



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní, en el Estado de Campeche

ITESCAM

**SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE CALKINÍ EN EL ESTADO DE
CAMPECHE**

**“SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS DE CAMÉLIDOS CONTRA
VIRUS DE PLANTAS”**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERO BIOQUÍMICO

PRESENTA

LAURA ISABEL PECH HU

DIRECTOR Y CO-DIRECTOR

**DR. RUBÉN DARÍO CADENA NAVA
MTRO. DANIEL BOLÍVAR MORENO**

Calkiní, Campeche, México, 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche 45814
P/06/25/779
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. LAURA ISABEL PECH HU 5185
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DR. RUBÉN DARÍO CADENA NAVA, y el co-director MTRO. DANIEL BOLIVAR MORENO, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: "**SELECCIÓN DE NANOANTICUERPOS DE CAMÉLIDOS CONTRA VIRUS DE PLANTAS**".

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINI

"DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES"

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINI, CAMPECHE, MEXICO.

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



AGRADECIMIENTO

El contenido de este trabajo de investigación estuvo conformado de nuevos retos que requirieron de entrega, disciplina y dedicación para el desarrollo de cada una de las actividades asignadas, esto con el fin de lograr los objetivos propuestos. Me es muy satisfactorio saber y reconocer que me quedo con el mejor aprendizaje y conocimiento que me brindaron mis asesores, las personas directas e indirectas que formaron parte de mi preparación académica.

En primer lugar, quiero agradecerle al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNyN-UNAM) por aceptarme y darme la oportunidad de ser su estudiante residente y emplear sus equipos e instalaciones para el desarrollo de esta labor tan importante en mi formación educativa.

Al Dr. Rubén Darío Cadena Nava por haber depositado su confianza en mí para el desarrollo de este proyecto de investigación de gran relevancia y por permitirme ser parte de su grupo de investigación.

Al M.C. Daniel Bolívar Moreno por su contribución en el desarrollo de este proyecto de investigación y por orientarme cuando me surgían dudas sobre algunos temas.

Al M.C. Iván Andrés Rosales Fuerte por su apoyo incondicional y conocimiento que me brindó durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la M.C Kendra Ramírez Acosta por enseñarme a utilizar los equipos del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNyN-UNAM).

A la M.B.A. Itandehui Betanzos Gutiérrez y a la Dra. Katrin Quester por apoyarme y proporcionarme los materiales necesarios para el desarrollo del proyecto y estar siempre al pendiente de lo que se requería.

Al Instituto Tecnológico Superior de Calkini en el estado de Campeche (ITESCAM) , por brindarme la oportunidad de realizar una estancia académica de investigación en el CNYN-UNAM, ya que me permitió ampliar mis conocimientos y visualización hacia otros temas de investigación de gran relevancia, por la experiencia y las convivencias obtenidas durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A mi familia por todo el apoyo que me brindó durante este proceso, especialmente a mi madre y padre (que en paz descanse) por estar siempre pendiente de mí para lograr mis metas.

A Benito Cauich Chí, por formar parte de este proceso y por motivarme a salir adelante a pesar de las circunstancias.

A Dios por brindarme la oportunidad de conocer personas maravillosas durante mi preparación académica-profesional al guiarme en todo momento y darme paz en la vida a pesar de la partida de mi señor padre.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	5
2.1. Vigna Unguiculata (Caupí).....	5
2.2. Enfermedades fitopatológicas	6
2.3. Los virus y la importancia de su cápside proteica	8
2.4. Virus moteado clorótico del caupí (CCMV).....	9
2.5. Nanoanticuerpos.....	11
2.5.1. Estructura de los nanoanticuerpos.....	12
2.5.2. Propiedades de los nanoanticuerpos.....	14
2.6. Construcción de bibliotecas de nanoanticuerpos	15
2.7. Aplicación de los nanoanticuerpos	17
2.8. Despliegue en fago (phage display)	18
2.9. Bacteriógafo M13.....	20
2.10. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	23
2.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	29
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVO GENERAL.....	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA	35

4.1. Generación de la biblioteca inmune	35
4.2. Rescate y amplificación de bacteriófagos recombinantes, a través de la biblioteca inmune	35
4.3. Determinación de la cantidad de bacteriófagos recombinantes	36
4.4. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune (R0)	37
4.5. Producción de fago ayudador (VCM13)	37
4.6. Purificación del fago ayudador (VCM13)	38
4.7. Amplificación del fago ayudador (VCM13)	38
4.8. Preparación de la alícuota CCMV (1µg/µl)	38
4.9. Ronda de selección de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune (R0) y de las rondas R1, R2, R3	39
4.10. Amplificación de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección R1, R2, R3	40
4.11. Titulación de los bacteriófagos recombinantes (M13) de las ronda de selección R1, R2, R3	41
4.12. Eliminación de glicerol en los bacteriofagos recombinantes de las rondas de selección con PEG 6,000	41
4.13. Evaluación de la viabilidad de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección mediante la prueba ELISA	42
4.14. PCR de colonia	42
CAPÍTULO V. RESULTADOS	44
5.1. Rescate y amplificación de bacteriófagos recombinantes a través de la biblioteca inmune	44
5.2. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune (R0) ..	45
5.3. Producción de fago ayudador (VCM13)	46
5.4. Purificación del fago ayudador (VCM13)	46

5.5. Amplificación del fago ayudador (VCM13)	47
5.6. Preparación de la alícuota CCMV	47
5.7. Amplificación de los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección R1, R2, R3.	47
5.8. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de las ronda de selección.....	49
5.9. Ronda de selección de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune y de las rondas R1, R2 y R3.	50
5.10. Eliminación del glicerol en los bacteriófagos recombinantes de la ronda de selección (R0) con PEG 6000	51
5.11. Ensayo ELISA para evaluar la viabilidad de los fagos recombinantes.....	52
5.12. PCR de colonia.....	53
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIÓN	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

TABLA DE FIGURAS

Figura. 1. Efectos del CCMV en cultivos del frijol.	8
Figura. 2. CCMV obtenido por medio de Cryo-TEM.	10
Figura. 3. Representación esquemática de anticuerpos convencionales y de cadena pesada.....	13
Figura. 4. Representación de la construcción de una biblioteca de nanoanticuerpos empleando bacteriófagos.	15
Figura. 5. Representación del proceso de selección de nanoanticuerpos.....	19
Figura. 6. Estructura del bacteriófago M13.	20
Figura. 7. Generación del bacteriófago M13 recombinante.	22
Figura. 8. Selección del bacteriófago M13 recombinante contra el antígeno.	23
Figura. 9. Etapas del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) estándar.	25
Figura. 10. ELISA indirecto.	26
Figura. 11. ELISA directo.	27
Figura. 12. ELISA sandwich.	28
Figura. 13. ELISA competitivo.	29
Figura. 14. Ciclo de la reacción de cadena polimerasa (PCR).	32
Figura. 15. Transformación de células 5αF' a escala.	44
Figura. 16. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de la ronda 0.	45
Figura. 17. Titulación de los fagos recombinantes de las rondas de selección.	49
Figura. 18. Obtención de los bacteriófagos recombinantes amplificados de las rondas de selección contra el CCMV.	50
Figura. 19. ELISA de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección contra el CCMV.	52
Figura. 20. Electroforesis de los bacteriófagos recombinantes.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes empleados para la realización del PCR de colonia	43
Tabla 2. Condiciones empleadas en el termociclador para el PCR usando los oligonucleótidos VHH Back Sfil y VHH For Sfil	43
Tabla 3. Espectofotometría a relación A_{269}/A_{320} de las muestras VHH	44
Tabla 4. Espectofotometría A_{269}/A_{320} del fago ayudador	46
Tabla 5. Absorción a las longitudes de onda 269 y 320 nm del fago ayudador.....	46
Tabla 6. Preparación de la alicuota CCMV	47
Tabla 7. Absorción a las longitudes de onda 269 y 320 nm de las rondas de selección.	48
Tabla 8. Densidad óptica de los fagos recombinantes a longitudes de onda de 269 y 320 nm.	51

RESUMEN

El virus moteado clorótico del caupí (CCMV) es un agente patógeno importante que afecta a *Vigna unguiculata* (caupí), una leguminosa conocida por su alto valor nutricional y adaptabilidad a diferentes tipos de suelos. Esta enfermedad viral causa graves daños a los cultivos de esta leguminosa, entre las cuales se destaca la afectación de la lámina foliar, la carencia de vainas y la alteración de la distribución de la clorofila, lo que conlleva a pérdidas considerables de rendimiento, calidad y durabilidad. Para abordar este problema, en este trabajo de investigación se propone el desarrollo de un nanoanticuerpo específico (VHH) capaz de reconocer el CCMV con alta especificidad. Los nanoanticuerpos, derivados de camélidos ofrecen varias ventajas, debido a que son de tamaño pequeño, tiene alta afinidad de unión al antígeno, poseen estabilidad química y térmica. La investigación realizada en este proyecto empleó el método de selección de despliegue en fagos, para generar fagos recombinantes que muestren un dominio único VHH para reconocer a la proteína de la cápside del CCMV. Tras realizarse tres rondas de selección, los nanoanticuerpos resultantes se evaluaron mediante un ensayo ELISA, para confirmar su especificidad de unión al CCMV. El desarrollo de un nanoanticuerpo específico para el CCMV representa un enfoque biotecnológico prometedor para reducir el impacto de este virus en los cultivos de caupí. Al proporcionar una herramienta específica y eficaz para la detección o neutralización del virus, esta investigación contribuye al avance de las estrategias para proteger y sostener el cultivo del caupí.

ABSTRACT

Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) is an important pathogen affecting *Vigna unguiculata* (cowpea), a legume known for its high nutritional value and adaptability to different soil types. This viral disease causes serious damage to the crops of this legume, including leaf blade damage, pod failure, and alteration of chlorophyll distribution, leading to considerable losses in yield, quality, and durability. To address this problem, this research proposes the development of a specific nanoantibody (VHH) capable of recognizing CCMV with high specificity. The nanoantibodies, derived from camelids, offer several advantages, since they are small in size, have high antigen binding affinity, and possess chemical and thermal stability. The research conducted in this project employed the phage display selection method to generate recombinant phages displaying a unique VHH domain to recognize the CCMV capsid protein. After three rounds of selection, the resulting nanoantibodies were evaluated by an ELISA assay to confirm their binding specificity to CCMV. The development of a CCMV-specific nanoantibody represents a promising biotechnological approach to reduce the impact of this virus on cowpea crops. By providing a specific and effective tool for the detection or neutralization of the virus, this research contributes to the advancement of strategies to protect and sustain cowpea cultivation.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Vigna unguiculata (Caupí) es proveniente de África central, de importancia agronómica, medioambiental y económica para las zonas semiáridas del trópico (Araméndiz et al., 2011). Esta leguminosa puede desarrollarse en diferentes tipos de suelos, soporta elevadas temperaturas, resiste a la sequía y a la baja fertilidad del suelo (Carvalho et al., 2016). Así mismo, puede establecer simbiosis con *Rhizobium* y hongos micorrízicos lo que le permite disminuir el uso de fertilizantes y favorecer las propiedades del suelo (Carvalho et al., 2016; Fageria et al., 2005). Los atributos mencionados con anterioridad le permite a *vigna unguiculata* ser empleada para el diseño de agroecosistemas sostenibles (Carneiro et al., 2019). Se estima una producción de 11 millones de hectáreas en el mundo (Cardeiro et al., 2019); por lo que en el 2019 el Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP), emitió que en la península de Yucatán se destinaron 254 hectáreas para la siembra de este cultivo y en la que se obtuvo una cosecha de 882 toneladas. En el estado de Oaxaca, específicamente en la ciudad de San Pedro Pochutla el cultivo de *vigna unguiculata* (Caupí) ha sido considerado como una alternativa para incorporar en los sistemas de producción, debido al excelente desarrollo y rendimiento que presentan a suelos pocos fértiles, ya que en años recientes las lluvias han sido muy erráticas (Sánchez Ríos O.F & Guitiérrez López K.G. 2022).

