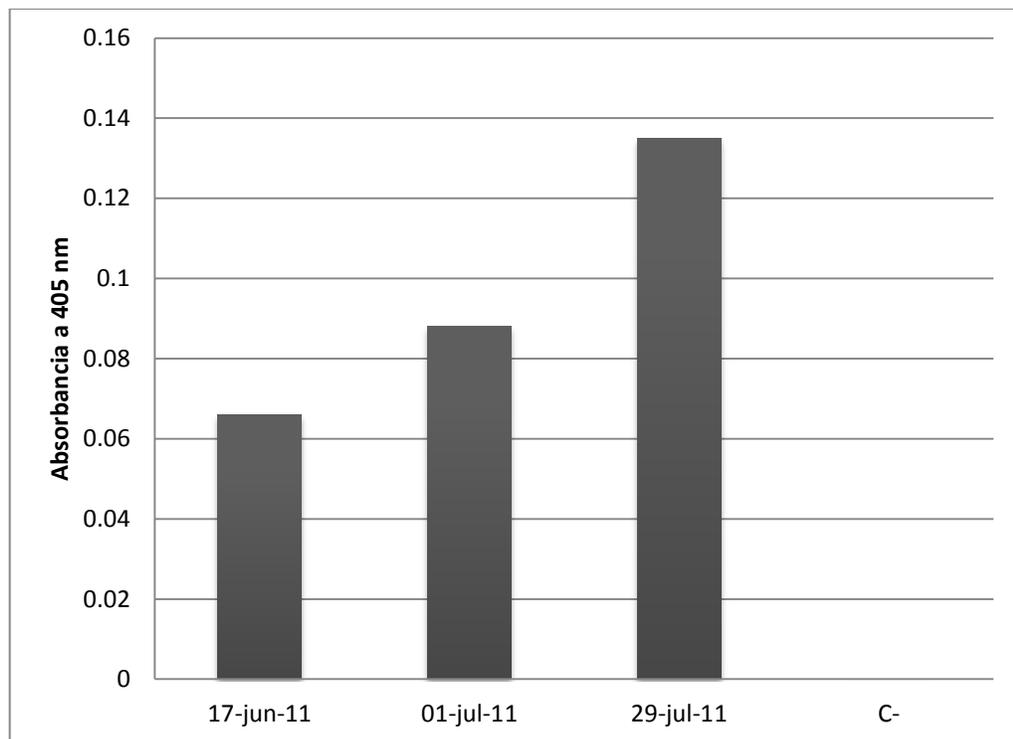


Figura 11. Representación gráfica de los títulos de anticuerpos presentes en el suero del tiburón inmunizado con veneno total de *L. mactans*.

7.2 Extracción del bazo del tiburón y obtención de ARN total.

A partir del bazo del tiburón inmunizado con veneno total de *L. mactans*, se obtuvo 3.9 mg de ARN total con una concentración de 3.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La integridad del ARN purificado se evaluó en gel desnaturizante al 1.2% de agarosa (Figura 12) y a partir de este se realizó la síntesis del ADNc de los fragmentos de vNAR.



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de 3.9 μg de ARN total de bazo del tiburón inmunizado con veneno total de la araña *L. mactans*.

7.3 Amplificación y del fragmento vNAR por PCR

Para la amplificación de los fragmentos vNAR se realizaron reacciones de PCR empleando ADNc como templado y una mezcla de siete oligonucleótidos sentido y uno antisentido. Los productos de PCR amplificados fueron evaluados en un gel de agarosa al 1.8% y presentaron un tamaño alrededor 400 pb el cual corresponde al esperado. (Figura 13). Con el propósito de contar con una cantidad suficiente de ADN para posteriores análisis, se realizaron varias rondas de PCR.

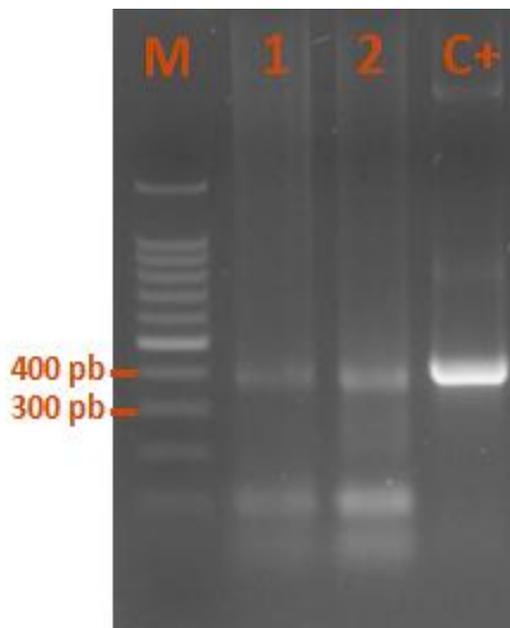


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los fragmentos vNAR amplificados por PCR. El carril M corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carriles 1 y 2 corresponden al fragmento amplificado de aproximadamente 400 pb. El carril C+ corresponde a un fragmento vNAR como control positivo.

7.4 Obtención de vector pComb3X-scFv

De un cultivo de 9 ml de células *E. coli* cepa TOP 10 transformadas con el vector pComb3x, se purificó 0.6 mg de plásmido con una concentración de 4.07 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La integridad del vector fue evaluada en un gel de agarosa al 0.8% en el cual se observaron dos bandas correspondientes a la conformación relajada y super-enrollada del vector (Figura 14).

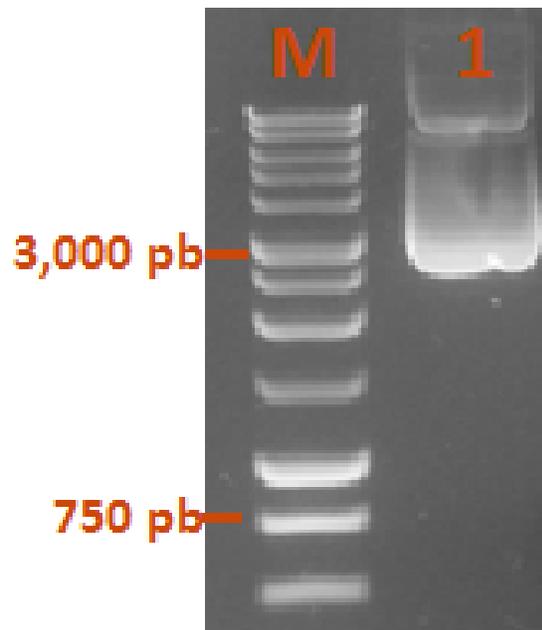


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del vector pComb3X-scFv purificado mediante lisis alcalina. M, marcador molecular 1Kb (Promega), Carril 1, vector pComb3X-scFv.

7.5 Digestión de los fragmentos vNAR y vector pComb3X-scFv

Los fragmentos vNAR amplificados por PCR y el vector purificado fueron digeridos con la endonucleasa *Sfi I* y purificados nuevamente. Mientras que en el caso de los fragmentos vNAR, estos fueron purificados directamente de la reacción de digestión, para el vector fue necesario realizar una electroforesis en un gel preparativo de agarosa (1%) (Figura 15). La electroforesis en un gel preparativo tuvo como objeto recuperar los dos fragmentos que se generan de su digestión con la endonucleasa *Sfi I*. El fragmento de 3,350 pb corresponde al vector digerido en ambos sitios de corte (pComb3X) y el 750 pb al fragmento de relleno (scFv).

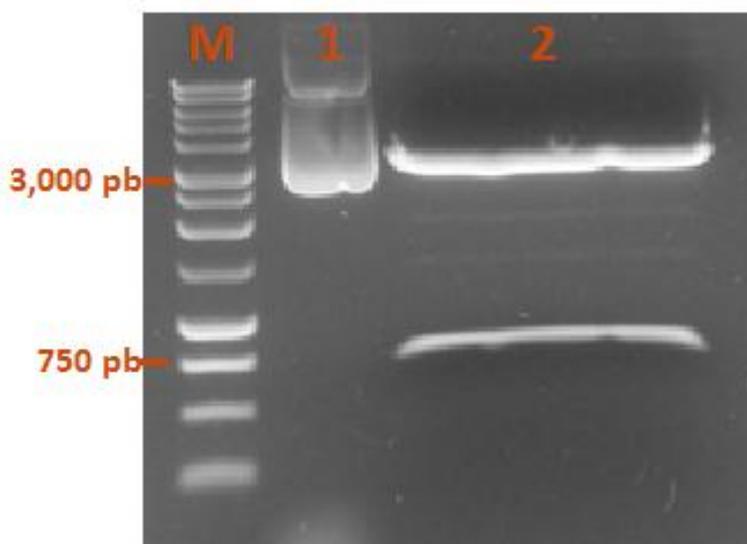


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la reacción de digestión del vector pComb3X-scFv con enzima *Sfi* I. Carril M: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 1: vector pComb3X-scFv si digerir. Carril 2: vector digerido, la banda de 3350 pb corresponde al vector digerido y la 750 pb al fragmento de relleno.

