



OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS TIPO vNAR, QUE RECONOCEN Y NEUTRALIZAN VENENOS DE LOS ALACRANES *Androctonus australis* y *Leiurus quinquestriatus*.

Diego Montoya^a, Elia Reza^{a,b}, Eduardo Morales^a y Alexei Licea^{a*} Laboratorio de Inmunología Molecular y Biotoxinas, Departamento de Biotecnología Marina C.I.C.E.S.E., Km. 107 Carretera Tijuana – Ensenada, 22860 Ensenada, Baja California, México^b Centro de Biociencias, Área de Biotecnología, Universidad Autónoma de Chiapas, Instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas, Carretera a Puerto Madero Km 2.0, 30700 Tapachula, Chiapas, México. * alicea@cicese.mx

Palabras clave: Anticuerpos neutralizantes, alacranismo, fragmentos vNAR.

Introducción. El alacranismo es un grave problema de salud pública en algunos países. Se presenta en muchas regiones en el mundo como en el Norte y Sur de África, India, Medio Oriente, Turquía, Francia, España, Mongolia, China, Asia Central y en América, en donde México tiene el mayor índice de escorpionismo a nivel mundial. El método tradicional de producción de antivenenos a partir de suero de animales inmunizados ha resultado ser un proceso muy costoso y lento en comparación con las nuevas tecnologías de producción de anticuerpos recombinantes que aparecieron en los últimos años, en las cuales se puede llevar a cabo la selección de anticuerpos que reconocen al antígeno de interés, a partir de bibliotecas peptídicas obtenidas por despliegue en fagos. En este trabajo, se pretende aislar fragmentos de anticuerpo tipo vNAR desplegados en proteínas de bacteriófagos, y seleccionar los que presenten mayor reconocimiento por el antígeno, y que logren neutralizarlo

Metodología. Por medio de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), se aislaron fracciones de los venenos de los alacranes *Androctonus australis* y *Leiurus quinquestriatus*, para ser utilizadas en ensayos *in vivo* en ratones, con la finalidad de detectar la fracción letal y utilizar esta fracción como nuestro antígeno. Las fracciones colectadas contenían 5 minutos. Una vez detectada la fracción letal, se subfraccionó para determinar cual era el péptido responsable de la letalidad. Utilizamos una biblioteca fasmídica no inmune de un tiburón *Heterodontus francisci* para seleccionar fragmentos de anticuerpo tipo vNAR específicos contra las fracciones letales de los venenos de *Androctonus australis* y *Leiurus quinquestriatus*. Se realizaron 3 rondas de selección.

Resultados y discusión. Para ambos venenos probados, se obtuvo solo una subfracción como responsable de la letalidad del veneno. Actualmente hemos aislado 20 clonas por cada veneno que contienen el fragmento vNAR que reconoce y potencialmente

neutraliza el efecto tóxico de la fracción letal de los venenos contra los cuales fueron seleccionados. Se ha probado su reconocimiento por medio de ensayos de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Mediante este ensayo de ELISA, se detectaron las 10 clonas que reconocían mejor a los antígenos (empleando veneno total) y se realizó un proceso de secuenciación de DNA.

Además se ha inmunizado un tiburón *Heterodontus francisci* con las dos fracciones letales detectadas anteriormente, esto con el propósito de elaborar una biblioteca inmune y realizar de nuevo rondas de selección para obtener fragmentos tipo vNAR, que reconozcan y neutralicen el efecto tóxico de las fracciones letales de los dos venenos, y así, comparar con los obtenidos a partir de la biblioteca no inmune.

Conclusiones. Los tiburones son un modelo ideal para aislar anticuerpos contra proteínas que son letales para los mamíferos, ya que estos no presentan los mismos blancos moleculares y no muestran ningún síntoma de envenenamiento. Pueden aislarse los anticuerpos tanto de bibliotecas inmunes, como de bibliotecas no inmunes.

Agradecimiento. Este proyecto fue apoyado por Instituto Bioclon SA de CV.