Las escasas lluvias que han surgido por estas zonas han sido benéficas para los diversos tipos de cultivos, ya que representan un gran ahorro de agua en temporadas cruciales, sin embargo conlleva a que la humedad relativa aumente y si se encuentra asociado a bajas temperaturas se dan las condiciones necesarias para el desarrollo de diferentes tipos de enfermedades (SAGARPA, 2013). La producción de *vigna unguiculata* (Caupí) en los últimos años se ha visto perturbado por una enfermedad de origen viral, caracterizada por la anomalía de la lámina foliar, la carencia de vainas y la alteración en la distribución de la clorofila, provocado específicamente por el CCMV (Morales F.J et al., 1999). Las enfermedades ocasionada por virus en plantas poseen un panorama amplio para realizar un diagnóstico oportuno, aún cuando es generado por el mismo virus, en ocasiones la sintomatología va dependiendo de la interacción que surga entre el virus, hospedante y de las condiciones ambientales

para desarrollarse (Gergerich, R.C.; Dolja, V.V. 2006). En ocasiones las infecciones presentes sobre los cultivos pueden ser asintomáticas o severas que provocaría la muerte de la planta; a menudo los síntomas que se producen son poco visibles y pueden ser fácilmente aunado con la carencia de nutrientes o daño por el uso herbicidas. Estas afectaciones pueden observarse muy a menudo en las hojas, brotes, frutos y flores de la planta; y en muchas ocasiones provocan enanismo, moteado, mosaico, clorosis, necrosis y alteración a la lámina foliar. Existen métodos específicos y confiables para la identificación viral, estos se basan en el análisis de la estructura, patogenicidad, arquitectura y transmisibilidad de las partículas virales para un estudio eficaz sobre la infección (Gergerich, R.C.; Dolja, V.V. 2006).

Debido a esta problemática la producción en los cultivos de *vigna unguiculata* (caupí) se ha visto afectado en cuanto a rendimiento, calidad y durabilidad de los productos generados, de tal manera que esto estaría repercutiendo en la inestabilidad de diversas empresas agrícolas y del déficit alimenticio mundial.

Es por ello, que en este trabajo de investigación se propone la creación de una alternativa que nos propicie un diagnóstico temprano y eficiente contra el CCMV mediante el uso de nanoanticuerpos de camélidos. Para llevar a cabo tal propósito y probar el concepto se empleó el método de despliegue en fagos para la obtención de los fagos recombinantes capaces de reconocer el antígeno de interés. En particular, el CCMV se ha caracterizado como un sistema modelo debido a las incomparables ventajas que posee como portador de epítopos y a las diversas aplicaciones en nanomedicina y veterinaria (Gergerich, R.C.; Dolja, V.V. 2006; Nuñez-Rivera, 2020; Ramos-Carreño, 2021).

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1. *Vigna Unguiculata* (Caupí)

Vigna unguiculata, es una leguminosa procedente del continente africano que se adapta a diferentes texturas de suelo (Carvalho et al., 2012), en el 2017 se obtuvo una producción de 7,407,924 toneladas de este cultivo. El mayor productor-consumidor a nivel continental de esta leguminosa es Nigeria con el 48% (Adeola, Folorunso, Gama, Amodu & Owolabi, 2011; FAO, 2018). *Vigna Unguiculata* se caracteriza por poseer un alto valor nutricional, representar el 69 % de carbohidratos, contener micronutrientes tales como el K, Na, Ca, Zn, Mg, P, Fe (Famata et al., 2013), poseer entre el 20-25% de proteína integrada por el 51% de globulinas, 45 % albúmina, 1% de prolaminas, y 3% glutelinas (Adeola et al., 2011; Freitas, Teixeira & Ferreira, 2004). Estas características permiten reducir la desigualdad alimenticia de las poblaciones tropicales más vulnerables (Modu, Putai, & Petu-Ibikunle, 2010; Phillips et al., 2003); la universidad de Córdoba en la costa del caribe, reportó mediante su programa de mejoramiento 43 genotipos colombianos de esta leguminosa, que presentan una capacidad del 26 % de proteína obtenida (De-Paula, Jarma-Arroyo & Aramendiz-Tatis, 2018).

Vigna Unguiculata tolera la sequía, posee una excelente capacidad para la fijación de nitrógeno, se adecúa a distintos sistemas de cultivo (Goncalves et al. 2016), es rico en carbohidratos y proteínas (Menssen et al. 2017), su cultivo es económico y suele ser rentable para los productores (Deng et al. 2013, Segura-Campos et al. 2013). En el sureste de México esta leguminosa es conocida como frijo pelón o xpelón y en el centro y norte del país es conocida como chicharo ojito de vaca, frijol yorimón o frijol chino (Lagunes-Espinoza et al. 2008). En la península de Yucatán su cultivo se desarrolla en un sistema temporal o convencional (Arias et al. 2004, SIAP 2017). Su producción le permite obtener un ingreso económico a aquellos productores que se dedican a su cultivo; esta leguminosa se puede consumir de varias maneras y va dependiendo de los platillos la región (García-Hernández et al. 2005, Márquez-Quiroz et al. 2015).

Con el paso de los años Vigna Unguilata a presentado una creciente demanda en el mercado (Stoilova y Pereira 2013, Wamalwa et al. 2016); es por ello que en el 2002 Coulibaly y Lowenberg-DeBoer señalan que la calidad de la semilla de esta leguminosa se encuentra estrechamente relacionada con sus características morfológicas (tamaño, color, grosor y textura). En África y Sudamérica se han llevado acabo estudios de caracterización de esta leguminosa y han reportado una gran diversidad genética; En el 2010 Ghalmi et. al., identificaron en esta leguminosa una gran variabilidad en el color de grano y detectaron que el 72% de esa variabilidad poseía textura suave; En el 2017 Mafakheri et. al., evaluó diferentes genotipos en cuanto al tamaño, longitud, ancho y espesor de la semilla, obteniendo como resultado una variación en todas, por su parte Menssen et al., reportó que el peso de 100 semillas de esta leguminosa es de aproximadamente 7.67-15.15 gr.

El caupí posee semillas de diferentes colores (Monsalve Castro, 2007), es capaz de adaptarse a diferentes tipos de suelos ácidos del caribe y es considerada como una gran alternativa económica de cultivo de ciclo corto para los productores (Granito, Guerra, Torres & Guinand, 2004). Actualmente no se tiene demasiada información acerca del ingreso económico de los productores, de su producción y de la inversión que se realizan. En México los avances sobre la diversidad morfológica del caupí son pocos, es por ello que no se tienen datos concretos y la mayoría de los productores optan por seleccionar la semilla de sus propias cosechas para seguir manteniendo la variedad criolla (Moreno L.L et al. 2006). La falta de conocimiento científico, puede afectar la genética del caupí en la región para la preservación del recurso genético y por ende provocar la pérdida del conocimiento ancestral (Vara-Sánchez y Padilla 2013).

2.2. Enfermedades fitopatológicas

Este tipo de enfermedades no suelen tener una sola causa, por lo que los síntomas que se perciben pueden ser generados por las condiciones climáticas, el sistema de producción, variedad empleada y la presencia de residuos contaminados de cosechas anteriores. También puede deberse a los cambios bruscos de temperatura, humedad y de las condiciones en la que se encuentre el suelo a trabajar (preparación del suelo,

densidad de la siembra y el manejo agronómico del cultivo) (Araya Fernández C.M; Hernández Fonseca J.C. 2006).

La infección por microorganismos involucra agentes patógenos (bacterias, hongos, nemátodos y virus), que se asocian a las distintas enfermedades que presentan los cultivos, y que provocan grandes pérdidas en su producción. Para que una enfermedad pueda desarrollarse debe existir la presencia de un patógeno, de un genotipo idóneo a este, así como de condiciones ambientales específicas que los favorezca a ambos (Valdés Reséndiz, O. E. 2015).

En *Vigna Unguilata* se puede observar una gran diversidad en la severidad del ataque, identidad y distribución de afectaciones en las distintas épocas del año. Las afectaciones cuyos agentes causantes constituyen un grupo de patógenos de características definidas son las enfermedades virales. El indicio más frecuente que se presenta en este tipo de especie es la alteración de la distribución de la clorofila en las hojas, así como los diversos grados de clorosis en las zonas verdes de la planta, este suceso a hecho común la enfermedad denominada “tipo mosaico” (Valdés Reséndiz, O. E. 2015).

A principio de los años noventa, la producción en el cultivo de frijol se ha visto afectado por una enfermedad de origen viral, la cual se encuentra determinada por la afectación de la lámina foliar, la carencia de vainas y las alteraciones de sus hojas que van desde verde claro hasta amarillo, provocada específicamente por el CCMV (Morales F.J et al.,1999). El agente causante de estos síntomas es debido al CCMV, produciendo principalmente manchas cloróticas (amarillas) en forma de mosaico en las láminas jóvenes, mientras que su efecto en las láminas adultas se identifican por la presencia de manchas amarillas que incluyen enrollamiento y afectaciones tempranas que le provocan un severo enanismo a la planta. Sin embargo, estas manifestaciones dependen en alto grado de la variedad de frijol empleado, ya que de acuerdo a esto existen algunas variedades altamente susceptibles, donde no solo aparecen manchas cloróticas, sino que viene acompañado de un enanismo muy marcado y del sintoma denominado “escoba de bruja” (Figura 1) (Araya Fernández C.M & Hernández Fonseca J.C. 2006).

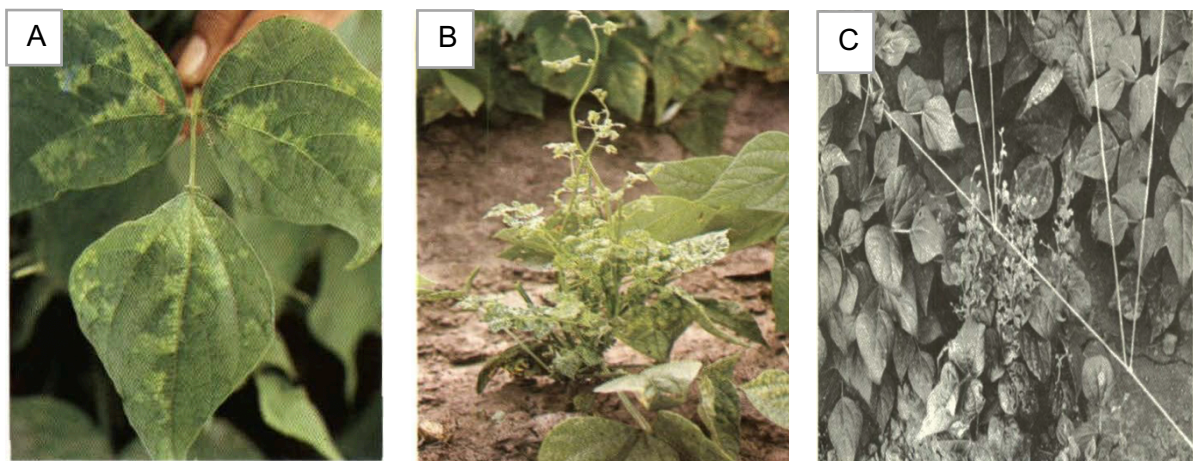


Figura 1. Efectos del CCMV en cultivos del frijol. A) En láminas jóvenes produce manchas cloróticas en forma de mosaicos; B) En láminas adultas presencia manchas amarillas que incluyen enrollamiento y enanismo; C) Por el tipo de variedad posee manchas cloróticas y enanismo muy marcado. Imagen tomada de Araya Fernández C.M & Hernandez Fonseca J.C.2006.