Los productos purificados de la digestión con la enzima *Sfi* I fueron evaluados en un gel de agarosa donde se corroboró su integridad no observando ningún indicio de degradación (Figuras 16 y 17). Cabe mencionar que aun cuando se observó una pérdida importante de ADN, las cantidades obtenidas de los fragmentos y vector fueron suficientes para proceder con la ligación. A partir del vector se obtuvieron 1.5 μg (48.5 $\text{ng}/\mu\text{l}$), fragmento de relleno 510 μg (17 $\text{ng}/\mu\text{l}$) y del vNAR 1.8 μg (59 $\text{ng}/\mu\text{l}$).

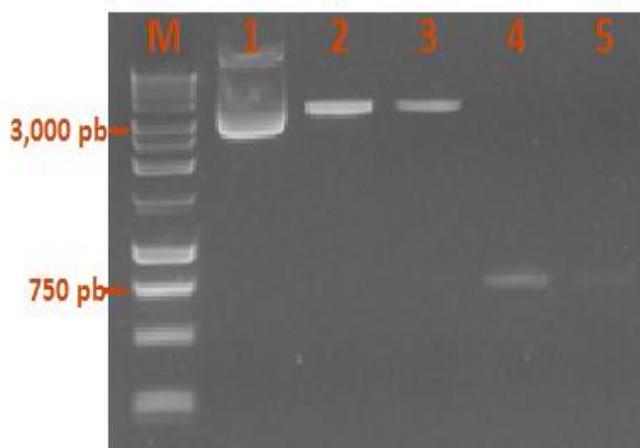


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la purificación del vector pComb3X-scFv digerido y del fragmento de relleno purificado. El carril M, marcador de peso molecular de 1kb (Promega). Carril 1, vector sin digerir. Carriles 2 y 3 vector digerido, elución 1 y 2 respectivamente. Carriles 4 y 5, fragmento de relleno elución 1 y 2 respectivamente.

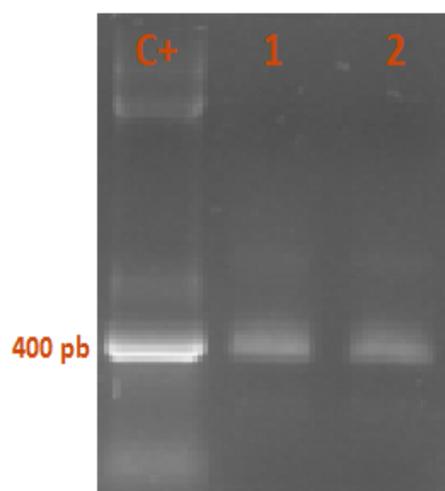


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de los fragmento vNAR digerido y purificados. Carriles 1 y 2 corresponde al fragmento vNAR digerido. Carril C+, fragmento vNAR AG16 como control positivo.

7.6 Ligación a pequeña escala y análisis de clonas

La eficiencia de la ligación del fragmento vNAR y del vector digerido a pequeña y su transformación fue 1×10^4 . Se eligieron quince colonias al azar para su análisis mediante PCR de colonia y corroborar la presencia del fragmento vNAR.

El análisis electroforético en gel de agarosa (1.8%) de los productos de PCR mostró que de las quince colonias evaluadas, catorce fueron positivas ya que presentaron un fragmento de alrededor de 600 pb el cual corresponde al tamaño esperado (Figura 18).

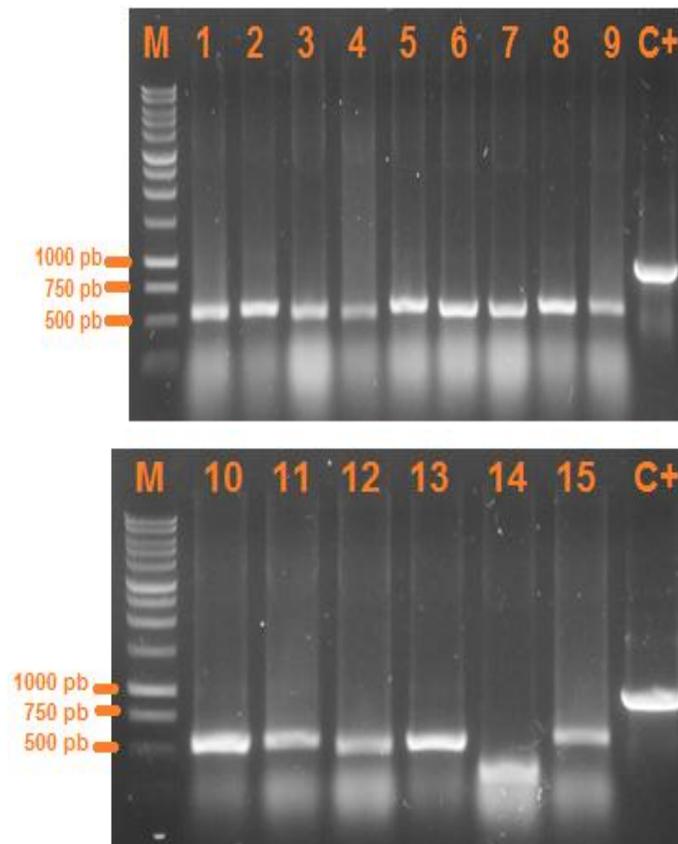


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de las reacciones de PCR de colonia de la ligación a pequeña escala. Carril M, marcador molecular de 1kb (Promega). Carriles 1 al 15, corresponden al número de clona analizada de la ligación a pequeña escala, de 600 pb aproximadamente. Carril C+, corresponde a la amplificación del scFv de 900 pb presente en vector pComb3X-scFv.

De las catorce clonas positivas se eligieron diez para el análisis de su secuencia, previa extracción plasmídica mediante lisis alcalina. Las clonas seleccionadas fueron 1,3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13 y 15, las cuales fueron renombradas del 1 al 10 para fines prácticos.

Una vez que se obtuvo la secuencia de bases de las diferentes clonas, se ubicó el fragmento vNAR y se realizó su traducción a secuencias de aminoácidos. De las diez secuencias analizadas seis se identificaron como vNAR debido a que presentaron las regiones que los caracterizan: FR1, CDR1, HVR2, HVR4, FR3, CDR3, FR4, así como cisteínas conservadas, una región que codifica para seis histidinas (para purificación por cromatografía de afinidad), una secuencia que codifica para el Hemaglutinina (para inmunodetección) y un codón de terminación (UAG). Las secuencias con estas características fueron las correspondientes a las clonas 2, 4, 5, 7, 8 y 9 (Figura 19).

	FR1	CDR1		HVR2	HVR4
2	VAQAAMAQRVEQTPKTATRETGESLTINCVFT	DSNCGLYGT	SWFRNDPDS	TDWEHITI	GGRYFESV NKGAN
7	VAQAAMAAWVDQTPKTATRETGESLTINCVFT	DSNCGLYGT	SWFRNDPDS	TDWEAITI	GGRYFESV NKGAN
9	VAQAAMAAWVDQTPKTATRETGESLTINCVFT	DSNCGLYGT	SWFRNDPDS	TDWERITI	GGRYFESV NKGAN
5	VAQAAMAALTDQTPKTATRETGESLTINCVFT	DSNCGLYGT	SWFRNDPDS	TDWEPITI	GGRYFESV AKGAN
8	VAQAAMAASLDQTPRTTTRGTGESLTINCILT	DTRCVLHGT	SWFRNIPGS	TDWERITI	GRRYIESV NTGEK
4	VAQAAMAASLDQTPRTATRETGECVTINCVFT	EFTCGICGT	SWSRNNPGS	TDWERITI	GGRYVESA KEGAK

	FR3	CDR3	FR4	Sfi I	6xHis	HA
2	SFSLQIKDLTVEDSVTFYCEAVPSFGCDG....F	YCGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
7	SFFLQIKDLTVEDSVTYICEALPSYCGDG....F	YCGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
9	SFSLQIKDLTVEDSVTYICEALPSFGCDG....F	YCGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
5	SFSLQIKDLTVEDSVTYICEALPSVCGDG....F	YCGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
8	SFSLQIKDLTVEDSVTYICKA	QTGTLGYPACSG....NY	YGGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
4	SFSLQIKDLTVEDSVTYICAR	ADTSVHRCATETITLQSL	LRGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS

Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las clonas positivas obtenidas en la ligación a pequeña escala.

Finalmente las secuencias de aminoácidos obtenidas fueron alineadas mediante el programa MultAlin para su comparación entre ellas, así como con otras secuencias previamente aisladas en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas del CICESE. Este análisis indicó que las secuencias no habían sido aisladas previamente por lo se decidió continuar con la ligación a gran escala.

7.7 Ligación a gran escala

A partir de la transformación de células *E. coli* cepa ER2738 con la ligación a gran escala se obtuvo una biblioteca vNAR inmune de 3×10^5 UFC y fue empleada en las rondas de selección de fagos.

7.8 Rondas de selección y análisis de clonas positivas

Los resultados de las titulaciones de entrada y salida en las diferentes rondas de selección se muestran en las figuras 20 y 21, respectivamente.

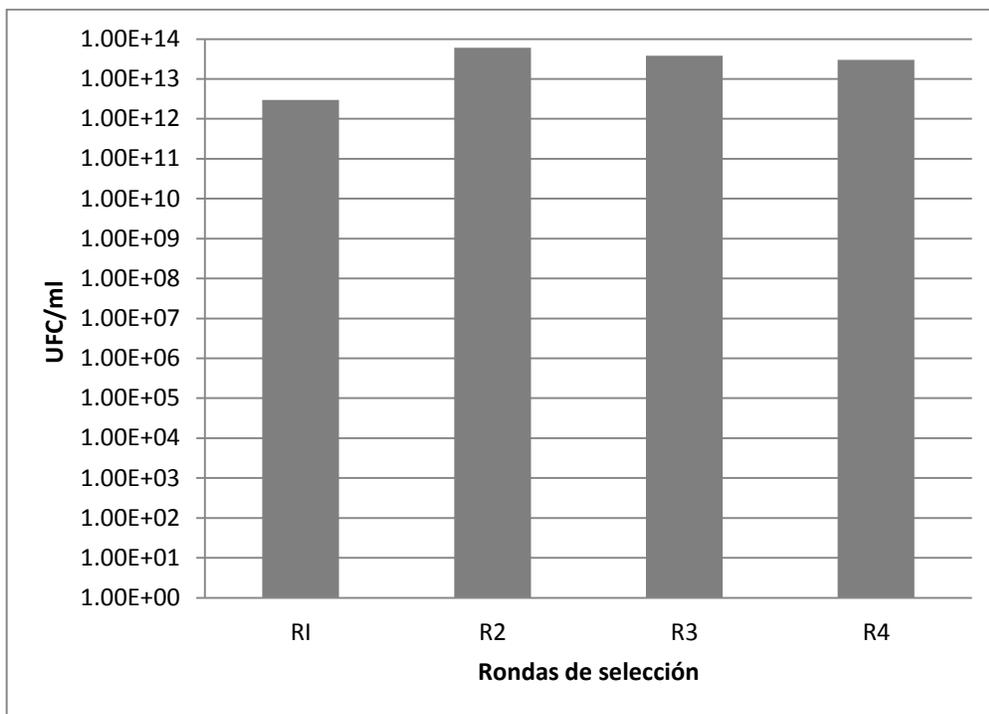


Figura 20. Títulos de entrada de fagos en las rondas de selección.

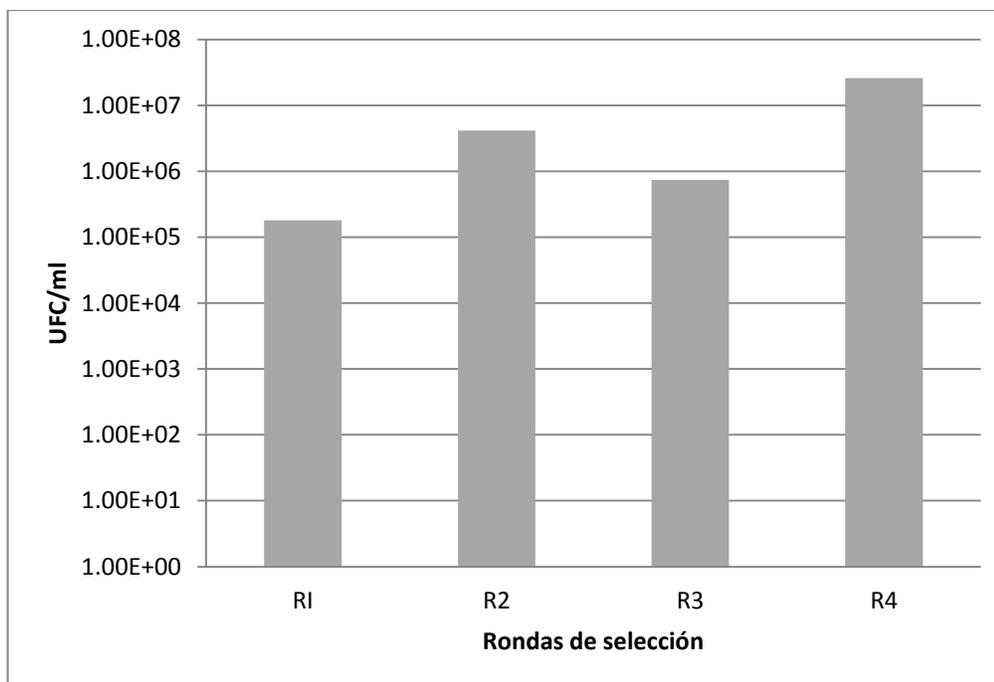


Figura 21. Títulos de salida de fagos en las rondas de selección.

De las placas de LB obtenidas en la última ronda (R4) de selección, veinte clonas al azar fueron analizadas mediante PCR de colonia. Los productos amplificados fueron evaluados en un gel de agarosa y se observó que las veinte clonas presentaron un fragmento del aproximadamente 600 pb, el cual corresponde al tamaño esperado. Se eligieron 15 clonas para el análisis de su secuencia y se encontró que todas presentaron la misma secuencia de aminoácidos, la cual había sido aislada en el laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas en un trabajo previo. Lo anterior se consideró como contaminación en el área de trabajo por lo cual se procedió a analizar clonas de la ronda 3 (R3).

Nuevamente, a partir de la ronda tres, se evaluaron 20 colonias al azar mediante PCR misma que fueron como positivas (Figura 22). Se purificó plásmido de diez clonas y se procedió con el análisis de su secuencia.

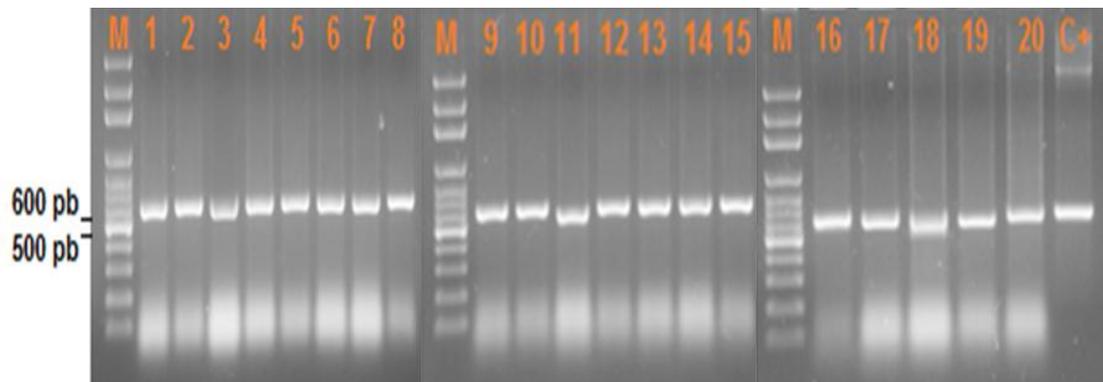


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% de la reacción PCR de colonia de la tercera ronda de selección. Carril M, marcador molecular de 1kb (Promega). Carriles 1 al 20 corresponden a las clonas aisladas de la tercera ronda de selección, de 600 pb aproximadamente. Carril C+ corresponde a un vector pComb3x que contiene un fragmento tipo vNAR.

El análisis de las secuencias correspondientes a las diez clonas de la ronda tres mostró que sólo cuatro eran secuencias completas de vNAR, es decir, que se encontraban en fase de lectura y no presentaron codón de término. Las clonas 3 y 10 fueron descartadas ya que habían sido aisladas previamente quedando sólo la 6 y 7 como clonas potenciales para su expresión. Cabe mencionar que las clonas 6 y 7 fueron obtenidas en la ligación a pequeña escala y poseen un CDR3 diferente entre sí (Figura 23).

	FR1	CDR1		HVR2		HVR4
R3.3	VAQAAMAASLDQTPRTATRETGESLTINCVLT	DNSQNLFST	KWFWHAPSS	TDWKSITI	GGRYVESK	NKQSK
R3.10	.FPGGLSASLDQTPRTATRESGESLTINCVLT	DNSQNLFST	KWFWHAPSS	TDWKSITI	GGRYVESK	NKQSK
R3.6	VAQAAMAQRVEQTPKTATRETGESLTINCVFT	DSNCGLYGT	SWFRNDPDS	TDWERITI	GGRYFESV	AKGAN
R3.7	VAQAAMAARLEQTSRTATRETGESLTISCILT	DTDCGLNGT	SWFRHIPDS	TSWERITI	ARRYVESV	NTGAK

	FR3	CDR3	FR4	Sfi I	6xHis	HA
R3.3	SFSLQVKDLTLEDSGTYYCKA	KTIGKRRPIHLIGGVMRS	YDGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
R3.10	SFSLQVKDLTLEDSGTYYCKA	KTIGKRRPIHLIGGVMRS	YDGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
R3.6	SFSLQIKDLTVEDSVTYICEA	..LPSF.....GODG.F	YCGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
R3.7	SFSLQIKDLTVEDSVTYICEA	..LAGTLGLRPSGCSGNL	YHGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS

Figura 23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las clonas de la ronda de selección 3.