De acuerdo a la variedad empleada, los cultivos de *Vigna Unguolata* poseen diferentes grados de resistencia frente a estas afectaciones, adaptación, sitio, rendimiento y porte. Es por ello que para llevar a cabo un análisis eficaz sobre las afectaciones sobre estos cultivos se requiere de la recolección de láminas enfermas en distintas etapas de infección. Las enfermedades virales ocasionadas por virus poseen una gran distribución geográfica y los síntomas que se presentan a menudo son distintos y esto fácilmente puede confundirse con otro tipo de afectación (deficiencia de nutrientes, toxicidades o alteraciones ambientales). Una de las principales manifestaciones que se presenta es la alteración en la distribución de la clorofila que implica la formación de mosaicos, enanismo, láminas deformes, venas pronunciadas, el ciclo de vida de la planta es diminuta o larga y las vainas son escasas (Araya Fernández C.M & Hernández Fonseca J.C. 2006).

2.3. Los virus y la importancia de su cápside proteica

En 1892 Ivanowsky realizó el descubrimiento de los virus y desde entonces se ha tratado de determinar a estos agentes patógenos de acuerdo a sus principales características, sin embargo no existe un criterio exacto para especificarlo. Debido a sus propiedades establecidas se podría definir a los virus como aquellos parásitos potencialmente obligados, conformados por nucleoproteínas y de dimensión

ultramicroscópica (Valdés Reséndiz, O. E. 2015). Los virus son agentes patógenos que están constituidos básicamente una capa de proteína denominada cápside que protege a su material genético y que se replica mediante una máquina metabólica de su célula huésped. Los virus se encuentran en todos los reinos de la vida: bacterias, hongos, plantas, animales. Las proteínas que conforman la cápside pueden autoensamblarse en nanopartículas idénticas al virus nativo. Estas nanoestructuras son definidas como partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés), se encuentran establecidas en la proteína de la cápside del virus, la cual pueden tener en su interior alguna molécula de interés o estar vacías; esta capacidad puede ser explotada en la industria farmacéutica para su uso como nanovehículos de fármacos (Valdés Reséndiz, O. E. 2015).

Estas nanoestructuras (VLPs) poseen una geometría icosaédrica y un diámetro de aproximadamente 20-300 nanómetros. Esto le permite tener un confinamiento amplio de materiales en su interior. La cápside es una estructura con poros por la cual puede haber difusión de moléculas de tamaño pequeño del exterior al interior o viceversa. Esta característica de la cápside es de gran interés para su empleo como un bionanoreactor cuando en su interior se tienen enzimas, de tal manera que mediante los poros entra el sustrato y el producto es liberado, y a su vez la enzima es protegida de un posible medio desfavorable para esta (Valdés Reséndiz, O. E. 2015).

El virus moteado clorótico del caupí (CCMV por sus siglas en inglés) es un virus de gran importancia debido a que es un virus no envuelto estructurado solo por una cápside y de material genético. El CCMV posee un gran interés en el área de biotecnología, por su capacidad de ser usado para la síntesis de bionanorreactores al confinar enzimas dentro de las cápsides (Patterson D. P., Prevelige P.E, & Douglas, T., 2012). Además, puede ser usado como nanovehículos de moléculas de importancia en medicina (Azizgolshani et al., 2013).

2.4. Virus moteado clorótico del caupí (CCMV)

El CCMV, es un virus de planta conformado por un ARN de cadena sencilla y positiva, contenido en una cápside de 28 nm de diámetro y constituida por 180 proteínas idénticas de un peso molecular de 19.4 kDa (Figura 2). Proviene de la familia

bromoviridae que afecta generalmente a plantas del género *vigna*, ocasionando un mosaico o manchas amarillas en sus hojas (Fox, et al. 1998). Es un virus atractivo que se ha empleado en área de biotecnología para la entrega de genes, fármacos y antígenos (Singh et al. 2017); es uno de los más estudiados debido a que permite obtener mediante *in vitro* VLPs mediante la cápside (Lam, P., & Steinmetz, N. F. 2019). En ausencia de ácidos nucleicos puede ensamblarse mediante los arreglos macromoléculas (Zinkhan et. al 2021) y empaquetar polímeros aniónicos. La cápside de este virus es muy prometedora debido a que puede ser empleada como acarreador de antígenos y su excelente seguridad *in vivo* en distintos biomodelos (Timmermans et.al, 2018) y sus aplicaciones en biomédica (Hassani-Mehraban et.al.,2015).

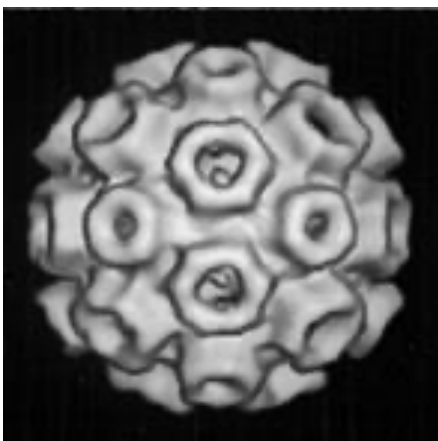


Figura 2. CCMV obtenido por medio de Cryo-TEM.
Imagen tomada de Fox, et al. (1998).

El genoma del CCMV se encuentra distribuido en tres ARN mensajeros de cadena sencilla; La cadena de ARN1, es aquella que codifica la proteína con funciones tipo helicasa para la replicación del ARN; La cadena ARN2, codifica a la ARN polimerasa; por su parte la ARN3, codifica a la proteína de movimiento necesaria para su propagación entre células. Por último, la cadena subgenómica derivada de ARN3 y ARN4, codifican a la proteína de la cápside (Annamalai, P., & Rao, A.L. 2006). Cada subunidad de este icosaedro posee un brazo N-terminal largo compuesto por una alta concentración de residuos básicos y un dominio globular que le confiere el entrecruzamiento con la cola C-terminal del virión. Esta configuración adjudica la interacción electrostática entre polipéptidos cargados positivamente con ARN de carga

negativa necesaria un correcto ensamble con el virión. Se ha detectado que la presencia del brazo N-terminal es indispensable para su actividad infecciosa (Cuillel, M., Jacrot, B., & Zulauf, M., 1981).

El virus CCMV se ha estudiado desde hace más 50 años, uno de los pioneros en el estudio de este virus fue Bancroft en los años sesenta, a partir de su aislamiento. Varios estudios han revelado que una de las propiedades especiales del CCMV se debe particularmente su alto rendimiento de producción de hasta 1 mg por gramo de hojas y a la capacidad de las proteínas de su cápside de autoensamblarse a ciertas condiciones de pH y fuerza iónica (Bancroft, J.B., Hiebert E., & Bracker, C.E., 1969). De acuerdo a los estudios realizados en el 2011 por Minten y colaboradores sobre las VPLs derivadas del CCMV, descubrieron que en una cápside se puede confinar más de una enzima y en consecuencia incrementar su actividad enzimática. En el 2014 Sánchez-Sánchez et. al., efectuó la activación de profármacos mediante la encapsidación del citocromo-P450 en VPLs de CCMV, basado en el trabajo de Comellas-Aragones et. al., publicado en el 2007, en el que se detalla la encapsidación de una peroxidasa, actividad catalítica y la difusión de sustratos- productos a través de la porosidad de capsida de VLP.

Mediante *E. Coli* puede ser generada de forma eficiente la cápside de este virus (Díaz-Valle et.al.2015) (Garmann et.al.2014), dado a que los resultados obtenidos son altos en rendimiento y se encuentra respaldado por la evaluación de estudios biofísicos, nanotecnológico y de aplicaciones biomédicas (Lavelle, L., Michel, J. P., & Gingery, M. 2007). Las ventajas que ofrecen las VLPs derivadas de virus de plantas destacan su posible modificación genética o química para exponer distintas moléculas. En comparación con los vectores adenovirales, la el CCMV al ser un virus fitopatógeno no puede replicarse en mamíferos por lo cual tiene la ventaja de ser un sistema seguro para su uso en nanomedicina.

2.5. Nanoanticuerpos

Desde el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales realizado por Köhler, G., & Milstein, C., en el año 1975, su empleo ha sido ampliamente explorado por la humanidad para la detección directa e indirecta de moléculas blanco, diagnóstico

clínico, desarrollo biotecnológico e inmunoterapia. Sin embargo, la presencia de características inherentes relacionadas con su tamaño, aplicación, baja estabilidad y elevado costo de producción, ha generado la búsqueda y puesto en marcha el desarrollo de nuevas alternativas (Singh et al., 2018).

Más tarde en el año de 1993 el grupo de Harmers-Casterman, encontró en el suero de *Camelus dromedarius* anticuerpos compuestos únicamente por cadenas pesadas y antiuerpos similares en el tiburón nodriza (Greenberg et al, 1995), este descubrimiento generó una perspectiva no explorada, puesto que la región de reconocimiento está conformada por un dominio variable de la cadena pesada. En los camellos se han reportado una producción del 50-80% de anticuerpos generados de manera natural, mientras que en el tiburón nodriza 0.1- 1%.

El reconocimiento de algunos virus y el reclutamiento celular son una de las funciones que se le ha atribuido (Muyldermans, 2013); su dominio es considerado como el reconocimiento natural más pequeño y que se diferencia acorde a sus características estructurales de acuerdo a su origen. En los anticuerpos convencionales los dominios variables son definidos como VH, en los tiburones son establecidos como V-NAR y en camélidos VHH (Muyldermans, 2013). Estos últimos son conocidos como nanoanticuerpos (Jovčevska & Muyldermans, 2020), se identifican por su pequeño tamaño, estabilidad, solubilidad y alta especificidad, estas cualidades le permiten ser una atractiva opción para su desarrollo.

2.5.1. Estructura de los nanoanticuerpos

Existe una gran diferencia en cuanto a la estructura de la inmunoglobulina tipo IgG frente a los anticuerpos de cadena pesada; la primera está constituida por una estructura heterodimérica que contiene dos cadenas pesadas idénticas con cuatro dominios y dos cadenas ligeras idénticas con dos dominios, con un peso de alrededor 150 kDa (Padlan, 1994); mientras que los anticuerpos de cadena pesada están definidos por una estructura homodimérica, constituida por dos dominios constantes (CH2-CH3) en ausencia del dominio CH1 y de cadenas ligeras; por otra parte en tiburones existen 5 dominios constantes con un peso alrededor de 90 kDa (Muyldermans, 2013; Nuttall et al., 2001) (Figura 3).