Con respecto a su tamaño, el vNAR #6 es de 321pb que corresponde a una proteína de 107 aminoácidos y 11.8 kDa, mientras que el #7 es 342 pb, 114 aminoácidos y 12.4 kDa.

	FR1	CDR1		HVR2		HVR4
6	VAQAAMAQRVEQTPKATATRETGESLTINCVFT	DSNCGLYGT	SWFRNDPDS	TDWERITI	GGRYFESV	AKGAN
7	VAQAAMAARLEQTSRTATRETGESLTISCILT	DTDCGLNGT	SWFRHIPDS	TSWERITI	ARRYVESV	NTGAK
4.4	VAQAAMAASLDQTPRMATRETGESLTINCVLV	DASCGLSGT	SWFRNPPGS	TDWERITI	GGRYVESV	NKGTK
4.12	VAQAAMAASLDQTPRTATRETGESLSINCVLT	DTSHILFGT	KWFWNNPDS	TDWESITI	GGRYVESV	NNQAK

	FR3	CDR3	FR4	Sfi I	6xHis	HA
6	SFSLQIKDLTVEDSVTYTCEALPSFGCDG.....F	YCGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
7	SFSLQIKDLTVEDSVTYTCKA	LAGTLGLRPSGCSG....NL	YHGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
4.4	SFSLQIKDLTVEDSVTYTCKSGVRNCSYG....NY	YGGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS
4.12	SFSLQIKDLTVEDSGTYTCKA	QTIGRRKGYFKADPIAVID	YDGAGTVLTVN	GQAGQ	HHHHHH	GAY PYDVPDYAS

Figura 24. Alineamiento de las secuencias de las proteínas vNAR recombinantes obtenidas a partir de la biblioteca inmune (6 y 7) y no inmune (4.4 y 4.12) contra el veneno total de *L. mactans*.

7.9 Expresión y purificación de proteínas vNAR recombinantes

Los plásmidos correspondientes a las clonas 6 y 7 fueron seleccionados para su expresión. Las proteínas recombinantes fueron nombradas de acuerdo al nombre de la clona de la cual provenían. De manera adicional y con fines de comparación, se decidió incluir los plásmidos aislados previamente (# 4.4, # 4.12) a partir de una biblioteca no inmune contra veneno total de *L. mactans* (Barrón-García, 2012) (Figura 24).

A partir de colonias aisladas de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos seleccionados previamente se procedió con su inducción en 2 L de cultivo por cada clona. La proteína recombinante fue recuperada mediante extracción periplásmica y evaluado su presencia mediante una ELISA de expresión y Western Blot.

Los resultados del ELISA de expresión a partir de los extractos periplásmicos se presentan en la Figura 25. Este ensayo permitió corroborar la presencia de la proteína vNAR recombinante soluble en todos los casos, así como una mayor expresión a partir de las clonas 6 y 4.12 y una menor por las clonas 7 y 4.4.

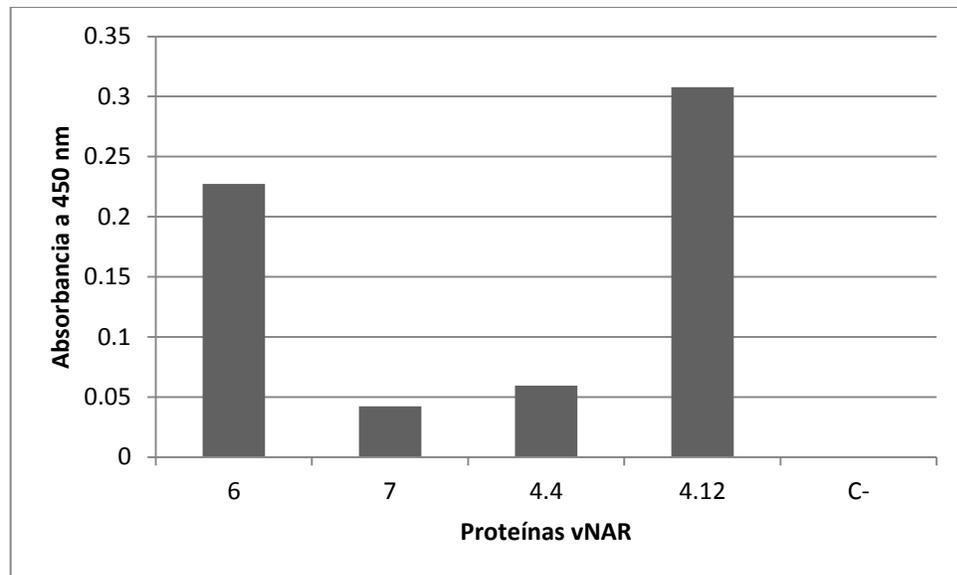


Figura 25. ELISA de expresión. Extractos periplásmicos correspondientes a las proteínas vNAR #6, #7, #4.4 y #4.12 y como control negativo células *E. coli* BL21(D3) sin transformar.

El ensayo mediante western blot mostró la presencia de una banda única de aproximadamente 15 kDa la cual corresponde al peso teórico esperado del vNAR recombinante (≈ 15.0 kDa). Si bien este nos es método cuantitativo, dado que el volumen de muestra analizaron fue el mismo en todos los casos, la intensidad de la banda observada sugirió una mayor concentración de proteína recombinante en los extractos correspondientes a las clonas 4.12 y 4.4. De acuerdo a lo esperado, el control negativo no presentó banda. (Figura 26).

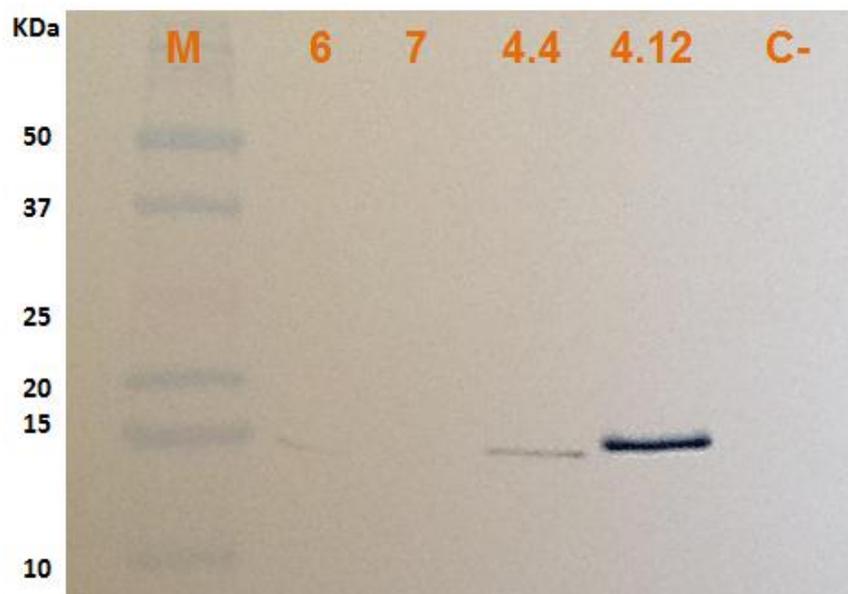


Figura 26. Inmunodetección de las proteínas vNAR recombinantes obtenidos mediante extracción periplásmica. Carril M, marcador molecular Precision Plus Protein dual color Standards (BioRad). Carriles 6, 7, 4.4, 4.12, corresponden a los extractos obtenidos de las clonas y C- al extracto de células *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar.

Una vez que se corroboró la presencia de la proteína vNAR recombinante en los extractos periplásmicos se continuó con su purificación. Como en el caso anterior, las fracciones obtenidas de la purificación fueron evaluadas mediante Western blot (Figuras 27 y 28). En todos los casos se observó que las fracciones 1 y 2 fueron las que presentaron la mayor cantidad de proteína recombinante.

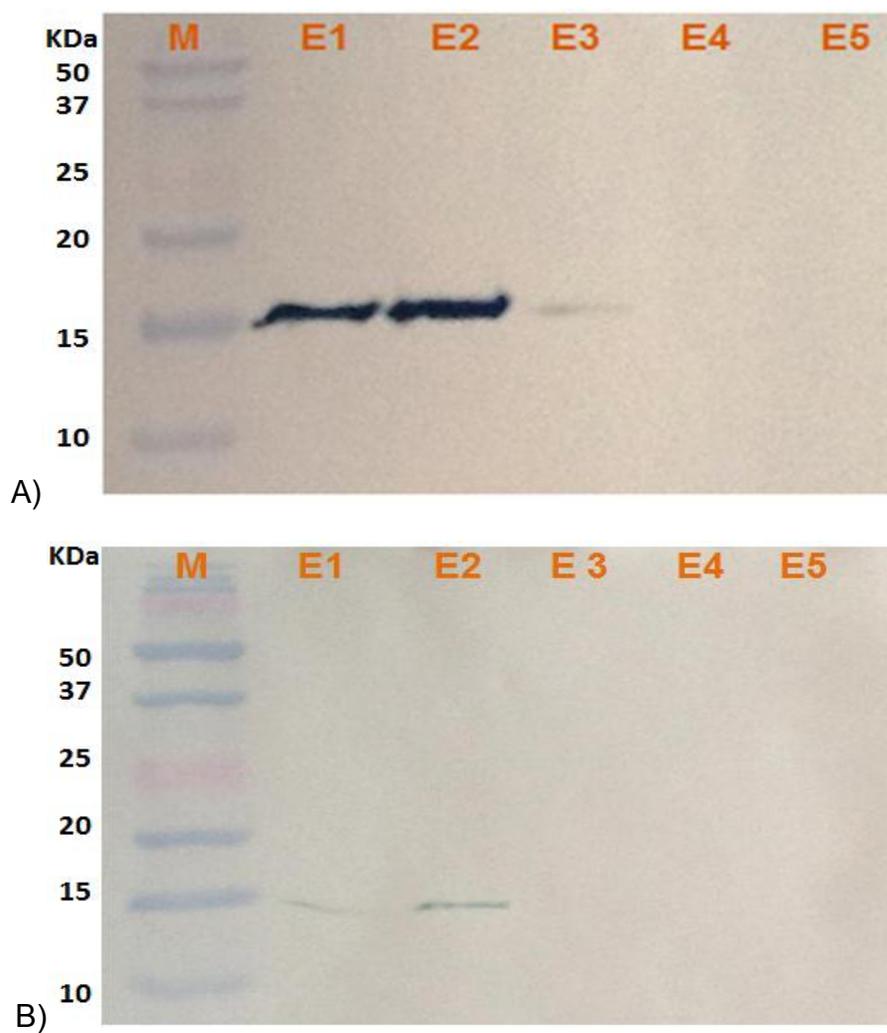


Figura 27. Inmunodetección de la purificación de las proteínas vNAR recombinantes #6 y #7. A) Proteína vNAR 6, B) Proteína vNAR 7, Carril M, marcador molecular Precision Plus Protein dual color Standars (BioRad). Carriles E1-E5 corresponden al número de elución de cada proteína.

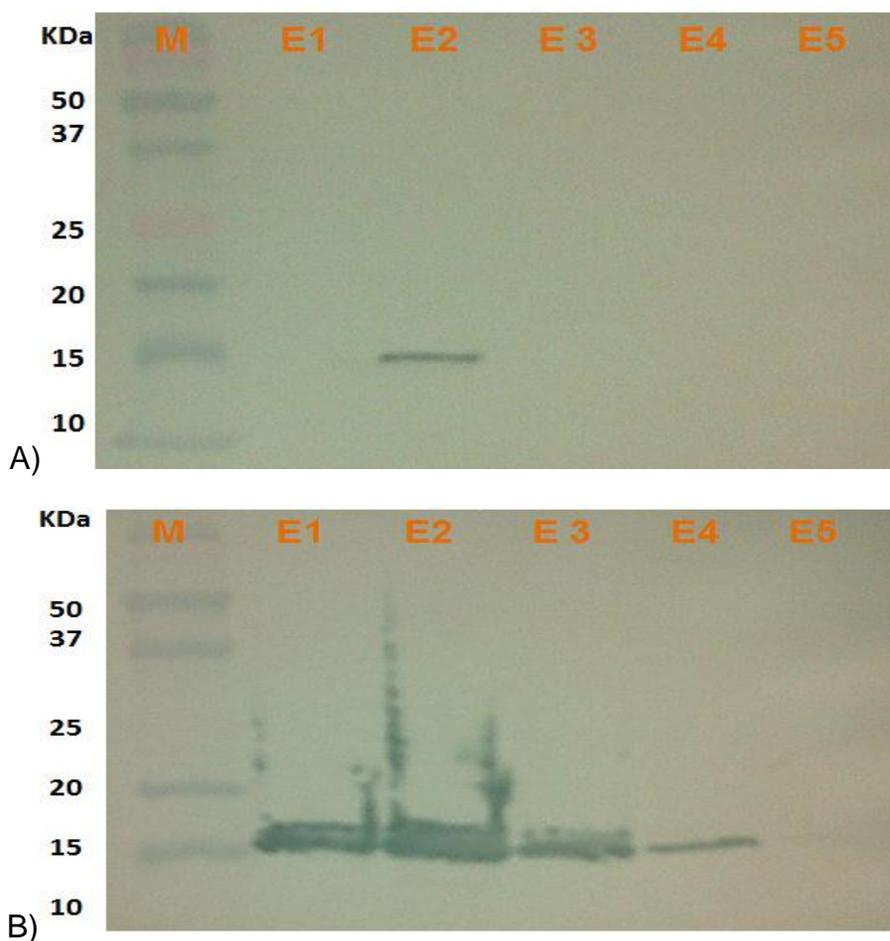


Figura 28. Inmunodetección de la purificación de las proteínas vNAR recombinantes #4.4 y #412. A) Proteína vNAR 4.4, B) Proteína vNAR 4.12, Carril M, marcador molecular Precision Plus Protein dual color Standars (BioRad). Carriles E1-E5 corresponden al número de elución de cada proteína.

Con el propósito de determinar la pureza de las fracciones donde se observó la mayor cantidad de proteína vNAR recombinante (E1 y E2), estas fueron evaluadas en un gel desnaturalizante de SDS-PAGE-Tricina teñido con azul de coomassie (Figura 29). A partir de este gel, se observó la presencia de bandas adicionales de alrededor de 20 y 25 kDa, incluso en mayor proporción a la de la proteína esperada (15 kDa), lo cual nos indicó que no se obtuvieron proteínas puras a partir del proceso de purificación.

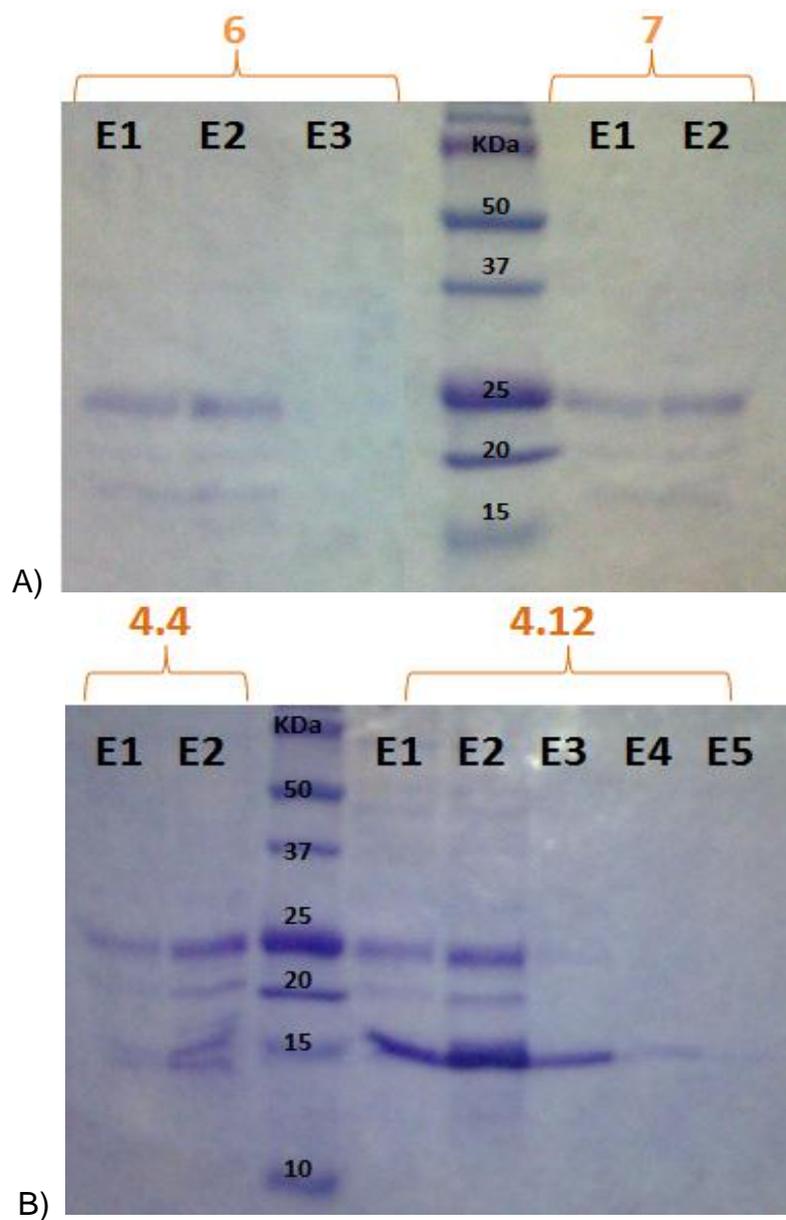


Figura 29. Electroforesis desnaturalizante en geles de tricina (Tricina-SDS-PAGE) al 12% de las eluciones obtenidas en la purificación de proteínas vNAR recombinantes. A) Proteínas #6 y #7, B) Proteínas #4.4 y #4.12. E1-E5 corresponden al número de elución de cada proteína. Carril M, marcador molecular Precision Plus Protein dual color Standars (BioRad).