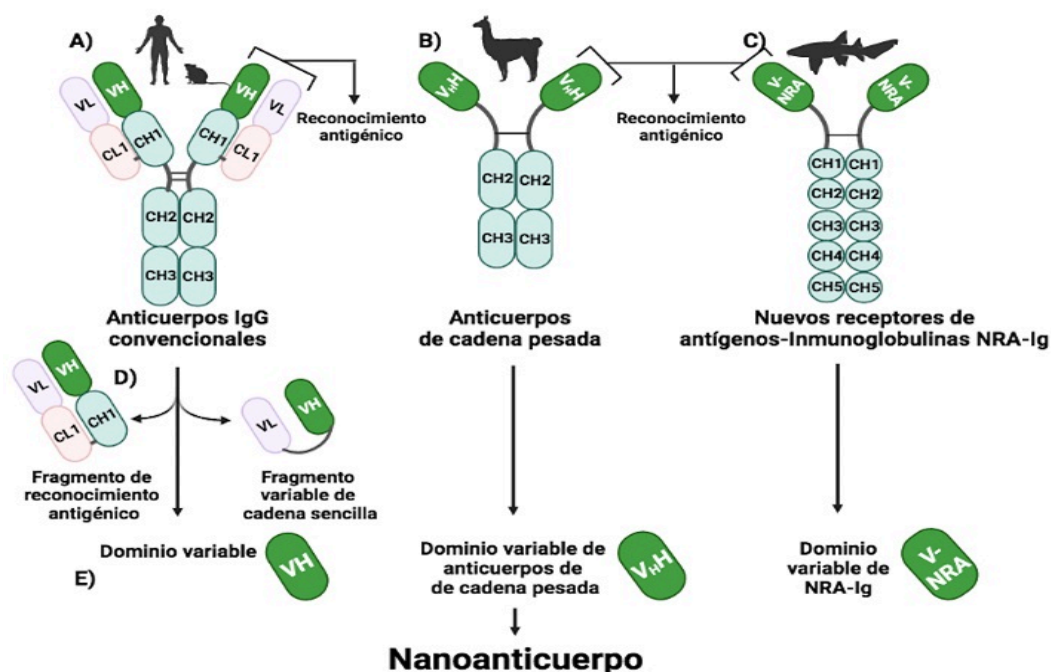


Figura 3. Representación esquemática de los anticuerpos convencionales y de cadena pesada. A) Los anticuerpos IgG poseen estructura heterodimérica, el cual se encuentra constituido por 2 cadenas pesadas (CH1, CH2, CH3 y un VH), 2 cadenas ligeras (CL1 y VL) y una región de reconocimiento antigénico (VH y VL); B) Los anticuerpos de cadenas pesadas cuentan con una estructura homodimérica (CH2,CH3) y una región de reconocimiento antigénico (VHH); C) NRA-Ig- es considerado como el nuevo receptor antigénico de Inmunoglobulinas que tiene una estructura homodimérica de dos cadenas pesadas (CH1-5) y una región de reconocimiento antigénico (V-NAR); D) Segmento de reconocimiento antigénico (CH1-CL1 y VH-VL) y segmento variable de cadena sencilla (VH-VL). E) Dominio variable de reconocimiento. Imagen modificada de Ortega-Portilla et.al. (2021).

En los nanoanticuerpos la región antigénica de reconocimiento posee un único dominio variable por cadena con un peso aproximado de 15 kDa. Posee cualidades estructurales únicas de acuerdo a su origen y a pesar de ser 10 veces menor que un anticuerpo convencional posee una excelente capacidad de reconocimiento, esto se debe a las regiones determinantes de complementariedad presentes mejor conocidas como CDRs (Complementarity Determining Regions, por sus siglas en inglés). En camélidos existen 3 CDRs por cada dominio, CDR1 y CDR3 poseen mayor longitud y variabilidad; CDR3 en nanoanticuerpos tiene 4-6 residuos de aminoácidos extras con respecto a los dominios de cadena pesada de anticuerpos convencionales tipo igG. La estabilidad de la estructura es dada por el puente de disulfuro extra que existe entre CDR1 y CDR3 (Govaert et al., 2012 ; Stanfield et.al.,2007). Estas cualidades le brinda

una superficie que le permite reconocer antígenos similares a los fragmentos de reconocimiento de cadena sencilla (Siontorou, 2013). De acuerdo a su secuenciación se han identificado aminoácidos hidrofóbicos hacia los dominios variables de los anticuerpos tipo IgG. Esto se debe a que no existe una cadena ligera variable (Muyldermans, 2013), y por los cambios que surgen cuando se sustituye la valina por tirosina o fenilalanina, la glicina-ácido glutámico, leucina-arginina, triptófano-glicina (Muyldermans, 2013 ; Atarhouch, Saldanha, Barbosa & Hamers, 1994; Harmsen et al., 2000). Estas sustituciones de plegamiento le permite tener una mayor solubilidad y por ende una alargada estructura que le permite tener más exposición hacia el sitio de unión del anticuerpo con el antígeno.

2.5.2. Propiedades de los nanoanticuerpos

Dentro de las propiedades que poseen los nanoanticuerpos se encuentra su excelente capacidad de unión a epítopos con rango de una fracción decimal de un molar (Sokolosky et.al., 2016; Valdez-Cruz et.al., 2021), estabilidad conformacional, tolerancia térmica (Cortez-Retamozo et al., 2004 ; Wang et al., 2014), conserva su solubilidad a pesar de estar frente a condiciones extremas de presión (Dumoulin et al., 2002). Su aplicación en el área del cáncer e infección parasitaria ha proporcionado resultados exitosos (Cortez-Retamozo et al, 2004 ; Baral et al, 2006). Posee el 95 % de similitud con las cadenas pesadas de los humanos (Klarenbeek et al., 2015), por lo que la creación de su biblioteca es una alternativa que se ha optado para aumentar su aplicación terapéutica (Vincke et.al.,2009). Por su parte su cristalización ha permitido establecer la unión entre una molécula blanco y los nanoanticuerpos. De acuerdo con lo anterior, es posible su uso como estabilizadores estructurales (Korotkov et.al., 2009; Wrapp et.al., 2020). Los nanoanticuerpos poseen una estructura monomérica que posibilita el reconocimiento de antígenos y mediante el empleo de técnicas de biología molecular se pueden conseguir estructuras multiméricas (Zhu et.al., 2010); con el formato bi-específico se pueden contemplar dos secuencias antigénicas al mismo tiempo (Els Conrath et.al.,2001). Se puede conjugar con enzimas como la peroxidasa de rábano, radionúcleos tal como el galio 68, moléculas como el fluorocromos y nanopartículas para propósitos específicos (Cortez-Retamozo et.al., 2004).

2.6. Construcción de bibliotecas de nanoanticuerpos

Los nanoanticuerpos creados a través de bibliotecas inmunes (figura 4) se encuentran estrechamente relacionados con la inmunización de un antígeno o molécula de interés hacia aquellos que la producen de forma natural; animales como las alpacas, llamas y camellos, son comunmente empleados para la construcción de estas bibliotecas (Liu et al., 2018).

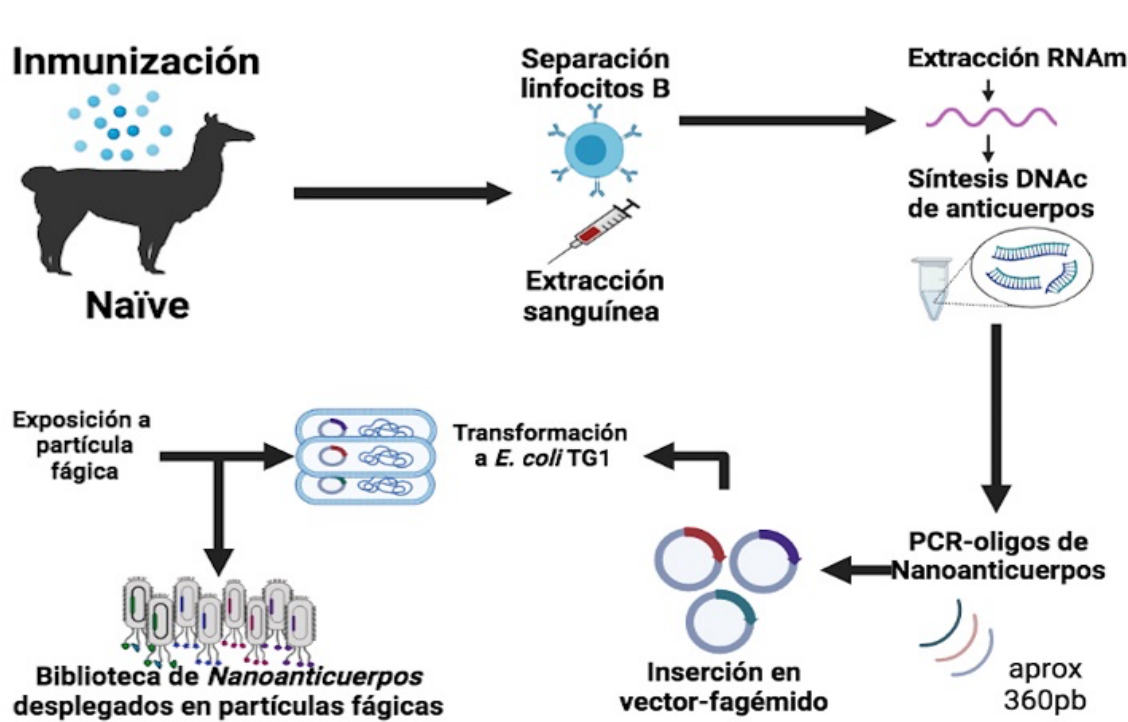


Figura 4. Representación de la construcción de una biblioteca de nanoanticuerpos empleando bacteriófagos. Lo primero que se realiza es la obtención de la muestra de sangre proveniente de los camélidos inmunizados, posteriormente se separan los linfocitos B y el ARNm. Mientras que a través de la técnica de PCR-RT se extrae el ADNc que se exhibirá en los oligos para amplificar al nanoanticuerpo específico y posteriormente sean expresados en los vectores de clonación utilizados para transformar a *E. Coli TG1*, generando de esta manera la biblioteca de nanoanticuerpos, los cuales serán expuestos en el bacteriófago para que interactúen con la molécula blanca. Imagen tomada de Ortega-Portilla et.al (2021).

Establecido el proceso de inmunización, el ARNm es aislado de los linfocitos de la muestra (sangre periférica), para su transformación a ADN complementario y posteriormente ser empleado como base para crear copias de la fracción variable de los anticuerpos. Cada uno de estos tendrá una longitud de alrededor 120 residuos de aminoácidos codificados por una secuencia génica alrededor de 360 pares de bases.

Las fracciones obtenidas son ensamblados en vectores de clonación, un ejemplo de ello son los fagémidos, que se distinguen por originarse de la replicación de un plásmido y bacteriófago, lo que favorece el despliegue de los nanoanticuerpos sobre una superficie fágica al estar expuesto a un fago adyuvante. Entre las estrategias de diseño para seleccionar clonas transformadas por bacteriófagos para reconocer a los nanoanticuerpos solubles, se encuentra la resistencia de los antibióticos hacia los vectores de clonación y a las secuencias de poli-histidinas o c-Myc. Los vectores de clonación, son usados comunmente como transportadores de secuencias variables que se utilizan para transformar a *E.Coli* en una biblioteca de nanoanticuerpos (Ortega-Portilla et.al.,2021). Por último, a través de la relación que se establece entre la partícula fágica adyuvante y la biblioteca con presencia de bacterias, se puede llevar a cabo el despliegue de los nanoanticuerpos sobre la superficie del bacteriófago, generando de esta manera una plataforma capaz de interactuar con la molécula blanca (Salvador, Vilaplana & Marco, 2019 ; Wang et.al., 2016).

Con la biblioteca de expresión de los bacteriófagos generados, se puede obtener nanoanticuerpos recombinantes compuestos de linfocitos inmunizados (Holliger y Hudson, 2005) obtenidos del esquema de inmunización (6-8 semanas); el espécimen generado puede dar como resultado anticuerpos de cadenas pesadas (hcAbs) de alta afinidad contra el antígeno. Por otra parte, en la sangre periférica del espécimen inmunizado se llevo acabo la purificación de los linfocitos B, esto con el fin de amplificar los genes de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos con dominio VH y VHH (Rosales-Fuerte I.A., 2020). Los genes amplificados pasan por un proceso de clonación para realizar la expresión del dominio VHH sobre la proteína de la cápside del fago M13, dando origen a la construcción de una biblioteca de nanoanticuerpos en fagos filamentosos (Arbabi Ghahroudi et al., 1997; Barbas III et al., 2001; van der Linden et al., 2000). Con la biblioteca construida se llevo acabo la selección de los VHH contra el antígeno de interes inmovilizado, esto con el objetivo de alcanzar una representividad elevada en comparación a la biblioteca original, por lo que los nanoanticuerpos aislados tendrán una alta afinidad tanto en las constantes de disociación nanomolar / subnanomolar (Pellis et al., 2012).