Dado lo anterior, se decidió mezclar la eluciones 1 y 2 de cada proteína recombinante, excepto por la 4.12 donde se mezclaron la 3 y 4 ya que presentaron menos bandas adicionales y por lo tanto una proteína vNAR más pura.

El volumen total de cada proteína purificada fue dializado con PBS 1X y cuantificado mediante un ensayo ácido bicinonínico (BCA). A partir de la curva estándar se determinó la concentración de proteína total de las muestras (Figura 30). La concentración de proteínas #6, #7, #4.4 y #4.12 fue de 20.9, 22.3, 42.2 y 17.4 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Con respecto al rendimiento este fue de 20.9, 22.3, 42.2 y 17.4 $\mu\text{g/L}$ de cultivo para las proteínas #6, #7, #4.4 y #4.12, respectivamente.

Debido a la presencia de otras bandas adicionales en las eluciones se decidió que para el ensayo de neutralización se consideraría a las proteínas vNAR como el 50% del total, excepto por de la proteína 4.12 en donde se encontró una mayor pureza. Bajo esta premisa, la concentración proteínas #6, #7, #4.4 y #4.12 fue de 10.0, 11.0, 20.0 y 15.0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente

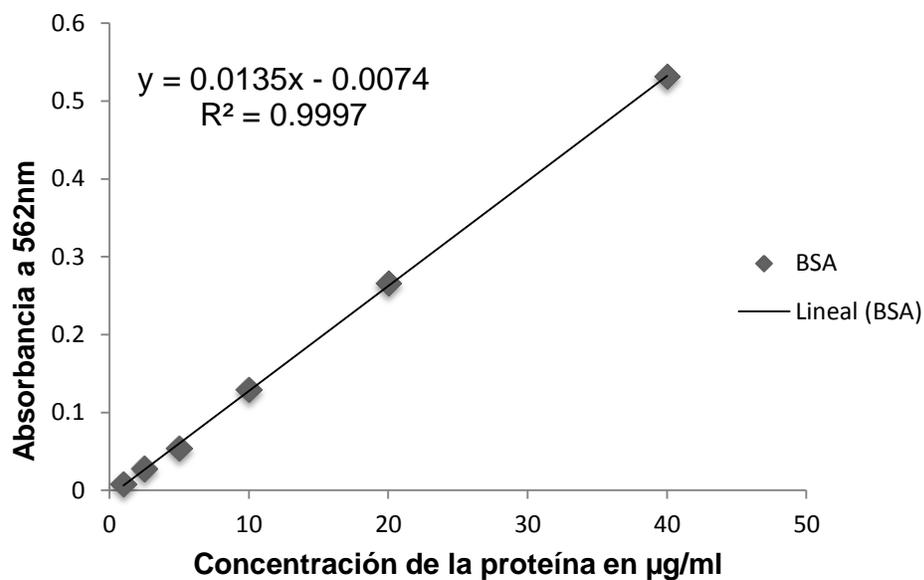


Figura 30. Curva estándar de BSA.

7.10 Evaluación de la actividad del veneno total de *L. mactans*

Previo al ensayo de actividad para evaluar la capacidad de neutralización de las proteínas vNAR recombinantes purificadas se analizó la capacidad de reconocimiento de los extractos periplásmicos veneno al total de *L. mactans* así como la actividad de este último en ratones.

Los resultados del ELISA de reconocimiento con los extractos periplásmicos indicaron que ninguno tuvo la capacidad para reconocer al veneno total de *L. mactans* (Figura 31). Si bien lo anterior podría deberse al hecho de que las proteínas recombinantes no tuvieran afinidad por el veneno, otra posible explicación era que el veneno empleado hubiera perdido su actividad y por lo tanto no fuera reconocido por las proteínas.

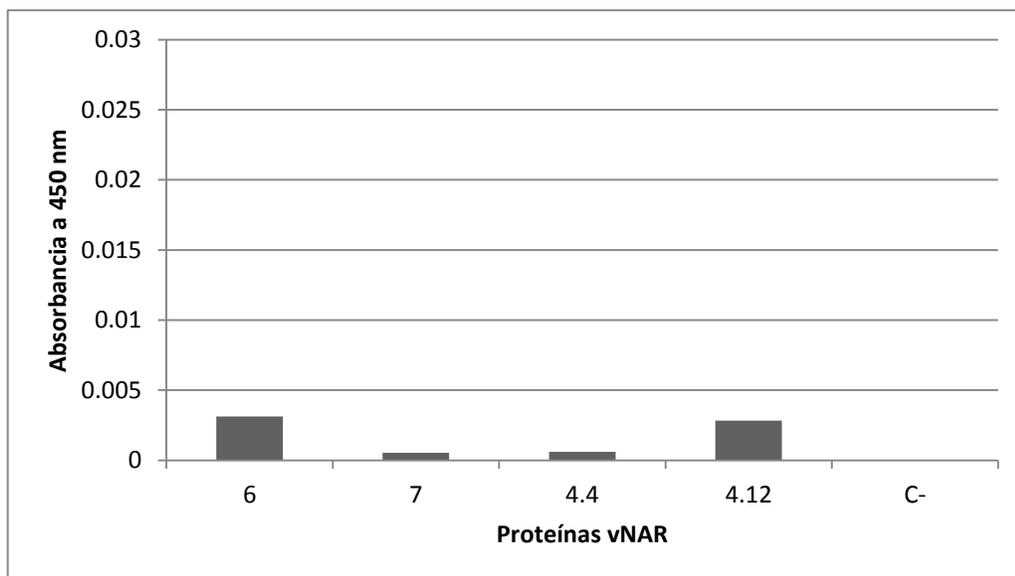


Figura 31. ELISA de reconocimiento. Extracto periplásmico correspondientes a las proteínas vNAR #6, #7, #4.4, #4.12 y como control negativo, extracto periplásmico de células *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar.

El ensayo para evaluar la actividad del veneno se inició con 2 ratones CD1 inyectados con dos dosis letales de veneno total ($2DL_{50}$) y se observaron durante un periodo de 48 horas. Si bien durante los primeros minutos posteriores a la inyección se lamieron el área donde fueron inyectados y se mostraron un poco pasivos, no se observó algún cambio significativo en su comportamiento. El ensayo se repitió aumentando las dosis de veneno hasta llegar a $10DL_{50}$, sin embargo, nuevamente no se observó un cambio o síntoma clásico de envenenamiento por viuda negra, como es el cierre de párpados, contracción del lomo, anorexia o ataxia. Dado que no se observó ningún signo de envenenamiento, debido a la pérdida de actividad del veneno, se decidió no proceder con el ensayo de neutralización.

8. Discusión

El envenenamiento por contacto accidental con arañas de la especie *L. mactans* representa una situación de emergencia médica alrededor del mundo debido a los síntomas que presentan las personas que sufren una mordedura de estas arañas. La amplia distribución de esta especie y el hecho de que es sinantrópica, tiene como consecuencia que nos encontremos expuestos a estos artrópodos con frecuencia.

A la fecha, los tratamientos utilizados se dirigen principalmente a la disminución de los síntomas asociados al latrodectismo y no a neutralizar el veneno. Esto se debe a que comúnmente los síntomas se confunden con otros padecimientos, por lo tanto el diagnóstico no oportuno tiene como consecuencia complicaciones e incluso la muerte en los casos más severos.

El empleo de antivenenos contra *L. mactans* como Aracmyn Plus (Laboratorios Silanes S.A de C.V.) ha disminuido el número de casos severos de latrodectismo, sin embargo, en algunos casos pueden generar reacciones alérgicas o tener efectos secundarios en los pacientes a los que se les ha administrado. Estos efectos colateral se han observan en otros antivenenos que han sido elaborados a partir de la digestión enzimática de inmunoglobulinas de sueros de caballos hiperinmunes (Newcombe y Newcombe, 2007).

En este trabajo se propone el empleo de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo vNAR ya que presentan características de tamaño, especificidad y estabilidad que los convierten en una alternativa para su utilización como antiveneno. Por otro lado, el hecho que puedan producirse mediante técnicas recombinantes sugiere una disminución en los costos de producción que se reflejaría en su precio al público. A la fecha el precio de la dosis del antiveneno Aracmyn Plus es de alrededor de \$ 2,000.00 MN, sin embargo generalmente el tratamiento para adultos requiere de más de una dosis.

Fragmentos de anticuerpos vNAR específicos para las toxinas presentes en el veneno de viuda negra, pueden aislarse partir de una biblioteca inmune del tiburón *H. francisci* o incluso de una no inmune (*naïve*) mediante la técnica de despliegue en fagos. En este trabajo se empleó un tiburón *H. francisci* inmunizado con veneno total de la araña *L. mactans* a partir de la cual se generó una biblioteca a pequeña escala del orden de 1×10^4 UFC. El análisis de las secuencias de diez clonas de esta biblioteca indicó que seis de ellas eran vNAR debido a la presencia de las regiones que caracterizan a los fragmento de vNAR (FR1, CDR1, HVR2, HVR4, FR3, CDR3, FR4) así como las etiquetas que permiten su inmunodetección. Cabe mencionar que cuatro de estas clonas tenían un CDR3 muy parecido, sin embargo dado que no habían sido aisladas previamente por el Laboratorio de Inmunología y Biotoxinas, se decidió continuar con la ligación a gran escala.