Estas bibliotecas VHH son mucho más eficientes en comparación a las bibliotecas derivadas de anticuerpos tipo IgG. Esto se debe a que su especificidad depende únicamente de un dominio y ya clonado obtiene su especificidad original. Mientras que la especificidad de las bibliotecas de anticuerpos de tipo IgG dependen de la interacción de los dominios VH y VL, el cual puede perderse durante la clonación individual y resultar desfavorable para el ensamble de sus genes, los cuales se combinan aleatoriamente, provocando que su especificidad original sea de muy baja frecuencia. Sin embargo, aquellas bibliotecas que contengan una diversidad de 10^6 son sumamente representativa para el repertorio VHH, caso contrario a las bibliotecas que posean una diversidad de 10^9 de clones del fragmento variable de cadena sencilla para lograr su representatividad (Rosales-Fuerte I.A., 2020).

Debido a la alta diversidad que poseen las bibliotecas VHH, es posible llevar a cabo la selección de nanoanticuerpos contra el antígeno de la inmunización del espécimen (Tanha et al., 2001), sin embargo al llevar a cabo su selección de esta manera se puede obtener una afinidad baja, pero puede mejorarse empleando los métodos de selección (*in vitro*) adecuados (Yau et al., 2005). Por su parte, los nanoanticuerpos obtenidos de bibliotecas inmunes proporcionan una maduración *in vivo*, poseen un alto grado para la preservación de las secuencias obtenidas de las regiones variables, a diferencia de otros formatos donde se tiene que realizar el acoplamiento de secuencias génicas de las cadenas ligeras y pesadas mediante un péptido adicional (Muyldermans, 2013). No obstante, cabe mencionar que por cada molécula blanca se tiene que repetir todo el proceso, pero esto es casi imposible debido a que su naturaleza no inmunogénica no permite su inmunización.

2.7. Aplicación de los nanoanticuerpos

De acuerdo a las características que presentan los nanoanticuerpos (tamaño pequeño, alta afinidad y estabilidad, su capacidad de desplegarse, elevada especificidad y bajo costo de producción) se han convertido en moléculas altamente versátiles con aplicaciones en diversas áreas de la salud entre las cuales se destaca el tratamiento del cáncer e identificación de un proceso infeccioso provocado por algún microorganismo (De Meyer, Muyldermans & Depicker, 2014). Por su parte la industria

agropecuaria y alimentaria, han hecho uso de los nanoanticuerpos por su alta efectividad como métodos de identificación y detección de toxinas producidas por microorganismos. Un ejemplo claro, es el uso del bioinsecticida creado a base de micotoxinas de *Aspergillus flavus* (Ren et al, 2020) y para el control de plagas agrícolas mediante *Bacillus thuringiensis* (Xu et al., 2017).

2.8. Despliegue en fago (phage display)

El despliegue en fago, es la técnica de selección más empleada y tiene como principio el establecimiento de la relación del genotipo-fenotipo del bacteriofago, en otras palabras, asocia la proteína situada en la cápside viral con el gen codificante (Wu, Liu, Lu & Wu, 2016). Método descrito en el año 1985 por el Dr. Georg P. Smith y galardonado en año 2018 con el premio nobel de química por su contribución a la biotecnología (Smith, 1985).

El proceso de despliegue en nanoanticuerpos a través de partículas fágicas, se lleva a cabo mediante el establecimiento de la proteína de superficie (PIII) que se encuentra situada en el extremo del fago, para obtener una óptima interacción con la molécula blanco. Posteriormente, con la realización de múltiples rondas de exposición con el antígeno se lleva a cabo su proceso de selección y a través de las estrategias metodológicas, se es posible aislar a los nanoanticuerpos con mayor presencia de afinidad. Finalmente, se realiza la evaluación del reconocimiento de las clonas individuales con la molécula de interés con el fin de obtener solo a los nanoanticuerpos solubles (Figura 5).

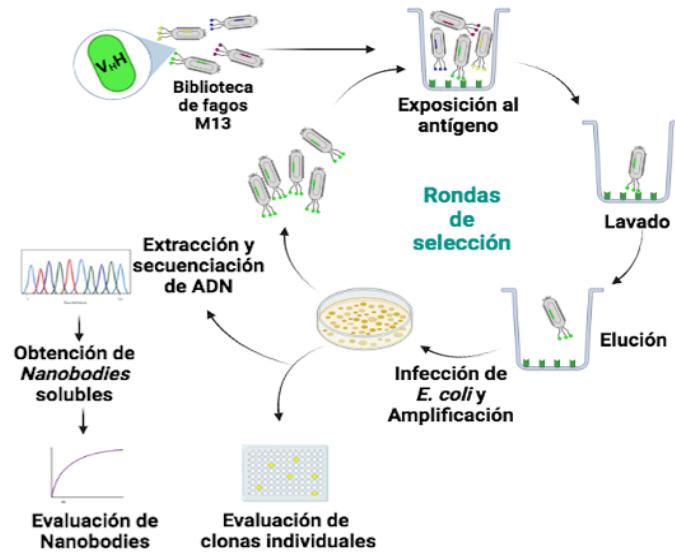


Figura. 5. Representación del proceso de selección de nanoanticuerpos. Mediante la exposición de los nanoanticuerpos hacia el antígeno (Biopanning), evaluación, expresión, purificación y caracterización. Imagen tomada de Ortega-Portilla et. al. (2021).

La técnica de despliegue en fagos, ofrece ventajas entre las cuales se destaca su tolerancia a temperaturas elevadas y ambientes ácidos, permitiendo de esta manera seleccionar aquellos nanoanticuerpos con resistencia a las condiciones antes mencionadas (Muyldermans, 2013). Por su parte, una desventaja de esta técnica es cuando el nanoanticuerpo se une a la proteína III, ya que en ocasiones puede presentarse un impedimento estérico (De almeida S.S. et al., 2011).

Entre los sistemas aplicados para la expresión de los nanoanticuerpos se sitúa *Escherichia Coli*, esto se debe a su alto rendimiento (2 mg/200 mL), simplicidad y bajo costo de producción (Ortega et al., 2020); y mediante las técnicas de biología molecular permite obtener proteínas solubles a partir de un medio periplásmico bacteriano, que favorece la generación de los puentes de disulfuro. Para la purificación se utilizan columnas cromatograficas que tengan cierta afinidad a metales y filtración de gel, para conseguir niveles elevados de pureza. Por otro lado, cuando se emplea un marje sobre la secuencia de los nanoanticuerpos, este se puede purificar con la union a la proteína A (Muyldermans, 2013; Ortega et al., 2020).

2.9. Bacteriófago M13

El bacteriófago M13 es comunmente empleado para el desarrollo de la tecnica de despliegue en fago, pertenece a la familia de fagos filamentosos y posee una estructura alargada de alrededor de 880 nm con un diametro de 6.5 nm. Es capaz de infectar a cepas de *Escherichia Coli* que posean al plásmido conjugativo F mediante la unión del pilus de la bacteria, provocando de esta manera la translocación del ADN del bacteriófago en el citoplasma celular (Rosales-Fuerte I.A., 2020). Por su parte, cuando surge la replicación del genoma del fago se encuentran proteínas del mismo virus y de celulas infectadas, por lo que en su empaquetamiento no genera lisis alguna en las celulas. Este contiene una masa molecular de 16.3 MDa y el 87% que lo constituye esta integrado de proteínas de cápside que protegen al ADN de cadena sencilla de aproximadamente 6.4 kb. Su genoma esta integrada por once proteínas, cinco de ellas forman parte de la cápside del bacteriófago y las otras seis están relacionadas con la maduración del bacteriófago dentro de *Escherichia Coli*. Su cubierta proteica esta integrada por 2700 copias de la proteína pVIII y 5 copias de otras proteínas que la conforman (pIII, pVI, pVII, pIX), éstas ultimas se situan en los extremos del bacteriófago (Figura 6). Mientras que la proteína III, une el pilus de *Escherichia Coli* para iniciar el ciclo de infección en conjunto con los dos dominios de su extremo N-terminal ; el extremo C- terminal dirige la proteina hacia la partícula viral (Barbas et al., 1991; Barbas III et al., 2001).

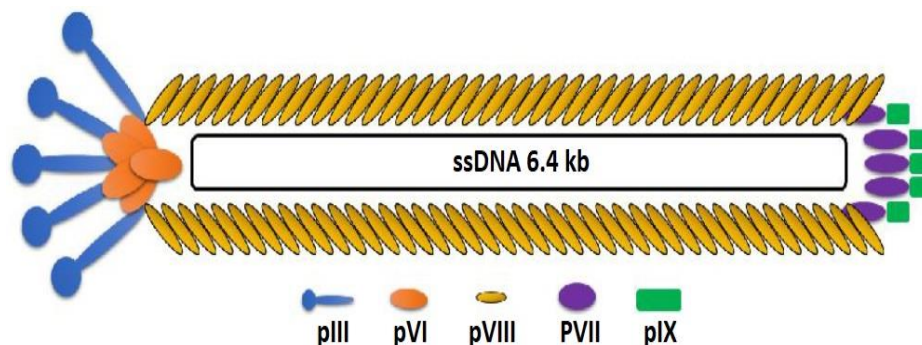


Figura. 6. Estructura del bacteriófago M13. Su cubierta proteica esta integrado por once proteínas y en su interior se sitúa el ADN viral de cadena sencilla que posee una forma cilíndrica compuesta de 2700 copias de la pVIII. En una de sus extremidades posee 5 copias de pVII y pIX; mientras en su extremo opuesto contiene 5 copias de las pIII y pVI. Imagen modificada de Barbas III et al., (2001) y Rosales-Fuerte (2020).

Por su parte, la proteína III es la más utilizada para realizar la expresión de fracciones de anticuerpos o proteínas recombinantes, esto se debe por ser la última en incorporarse al ensamblaje y soporta la fusión de las proteínas sin modificar estructuralmente a la cápside viral (Hammers y Stanley, 2014). Esta técnica se basa en el empleo de vectores fagémidos, que contienen al gen de la proteína de la cubierta proteica que se utiliza en el despliegue y que posee un sitio de clonación hacia el extremo 5' para colocar el gen a expresar en la proteína del bacteriófago. La replicación y empaquetamiento del ADN en los bacteriofagos se lleva a cabo mediante el vector fagémido originado en la replicación "f1" (Arbabi Ghahroudi et al., 1997).

Cabe mencionar que estos vectores fagémidos no poseen genes para empaquetar y replicar a otras proteínas de la cubierta proteica del bacteriófago M13. Es por ello que cuando el fagémido es incorporado a *Escherichia Coli*, este puede ser empaquetado en partículas virales si la bacteria ha sido infectada por el fago ayudador (*Helper phage* por sus siglas en inglés) (Gupta et al., 2013).

Entre los fagos más empleados se encuentra el M13K07 y VCM13, sin embargo poseen alteraciones que imposibilitan su propia replicación y empaquetamiento, es por ello que el fagémido es empaquetado preferentemente con el fin de garantizar que las partículas virales lo posean (Vieira y Messing, 1987). Al tener un tamaño pequeño su eficiencia de transformación es mayor y permite obtener bibliotecas con alta complejidad; así mismo al generar partículas virales recombinantes se es posible conseguir una capacidad infectiva fágica mayor hacia la proteína III (Gupta et al., 2013) (Figura 7).