A partir de la ligación a gran escala se obtuvo una biblioteca del orden de 3×10^5 UFC el cual se consideró representativo y suficiente para continuar con las rondas de selección. Mediante la técnica de despliegue en fagos se seleccionaron bacteriófagos que se unieron específicamente a las toxinas presentes en el veneno total de viuda negra. Se realizaron cuatro rondas de selección, durante la tercera ronda se observó una disminución del título de salida, esto se puede deber a que en cada ronda se van aumentando los lavados astringentes, lo cual disminuye a los fagos poca afinidad al antígeno de interés. Contrario a lo esperado, en la cuarta ronda se presentó un aumento significativo del título de salida, lo cual sugirió que durante esa ronda se pudo haber presentado algún tipo de contaminación por fagos en el área de trabajo. Lo anterior se corroboró al analizar las secuencia de las clonas positivas de la ronda 4, ya que todas correspondieron a un fragmento vNAR aislado previamente en el laboratorio identificado como CT8.

Dado los resultados obtenidos a partir de la ronda cuatro, se decidió hacer una búsqueda de clonas de la ronda tres y evaluar la secuencia de diez clonas. De las diez clonas, sólo cuatro presentaron vNAR en marco de lectura correo, sin embargo dos fueron CT8 nuevamente, y los otros dos correspondían a clonas obtenidas en la biblioteca a pequeña de este trabajo. Se decidió trabajar con la clona 6 y 7 de la biblioteca inmune generada.

A pesar de que la variabilidad anticuerpos con afinidad a un antígeno es mayor cuando se utiliza una biblioteca inmune es posible seleccionar anticuerpos generados en el repertorio natural del tiburón que posean afinidad por un antígeno. En este sentido se decidió incluir dos clonas seleccionadas en un trabajo previo contra veneno total de *L. mactans* pero aisladas a partir una biblioteca no inmune obtenida previamente, para llevar a cabo la producción de las proteínas vNAR soluble y hacer la comparación entre la capacidad de reconocimiento y neutralización de las proteínas vNAR recombinantes obtenidas a partir de una biblioteca inmune y una no inmune.

Los rendimientos de proteína recombinantes obtenidas a partir de extractos periplásmicos fueron bajos (17-42 µg/L). En general los rendimientos de proteínas recombinantes periplásmicas son bajos con respecto a las citoplasmáticas, sin embargo tienen la ventaja de estar en forma solubles por lo que no se requiere de procesos de desnaturalización y renaturalización para su purificación y análisis. Sin duda el empleo de vector y cepas superproductoras así como el empleo de bioreactores deber ser una opción que debe considerarse en un futuro inmediato para obtener una mejor producción de proteínas recombinantes.

Los resultados del ELISA de reconocimiento indicaron que ninguna de las proteínas vNAR recombinantes reconoció a las toxinas presente en el veneno de viuda negra. Lo anterior puede atribuirse a que el veneno perdió su actividad, lo cual fue corroborado con el ensayo con ratones.

El ensayo con ratones corroboró que el veneno no estaba activo ya que a pesar de inyectarles hasta $10DL_{50}$, en ningún caso se observaron los síntomas propios de un envenenamiento por *L. mactans*, como son cierre de párpados, contracción del lomo, anorexia o ataxia.

Existe poca información sobre la estabilidad de toxinas naturales de animales, sin embargo, Hernández Betancourt y colaboradores (2009) menciona la pérdida de actividad biológica del veneno de alacrán con respecto al tiempo y la temperatura. Por otro lado, Olivares-Quintero (2012) menciona el empleo de DL_{50} mayor a la reportada para el veneno recombinante de la araña violinista, atribuido en parte a la degradación de la misma. Este podría ser el caso del veneno de *L. mactans*, si bien se almacena a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue descongelado en varias ocasiones lo pudo haber afectado su conformación y por lo tanto la pérdida de su actividad biológica o toxicidad.

Conclusiones

A partir de la biblioteca inmune, obtenida de un tiburón *H. francisci* inmunizado con veneno total de *L. mactans*, se aislaron dos fragmentos tipo vNAR.

Se expresaron y purificaron cuatro fragmentos de anticuerpo vNAR con posible potencial de reconocimiento y neutralización del veneno de *L. mactans*.

El ensayo en ratones evidenció que el veneno total de *L. mactans* utilizado en este trabajo perdió su actividad biológica.

La pérdida de actividad del veneno de *L. mactans* podría ser la causa por la cual no se observó la capacidad de reconocimiento por parte de las proteínas vNAR recombinantes.

Perspectivas

Determinar la capacidad de reconocimiento, in vitro, de las proteínas vNAR recombinantes empleando veneno total de la araña *L. mactans* activo.

Mediante un ensayo in vivo con ratones, evaluar la capacidad de neutralización de las proteínas vNAR recombinantes.

Evaluar la capacidad de las proteínas vNAR recombinantes para neutralizar el veneno de otras arañas del género *Latrodectus*.

Referencias bibliográficas

- Abbas, A., Lichman A., Pillai Shiv. 2007. Cellular and Molecular Immunology. 6a edición. Saunders Elsevier. Philadelphia. 566.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. Molecular Biology of the Cell. 5ta edición. Garland Science. 1392.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2004. Essential Cell Biology. 2da. Edición. Garland Science.740.
- Álvarez del Toro, M. 1992. Arañas de Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez. 297.
- Andrade, M.C.B., Banta, E.M., 2002. Value of male remating and functional sterility in redback spiders. *Animal Behaviour*. 63 (5): 857–870.
- Ashton, A.C., Rahman M.A., Volynski K.E., Manser C., Orlova E.V., Matsushita H., Davletov B.A., van Heel M., Grishin E.V., Ushkaryov Y.A. 2000. Tetramerisation of alpha-latrotoxin by divalent cations is responsible for toxin-induced non-vesicular release and contributes to the Ca⁽²⁺⁾ dependent vesicular exocytosis from synaptosomes, *Biochimie*. 82 (5): 453– 468.
- Barbas, C., Burton D., Scott J. and Silverman G. 2001. Phage Display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 23 Cap.
- Barrón García, M.A. 2012. Obtención y selección de fragmentos vnaar de anticuerpos de tiburón que tengan afinidad por el veneno de *Latrodectus mactans*". Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Mazatlán, Sinaloa, México. 46.
- Castañeda Gómez, J., Pinkus Rendon, M., Arisqueta Chablé, C., Barrera Pérez, M., Ortíz Martínez, D., Manrique Saide, P. 2012. Nuevos registros del género *Latrodectus* en Yucatán, México. *Revista Biomédica*. 23 (3): 105-111.
- Castro, J. I. 1983. The sharks of North American waters. Texas A & M University Press, College Station. Texas.180.
- Chippaux, J., Goyffon M. 1991. Antivenom serotherapy: its applications, its limitations, its future. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 84(3): 286-297.
- Compagno, L.J.V., 1984. FAO Species Catalogue. Vol. 4, Part 1 Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Hexanchiformes to Lamniformes. *FAO Fish Synop*. Rome, FAO. 249.

Compagno, L.J.V., 2001. Sharks of the world. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Volume 2. Bullhead, mackerel and carpet sharks (Heterodontiformes, Lamniformes and Orectolobiformes). *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. Rome, FAO. 269.

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research*. 16 (22), 10881-10890. Recuperado de: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.

Costello, M.J., Daane, K.M., 1998. Influence of ground cover on spider populations in a table grape vineyard. *Ecological Entomology*. 23 (1): 33–40.

Criscitiello, 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 (13): 5036-5041.

Daly, F.F., Hill, R.E., Bogdan, G.M., Dart, R.C. 2001. Neutralization of *Latrodectus mactans* and *L. Hesperus* venom by redback spider (*L. hasselti*) antivenom. *Journal of Clinical Toxicology*. 39(2): 119-123.

Diaz, M., Greenberg, A.S., Flajnik, M.F., 1998. Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in antigen-driven reactions in the absence of germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 95(24), 14343– 14348.

Espino-Solís, G.P., Riaño-Umbarila L., Becerril B., Possani L.D.. 2009. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. *Journal of Proteomics*. 72 (2): 183-199.

EIBakri A., Nelson P. N., Abu Odeh R. 2010. The state of antibody therapy. *Human Immunology*. 71(12): 1243–1250.

Finkelstein, A., Rubin, L.L., Tzeng, M.C. 1976. Black widow spider venom: effect of purified toxin on lipid bilayer membranes. *Science*. 193 (4257): 1009– 1011.

Forster, L., 1995. The behavioural ecology of *Latrodectus hasselti* (Thorell), the Australian redback spider (Araneae: Theridiidae): a review. *Records of the Western Australian Museum Supplement*. 52 (1): 13–24.

Frontali, N., Ceccarelli, B., Gorio, A., Mauro, A., Siekevitz, P., Tzeng, M.C., Hurlbrut, W.P., 1976. Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junction. *Journal of Cell Biology*. 68 (3): 462-479.