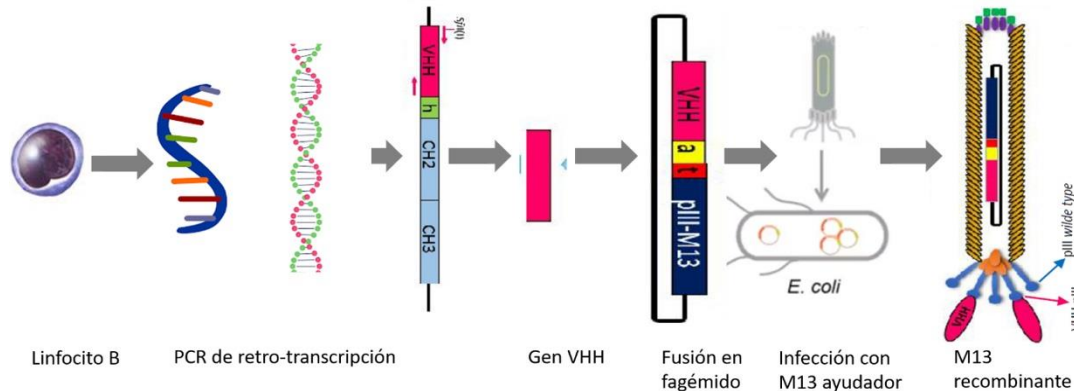


Figura. 7. Generación del bacteriófago M13 recombinante. Con la muestra de los linfocitos inmunizados se extrajo el ARN y se realizó un PCR de retrotranscripción para amplificar al gen VHH. Posteriormente se ligo con el vector fagémido y se transformó en una cepa de *Escherichia Coli* para amplificar al bacteriófago M13 recombinante e infectarlo con el fago ayudador. Este proceso se llevó a cabo con el fin de obtener a los bacteriofagos que expresan al anticuerpo VHH sobre la proteína viral PIII. Imagen tomada de Rosales-Fuerte (2020)

Uno de los vectores de expresión más empleados es el pComb3X desarrollado por el laboratorio de Barbas (Barbas et al., 1991); posee una versión truncada de la proteína III y no cuenta con dominios (N-terminal) relacionados con la infección. Esta peculiaridad se considera clave cuando se lleva a cabo la expresión de la proteína III en el interior de la bacteria, ya que la vuelve inmune a la sobreinfección pero si se acumula por la disposición del fagémido pComb3X, esta desfavorece la presencia del fago ayudador y como consecuencia la producción de partículas virales (Barbas III et al., 2001). Este vector consta de una secuencia que conduce el VHH clonado en el extremo 5' de la proteína III truncada con el periplasma de la bacteria, donde existe un medio que favorece el plegamiento y formación de los puentes de disulfuro primordiales para la actividad del fragmento del anticuerpo. Construida la biblioteca de fragmentos de anticuerpos, es importante poner en marcha su proceso de selección con el fin de conseguir los clones de fagos que presenten una especificidad alta. El proceso mencionado con anterioridad se encuentra estrechamente relacionado con el proceso de incubación de la biblioteca original y el antígeno de interés, estableciendo de esta manera la correlación antígeno-anticuerpo, el cual será expuesto a una serie de lavados que permita destacar los fagos que no tengan interacción alguna con el antígeno (Figura 8), proceso recibe el nombre de *biopanning* (Rosales-Fuerte I.A., 2020).

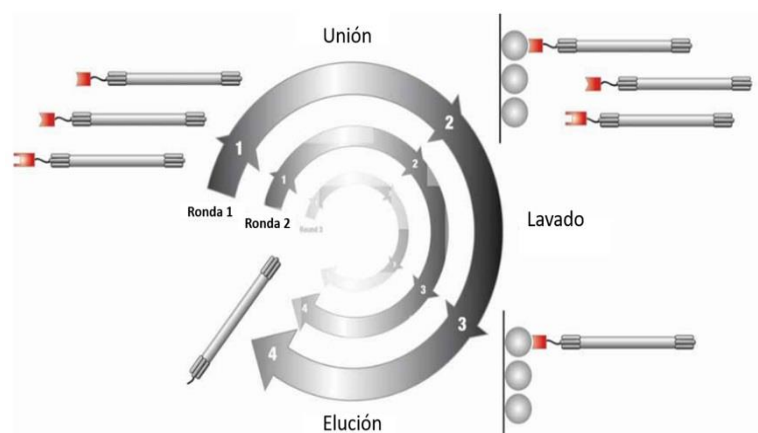


Figura. 8. Selección del bacteriófago M13 recombinante contra el antígeno. En este proceso se obtienen clones específicos y no específicos; los primeros son adquiridos a través de la interacción realizada contra el antígeno adherido en la placa o columna de alta afinidad; mientras que los otros son desechados a través de una serie de lavados y por una enzima con actividad proteasa. Finalmente, los bacteriófagos recombinantes generados son amplificados en la ronda de selección (Imagen modificada de C. M. Y. Lee et al., 2007) (Rosales-Fuerte I.A, 2020).

Existen diversas modalidades a las que se puede adaptar este proceso (Hammers y Stanley, 2014) y obtener solo a aquellos clones específicos hacia el antígeno mediante las rondas de selección. Durante el biopanning se lleva a cabo la infección de *Escherichia coli* a través de los fagos eluidos de la última ronda de selección; mientras que el fagémido pComb3X facilita la interacción del codón amber VHH con la proteína viral PIII, que elimina parcialmente *E. coli*. El VHH generado se localiza en el sobrenadante fusionado en colas peptídicas, lo que posibilita su selección, caracterización y amplificación contra el CCMV (Rossotti, 2015).

2.10. Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

ELISA es una técnica biomolecular empleada para evaluar la disposición de un antígeno, anticuerpo o proteína en una muestra biológica; se destaca por ser capaz de detectar bajas concentraciones de antígenos y por ser extremadamente sensible para detectar la relación antígeno-anticuerpo. Además, permite incluir anticuerpos específicos de un antígeno conjugado a enzimas, para la transformación de un sustrato incoloro a un producto fluorescente que puede ser detectado o cuantificado por un lector de placas (Porstmann & Kiessig, 1992).

Según Co.K.G. & Berthold Technologies GmbH (2024), ésta técnica puede realizar en cuatro etapas:

Etapas 1: Se efectúa el recubrimiento de la placa (96 o 384 pozos) con una solución de recubrimiento (antígeno o anticuerpo) que se adsorbe sobre la superficie del pozo. Posteriormente se elimina el tapón de recubrimiento y se lleva a cabo una serie de lavados exhaustivos que permiten eliminar al antígeno o anticuerpo no unido. En esta etapa es imprescindible eliminar el exceso de líquido con el fin de evitar que la dilución de la solución sea agregada a la próxima etapa (Figura 9).

Etapas 2: Se bloquean los sitios de unión libre por medio de un tampón de proteína no relacionado con la de interés, con el propósito de excluir a los falsos positivos en la muestra, y el tampón de bloqueo se lleva a cabo mediante lavados (Figura 9).

Etapas 3: Ésta etapa es considerada la más compleja, debido a que en el proceso de detección se puede disponer de múltiples capas de anticuerpo para poder amplificar una señal. La placa se deja en reposo con la solución que posee al anticuerpo de detección conjugado con la enzima que se unirá específicamente al antígeno o anticuerpo, posteriormente se realiza la eliminación del tampón a través de una serie de lavados, esto con el fin de eliminar a los anticuerpos no unidos (Figura 9).

Etapas 4: Finalmente, se vierte un sustrato colorimétrico en los pozos de la placa que dan lugar a una solución coloreada debido a la reacción catalizada por enzimas y es leído a través de un lector de microplacas (Figura 9).

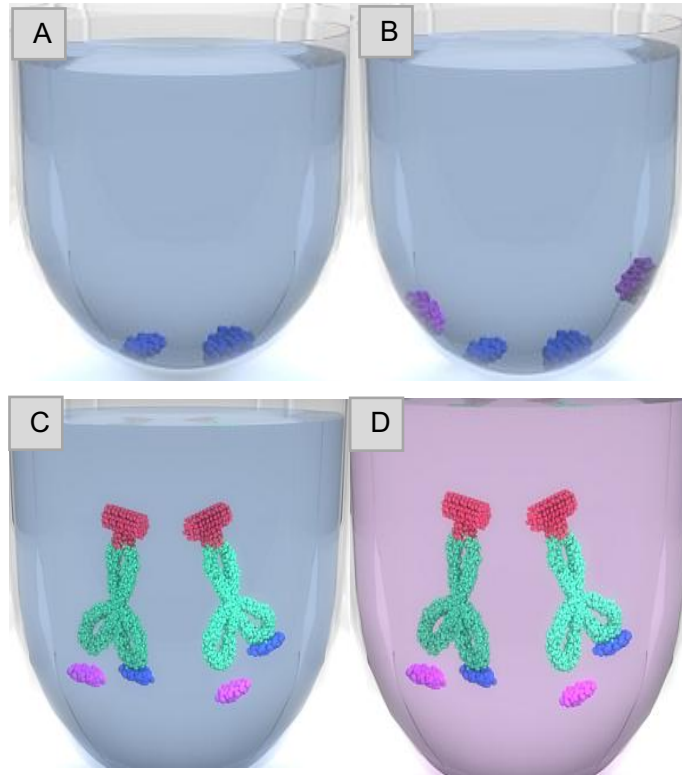


Figura. 9. Etapas del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) estándar. A) Etapa de recubrimiento del antígeno o anticuerpo; B) Bloqueo de los sitios de unión libre; C) Anticuerpos de detección conjugados con una enzima; D) Adición del sustrato y análisis de resultados. Imagen tomada de Co.K.G. & Berthold (2024).

Existen diversos protocolos que se han adaptado a ésta técnica para medir la concentración de antígenos presentes en una muestra dada, pero no todos poseen el mismo concepto básico. Es por ello que la selección del tipo de ensayo esta estrechamente relacionado con factores, así como de la complejidad de la muestra y de los anticuerpos específicos de antígenos disponible (Aydin S., 2015).

ELISA indirecto: esta determinado por la unión de un anticuerpo primario y secundario. El primer anticuerpo se incuba en el pozo de la placa que contiene al antígeno y se le agrega un anticuerpo secundario particular que reconoce al primero. Finalmente, se agrega el sustrato correspondiente a la muestra para reproducir la amplificación de la señal. Este tipo de ELISA se dispone con mayor afluencia para determinar el resultado de una respuesta inmunológica, conocer la concentración de un anticuerpo, diagnosticar infecciones producidas por bacterias o virus y cuantificar

anticuerpos contra antígenos desconocidos. Esta técnica suele ser versátil, debido a que puede hacer uso de marcadores de visualización empleando al mismo anticuerpo primario, que puede unir a más de un anticuerpo por objetivo, es altamente sensible y flexible (Figura 10) (Aydin S., 2015).

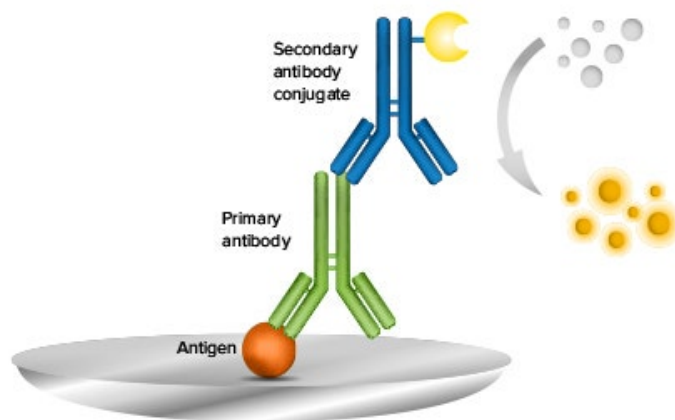


Figura. 10. ELISA indirecto. El antígeno se une al fondo del pocillo de la microplaca y posteriormente se añade un anticuerpo específico del antígeno. A continuación se une al primer anticuerpo un anticuerpo secundario conjugado con una enzima u otra molécula de detección. Imagen tomada de LLC, Molecular Devices (2024).

ELISA directo: la parte superior de placa se recubre con la muestra y se deja en incubación en presencia de un anticuerpo conjugado a una enzima, seguidamente se lleva a cabo una serie de lavados para eliminar a los anticuerpos no unidos al medio. Posteriormente, se coloca una porción del sustrato apropiado al medio con el fin de obtener una señal directamente proporcional al antígeno; esta relación se establece con el propósito de conocer la concentración del antígeno en una muestra desconocida a través de una curva de calibración. Se considera como el ensayo más simple y rápido que evita que exista o surga una reactividad cruzada con el anticuerpo secundario. Sin embargo, una de sus desventajas es cuando se lleva a cabo el marcaje directo de los anticuerpos primarios ya que suelen ser costosos y conlleva de mucho tiempo, lo que podría afectar la inmunoreactividad del anticuerpo con el antígeno al que se encuentra dirigido (Figura 11) (Aydin S., 2015).

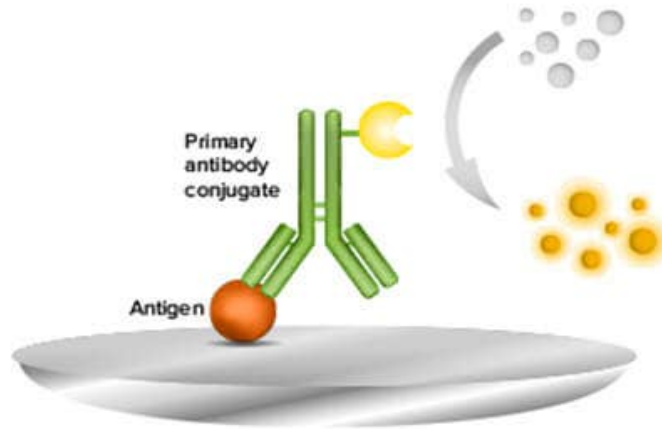


Figura. 11. ELISA directo. El antígeno se une al fondo del pocillo de la microplaca y a continuación, se añade un anticuerpo específico del antígeno, conjugado a su vez a una enzima u otra molécula que permita su detección. Imagen tomada de LLC,Molecular Devices (2024).

ELISA sándwich: esta técnica evalúa muestras complejas y mixtas (el analito o antígeno forman parte de ella) y tiene como objetivo atrapar al antígeno de interés mediante el uso de dos anticuerpos específicos situados sobre la placa de detección. Consta de dos etapas, en la primera al antígeno se le añade un anticuerpo primario que se encuentra unido en la placa; por lo que en la segunda etapa se adjunta un anticuerpo secundario al complejo (antígeno-anticuerpo primario) creado en la primera etapa. El anticuerpo secundario se encuentra directamente conjugado a una enzima que posee la adjudicación de un sustrato con un marcador que evidencie al segundo compuesto que reaccionará directamente con el sustrato cromogénico. Es por ello, que aquellas muestras que contengan una alta concentración de antígeno emitirán más señal en comparación con las de baja concentración, lo que permitirá obtener una señal directamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra (Figura 12). Esta técnica es utilizada para proteínas de bajo y alto peso molecular, son muy específicos, tienen un par de anticuerpos que permite la captura y detección del antígeno (Lequin R. M.,2005).

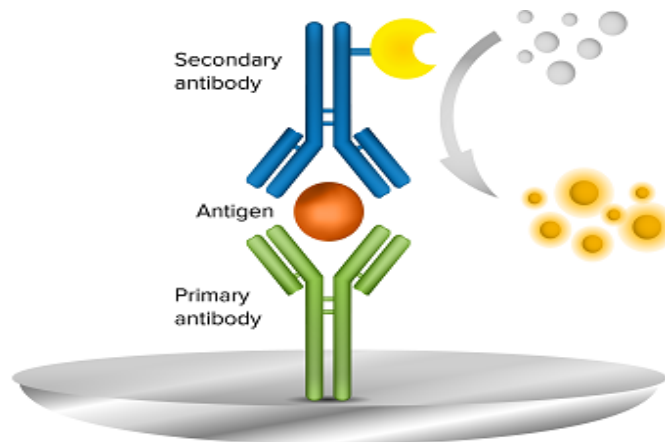


Figura. 12. ELISA sandwich. Emplea un anticuerpo primario y secundario específico de diferentes epítopos hacia el antígeno; el anticuerpo de captura se unifica en el fondo del pozo de la microplaca a uno de los epítopos del antígeno; mientras que el anticuerpo de detección se une a un epítipo diferente al antígeno que se encuentra conjugado con la enzima de detección. Imagen tomada de LLC, Molecular Devices (2024).

ELISA competitivo: la concentración de un antígeno en específico en una muestra desconocida, determina la capacidad de este para competir con un antígeno de referencia para la unión de un anticuerpo establecido sobre la placa. La cantidad de anticuerpo no marcado se lleva a cabo a través de placas y de la preparación estándar de referencia del antígeno marcado para unirse a ellas. Proceso que requiere de diversas cantidades de muestras no marcadas, para medir el desplazamiento del antígeno marcado para la obtención de sus curvas de inhibición. Las muestras en incubación que contengan un alto contenido de antígeno, promueven a que el antígeno no marcado se sucite con mayor cantidad hacia el antígeno conjugado, para que cuando se adicione el sustrato cromogénico las muestras que contengan una alta concentración de antígeno emitan una señal más baja en comparación a las de menos concentración, generando de esta manera una correlación inversa entre la concentración y el color que se emite (Figura 13) (Murphy, Travers y Walport, 2008). Este ensayo se emplea con frecuencia para detectar antígenos pequeños que posean una porción específica del anticuerpo.

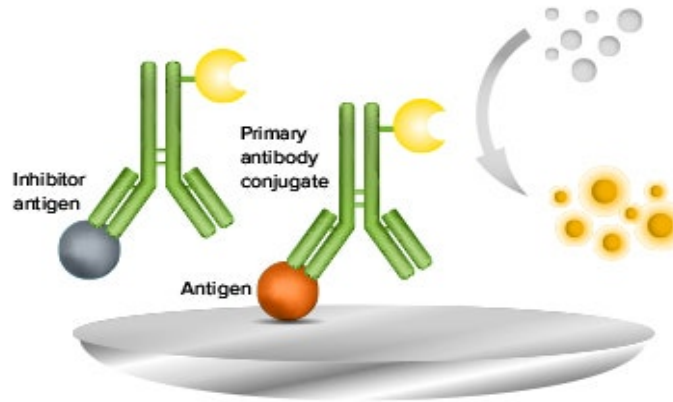


Figura. 13. ELISA competitivo. El antígeno de referencia se une al fondo del pocillo de la microplaca, seguidamente se añade a los pocillos la muestra más el anticuerpo y si existe un antígeno presente en la muestra, compite con el antígeno de referencia por la unión al anticuerpo. El material no unido se elimina con los lavados, cuanto más antígeno hay en la muestra, menos anticuerpo termina unido al fondo de los pocillos a través del antígeno de referencia y por tanto, menos señal. Imagen tomada de LLC,Molecular Devices (2024).

2.11. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica molecular que permite crear millones de copias de una secuencia de ADN en particular a través de ciclos continuos, con el objetivo de obtener una copia fiel de la secuencia de interés. La enzima que más se utiliza para esta reacción es la ADN polimerasa, debido a su excelente potencial para sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay et.al.2013), puede emplear como sustrato el ADN genómico o complementario del ARNm obtenido de la transcripción reversa (Herschhorn & Hizi, 2010).

Esta reacción fue descrita en la década 1980 por Kary Mullis y se ha convertido en una pieza elemental para la investigación médica y biológica, con aplicaciones en el diagnóstico clínico, investigación genética y medicina forense. Entre los elementos que interaccionan durante este proceso se encuentra el templado o molde (ADN o ADNc), el uso de enzimas específicas, oligonucleótidos o primers, bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), solución amortiguadora o buffer y el H_2O (Tamay et.al.2013).

El ADN es considerado el elemento principal de esta técnica, pues es una molécula de carga eléctrica negativa, constituida por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada establecida por puentes de hidrógeno e interacciones

hidrofóbicas, que le dan estabilidad a su estructura de doble hélice (Watson & Crick, 1953). Las cadenas templadas de ADN se separan y funcionan como modelo para la síntesis de nuevas cadenas que contengan la secuencia de interés; mientras que la ADN polimerasa realiza la catálisis de la reacción mediante la síntesis de nuevas cadenas de ADN que posean la secuencia blanco. La enzima más empleada para esta técnica es la Taq ADN polimerasa (Saiki et al., 1988), descende de la bacteria *Thermus aquaticus*, vive en condiciones extremas de temperatura por lo que su funcionalidad no se ve afectada por esta característica (Cariello, Swenberg & Skopek, 1991).

Las secuencias de oligonucleótidos (primers) flanquean y delimitan solo la secuencia que se desea copiar y que por lo general sea complementario a ésta; su tamaño es de aproximadamente 15-25 pares de bases, por lo que la cantidad de G-C debe estar comprendido entre el 55% de la secuencia, de lo contrario existe la posibilidad de tener productos inespecíficos y alterar el rendimiento de la reacción. Para esta técnica se emplean dos secuencias distintas de primers (Forward y Reverse) diseñadas para hibridar al templado y con ello extender las cadenas de ADN a través de la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente).

Las bases nitrogenadas, son empleadas por la Taq polimerasa para construir las nuevas cadenas de ADN con el propósito de obtener una mayor especificidad en la reacción, por lo que su concentración debe ser la adecuada (0.2 – 1mM) para no afectar su funcionalidad. Como buffer se aplica una solución amortiguadora conformada de Tris-HCl con pH= 8 y una concentración final de 1X; esta técnica emplea como cofactor enzimático al magnesio, que es el que define la especificidad de la reacción, es por ello que se debe cuidar la concentración de la Taq polimerasa (0.5 - 2.5 mM) para no reducir el rendimiento de esta. El agua es el disolvente utilizado en la reacción y debe ser libre de nucleasa (Tamay et al. 2013).

Esta reacción enzimática se desarrolla en tres etapas principales (Figura 14):

Desnaturalización: las cadenas de ADN son calentadas a 95 ° C durante 20 segundos y posteriormente separadas; sin embargo, la duración de exposición de la cadena dependerá de la secuencia del templado debido a que si la cantidad de G-C es

elevada, será necesario romper las uniones establecidas debido a que el apareamiento de las bases están conformadas por tres enlaces, uno extra que las bases de A-T, para finalmente obtener cadenas separadas que se utilizaran como templado en la siguiente etapa.

Hibridación: las secuencias de oligonucleótidos (primers) se alinean al extremo 3' del templado obtenido con anterioridad; posteriormente se hibrida con la secuencia complementaria para formar el complejo templado-primers. Si su diseño es correcto y se encuentra a una temperatura apropiada (50 - 60°C), la estabilidad y especificidad del complejo será eficaz.