- Garb, J.E., Gonzalez, A., Gillespie, R.G. 2004. The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): Phylogeny, biogeography, and invasion history. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 31 (3): 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 de Educación Superior de Ensenada B.C., México. 86.
- Goldfrank, L.R., Flomenbaum, N.E., Hoffman, R.S., Howland, M.A., Lewin, N.A., Nelson, L.S. 2006. Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 8th edition. McGraw Hill, Medical Publication Division. New York. 1981.
- Granata, F., Paggi, P., Frontali, N., 1972. Effects of chromatographic fractions of black widow spider venom on in vitro biological systems. *Toxicon*. 10(6):551-555.
- Greenberg, A., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E., Flajnik, M. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversifications in sharks. *Nature*. 374 (6518):168-173.
- Griffiths, K., Dolezal, O., Parisi, K., Angerosa, J., Dogovki, C., Barraclough, M., Sanalla, A., Casey, J.L., González, I., Perugini M.A., Nutall, S., Foley, M. 2013. Shark variable new antigen receptor (vNAR) single domain antibody fragments: stability and diagnostic applications. *Antibodies*. 2(1): 66-81.
- Gutierrez, J., Leon, G, Lomonte, B. 2003. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clinical Pharmacokinetics*. 42(8): 721-741.
- Harlow, E., Lane, D. 1988. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. 726.
- Hernández Bancourt, O., Casado Hernández, I., Iglesias Huerta, E., Ramírez Labrada A., Del Risco Ramos, J., Rodríguez Pargas, A. 2009. Evaluación de la toxicidad in vitro del veneno del alacrán *Rophalurus junceus* a través de un ensayo celular. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 28(1): 1-11.
- Hödar, J.A., Sánchez-Piñero, F., 2002. Feeding habits of the black widow spider *Latrodectus lilianae* (Araneae: Theridiidae) in an arid zone of south-east Spain. *Journal of Zoology*. 257 (1): 101–109.
- Holliger, P., Hudson, P.J. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*. 23 (9): 1126-1136.

Hurlbut, W.P., Chierigatti, E., Valtorta, F., Haimann, C. 1994. α latrotoxin channels in neuroblastoma cells. *Journal of Membrane Biology*. 138 (1): 91-102.

IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Última version: 2012.2. www.iucnredlist.org

Jelinek, G.A. 1997. Widow spider envenomation (latrodectism): a worldwide problem. *Wilderness and Environmental Medicine*. 8(4): 226-231.

Knipper, M., Madeddu, L., Breer, H., Meldolesi, J. 1986. Black widow spider venom induced release of neurotransmitters: mammalian synaptosomes are stimulated by a unique venom component (α latrotoxin), insect synaptosomes by multiple components. *Neuroscience*. 19 (1): 55-62.

Liu, J.L., Anderson, G.P. Goldman, E.R. 2007. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library. *BMC Biotechnology*. 7(11):78-88.

Maretic, Z. 1983. Latrodectism: Variations in clinical manifestations provoked by *Latrodectus* species of spiders. *Toxicon*. 21(4):457-466.

Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelovab, P. y Pospisek, M. 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*. 336(1) 46–50.

Montoya Bonillas, D.A. 2010. Obtención de anticuerpos tipo vNAR que reconocen y neutralizan venenos de alacrán. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada B.C., México. 87.

Muller, G.J. 1993. Black and brown widow spider bites in South Africa - a series of 45 cases. *South African medical journal*. 83 (6): 399–405.

Native Distribution Map for *Heterodontus francisci* (Horn shark). www.aquamaps.org, Última version: agosto 2010.

Newcombe, C., Newcombe, A.R.. 2007. Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of Chromatography*. 848 (1): 2–7.

Nuttall, S., Krishnan, U., Hattarki, M., de Gori, R., Irving, R., Hudson, P. 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 (4): 313-326.

Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Doughty, L., Pearson, K., Ryan M.T, Hoogenraad, N.J., Hattarki M., Carmichael, J.A., Irving, R.A. Hundson, P.J. 2003. Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *European Journal of Biochemistry*. 270(17): 3543-3554.

Olivares Quintero J.F. 2012. Neutralización de la enzima esfingomielinada-D de la araña *Loxosceles reclusa*, utilizando un fragmento de dominio sencillo tipo vNAR, del tiburón *Heterodontus francisci*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada B.C., México. 76.

Orlova, E.V., Rahman, M.A., Gowen, B., Volynski, K.E., Ashton, A.C., Manser, C., Van Heel, M., Ushkaryov, Y.A. 2000. Structure of α -latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. *Nature Structural Biology*. 7(1):48–53.

Peterson, M.E., Black widow spider envenomation. 2006. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 21(4): 187-190.

Possani, L. 2001. Perspectives in the Future Development of Molecular Pharmacology: Vaccines and Recombinant Antibodies. *Journal of Venom and Animal Toxins*. 7(2): 327-327.

Rash, L.D., Hodgson, W.C. 2002. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon*. 40(3):225-254.

Rodríguez González, M. 2008. Expresión de α latrotoxina recombinante activa de *Latrodectus mactans* utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Morelos, México. 73.

Rosenthal, L., Zacchetti, D., Madededu, L., Meldolesi, J. 1990. Mode of action of alpha latrotoxin: role of divalent cations in Ca^{2+} dependent and Ca^{2+} independent effects mediated by the toxin. *Molecular Pharmacology*. 38 (6): 917-923.

Roux, K.H., Greenberg, A.S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E.C., Flajnik, M.F. 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 (1): 11804-11809.

Rumfelt, L.L., Diaz M., Lohr R.L., Mochon E., M.F. Flajnik. 2004. Unprecedented Multiplicity of Ig transmembrane and secretory mRNA forms in the cartilaginous fish. *Immunology*.173(2): 1129-1139.

Sambrook, J., D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. Tercera edición. New York.

Santana Morales, O., Castillo Géniz, J.L., Sosa Nishizaki, O., Rodríguez Medrano, C. 2004. Catálogo de tiburones, rayas y quimeras (chondrichthyes) que habitan en las aguas del norte del Golfo de California. Reporte técnico. Laboratorio de Ecología Pesquera. CICESE. 44. Recuperado de: <http://biblioteca.cicese.mx/libros/cat-omar.pdf>.

Schägger H., Von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166 (2):368-379.

Singletery, E.M., Rochman, A.S., Arias Bodmer, J.C., Holstege, C.P. 2005. Envenomations. *Medical Clinics of North America*. 89(6): 1195-1224.

Smith G.P., Petrenko V.A. 1997. Phage Display. *Chemical Reviews*. 97 (2): 391-410.

Smithers, R.H.N., 1944. Contributions to our knowledge of the genus *Latrodectus* in South Africa. *Annals of the South African Museum*. 36 (1), 263– 312.

Soriau, C., Hua, T.D., Lefranc, M.P. Weill, M. 1998. Présentation à la surface de phages filamenteux les multiples applications du phage display. *Médecine/sciences*. 3 (14): 300-309.

Sotelo-Cruz, N. Hurtado-Valenzuela, J.G., Gómez-Rivera, N. 2006. Envenenamiento en niños por mordedura de la araña "*Latrodectus mactans*" (viuda negra). Características clínicas y tratamiento. *Gaceta Médica de México*. 142 (2): 103-108.

Stanfield, R.L., Dooley, H., Flajnik M.F., Wilson, I.A. 2004. Crystal Structure of a Single-Domain Antibody V Region in Complex with Lysozyme. *Science*. 305(5691): 1770-1773.

Stevens, J., Compagno, L., Creagh, C., Dingerkus, G., Edwards, H. 1987. *Sharks*. Merehurst Press. London. 240.

Streltson, V.A., Varguese, J.N., Carmichael, J.A, Irving R.A., Hudson, P.J. Nuttall, S.D. 2004. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from cell-surface receptor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 101 (34): 12444-12449.

Tay Zavala, J., Díaz Sánchez, J.G., SánchezVega J.T., Castillo Alarcón, L., Ruiz Sánchez, D., Calderón Romero, L. 2004. Picaduras por alacranes y arañas ponzoñasas de México. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 47(1): 6-12.

Timms, P.K., Gibbons, R.B. 1986. Latrodectism-effects of the black widow spider bite. *Western Journal of medicine*. 144 (3): 315-317.

Ushkaryov, Y.A., Volynski, K.E., Ashton, A.C. 2004. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*, 43 (5): 527-542.

Ushkaryov, Y.A., Rohou, A., Sugita, S. 2008. α -Latrotoxin and Its Receptors. *Pharmacology of Neurotransmitter Release Handbook of Experimental Pharmacology*. 184(184): 171-206.

Vispo, N.S. 2004. *Combinatoria Molecular*. Elfos Scientiae. Cuba. 413.

Wesolowski, J., Alzogaray, V., Reyelt, J., Unger, M., Juarez, K., Urrutia, M., Cauerhff, A., Danquah, W., Rissiek, B., Scheuplein, F., Schwarz, N., Adriouch, S., Boyer, O., Seman, M., Licea, A., Serreze, D.V., Goldbaum, F.A., Haag, F., Koch-Nolte, F. 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Medical Microbiology and Immunology*. 198(3): 157-174.