Extensión: en esta etapa la Taq polimerasa interacciona con el complejo para iniciar la catalización a una velocidad considerable, posteriormente se adicionan las bases nitrogenadas complementarias para generar cadenas completas de ADN con dirección de 5' a 3' a una temperatura de 72° C. Finalmente, se producen amplificones de tamaño determinado por el número de bases conocido.

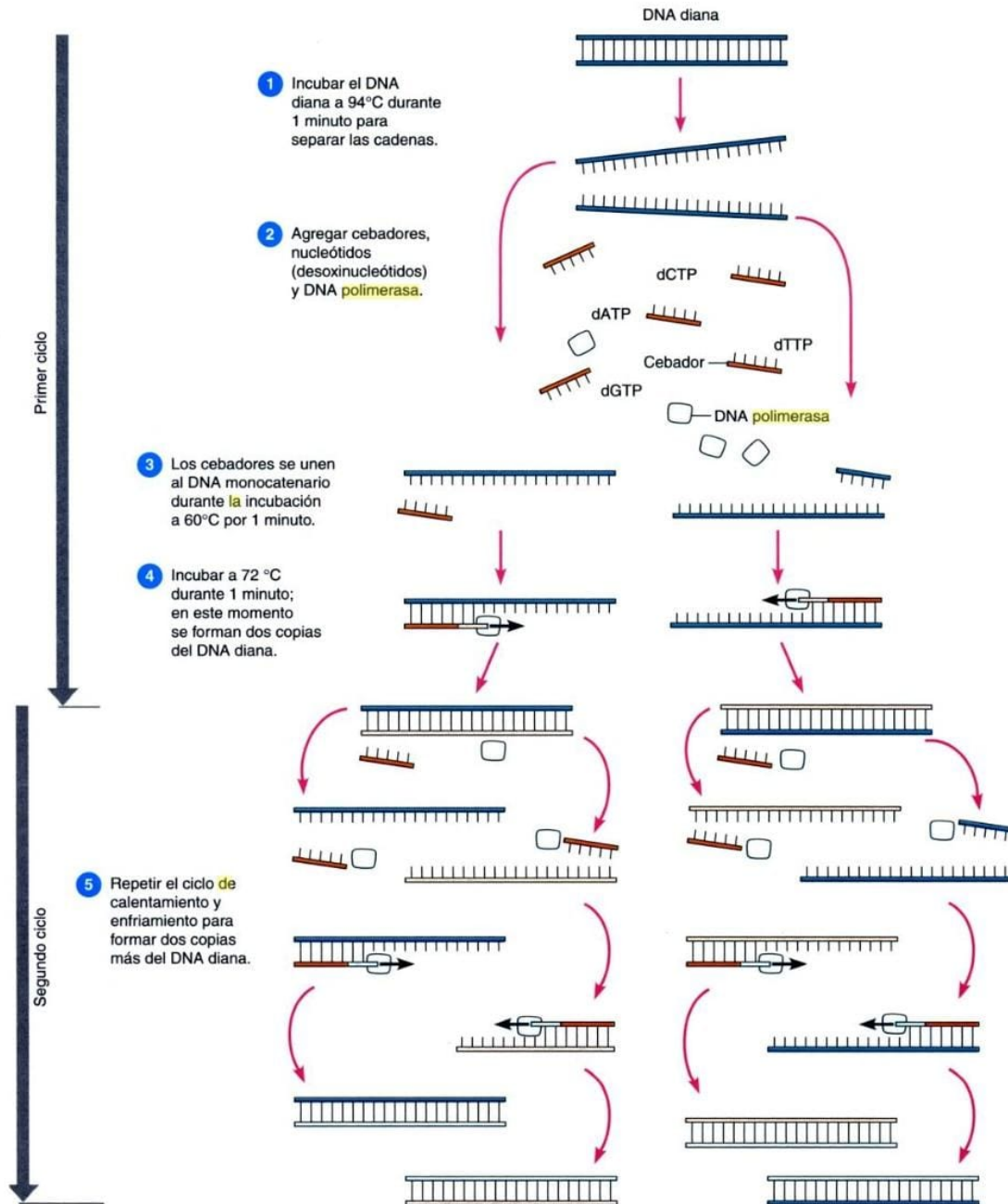


Figura. 14. Ciclo de la reacción de cadena polimerasa (PCR). Representación de las etapas de la reacción enzimática: desnaturalización, hibridación y extensión. Imagen tomada de Tortora, Funke & Case (2007).

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cultivo de *Vigna unguiculata* (caupí), se singulariza por su elevado valor nutricional, ser fuente de energía, contener micronutrientes y su mayor cualidad se debe a su elevado contenido de proteínas. Estas propiedades le atribuyen un enorme potencial para reducir los niveles de desnutrición en las poblaciones más vulnerables. Su estudio sobre su potencial agronómico, le permite establecer su conservación y uso sostenible. En México, el caupí no es muy aprovechado pero debido a sus cualidades nutricionales, agronómicas y adaptabilidad a diferentes texturas de suelo, es considerado como una alternativa para diversificar los cultivos en el país y aportar diversos beneficios donde se cultiva. Sin embargo, en los últimos años los cultivos de esta leguminosa se ha visto estropeada por una enfermedad de origen viral, caracterizada por la afectación de la lámina foliar, la carencia en la producción de vainas y la alteración de la distribución de la clorofila, ocasionada específicamente por el CCMV. Las enfermedades virales recobran mayor importancia en el área de la agricultura y medio ambiente, debido a su gran potencial para destruir hectáreas de cultivos y reducir de forma crónica el rendimiento, calidad y durabilidad de los productos obtenidos. Es por ello que en este trabajo de investigación se propone la generación de una alternativa que proporcione un diagnóstico temprano y eficiente contra el CCMV, mediante el empleo de nanoanticuerpos (VHH) de camélidos específicos capaces de reconocer al antígeno de interés. Los nanoanticuerpos se distinguen por tener cualidades estructurales únicas en función a su origen, ya que a pesar de tener un pequeño tamaño de aproximadamente 15 kDa posee una excelente capacidad de reconocimiento, estabilidad conformacional, soporta altas temperaturas a diferentes pH, especificidad y solubilidad. Al ser una proteína heteróloga de tamaño pequeño de único dominio, representa una ventaja de ser generadas mediante el despliegue en fagos usando una biblioteca media ($\geq 10^6$) abarata su costo de producción.

HIPÓTESIS

Es posible generar un nanoanticuerpo específico (VHH) capaz de reconocer al virus que afecta los cultivos de *vigna unguiculata*, a través de la tecnología de despliegue en fagos, a partir de una llama previamente inmunizada con el virus CCMV. El éxito de este trabajo de investigación proporcionará un avance fundamental hacia las herramientas de detección de virus en plantas.

OBJETIVO GENERAL

- Seleccionar y caracterizar nanoanticuerpos derivados de camélidos anti-CCMV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar y amplificar los bacteriófagos M13 a partir de la biblioteca inmune.
- Generar una biblioteca inmune de dominio VHH a través de anticuerpos de cadena pesada de camélidos.
- Expresar por medio de la técnica de despliegue en fagos los dominios VHH sobre la proteína pIII.
- Seleccionar a los bacteriófagos recombinantes que presenten una mayor afinidad hacia el CCMV a través de un biopaneó.
- Verificar que el gen VHH este presente en las cepas infectadas con los bacteriófagos recombinantes.
- Evaluar mediante una titulación la capacidad infectiva de los bacteriófagos recombinantes.
- Verificar la presencia y afinidad de los bacteriófagos recombinantes anti-CCMV mediante un ensayo ELISA.
- Producir, purificar y amplificar el fago ayudador VCM13.

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

4.1. Generación de la biblioteca inmune

A través de la metodología planteada por Pardon y colaboradores en 2014 (Pardon et al., 2014), se llevó a cabo la obtención de la biblioteca inmune.

4.2. Rescate y amplificación de bacteriófagos recombinantes, a través de la biblioteca inmune

Se inocularon 6 unidades de la librería inmune en un matraz Erlenmeyer (250 mL) que contenía en 60 mL de medio 2xTY, 60 μ L de ampicilina (100 ug/mL) y 2% de glucosa. Para una librería de 10^8 colonias, este inóculo representa 48 copias de cada clona (Asumiendo que una unidad de células corresponde a 8×10^8 cel/mL) y teóricamente 480 copias de la diversidad máxima de nanoanticuerpos. Las 6 unidades representan 4.8×10^9 cel/mL por lo que en mL corresponden a:

VHH: 1.07 mL

VHH IMN: 1.05 mL

Los inóculos se sometieron a un proceso de crecimiento a una densidad óptica (DO_{600nm}) que comprenda valores de 0.5 - 0.6, con una temperatura de 37°C y a una agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, se tomó 10 mL del inóculo y se infectó con 30 μ L de VCM13 (3.7×10^{12} viriones/mL) (corresponde a 10 unidades de bacteriófagos por célula), se mezcló y se incubó durante 60 minutos a una temperatura de 37°C. Concluido el proceso anterior, se realizó la centrifugación de la muestra a $2,800 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante generado fue desechado y el pellet obtenido fue resuspendido en 50 mL de medio 2xTY suplementado con 25 μ g/mL de kanamicina y se dejó en incubación a una temperatura de 37°C, con agitación constante de 200 rpm durante 16 horas.

La muestra obtenida fue transferida en un tubo falcón (50 mL) previamente esterilizado y centrifugado a $3,200 \times g$ durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente, el sobrenadante fue transferido en dos tubos falcón (50 mL) en volúmenes de 25 mL y se les añadió 5 mL de la solución PEG 6,000 al 20%

suplementado con 2.5 M NaCl (relación 4:1) a cada uno. Después los tubos fueron agitados 20 veces de arriba hacia abajo y se dejaron en incubación a una temperatura de 4°C toda la noche sin agitación. Las muestras fueron transferidas en tubos de centrifuga para consecutivamente centrifugarlas a 12,000 ×g durante 15 minutos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se realizó la decantación del sobrenadante en tubos falcón (50 mL) previamente esterilizados y los pellets obtenidos nuevamente se centrifugaron pero ahora a 4,000 rpm durante 4 minutos, para consiguiente realizar la decantación del sobrenadante.

Los pellets obtenidos en el proceso anterior fueron resuspendidos en 1 mL de PBS (0.24 gr. de KH_2PO_4 , 1.41 gr. de Na_2HPO_4 , 0.2 gr de KCl y 8 gr. de NaCl), posterior a ello se le realizó una breve centrifugación a la muestra y se transfirió el sobrenadante generado a un nuevo tubo de microcentrífuga previamente esterilizado. A cada mL de muestra se le agregó 250 µL de PEG 6000 al 20% suplementado con 2.5 M de NaCl, se mezcló invirtiendo 20 veces la muestra de la misma manera antes mencionada y se incubó a 4° C durante 60 minutos. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 20,000×g durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C, se decantó el sobrenadante y los pellets obtenidos se resuspendieron con 1 mL de PBS. Finalmente, la muestra fue centrifugada y el sobrenadante obtenido fue transferido en otro tubo de microcentrífuga esterilizado, para posteriormente tomar 2 µl de la muestra para medir su absorbancia por espectrofotometría a longitudes de onda de 269 y 320 nm mediante le empleo del espectrofotómetro Nanodrop.

4.3. Determinación de la cantidad de bacteriófagos recombinantes

Para conocer la cantidad de los bacteriófagos recombinantes en la muestra, se realizó la lectura de cada una por espectrofotometría a longitudes de onda de 269-320 nm; y mediante las ecuaciones 1 y 2 de Sambrook, J. Rissell, 2001, se realizó los cálculos de concentración de bacteriófagos en ng/µL y viriones/mL, correspondientes.

$$\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} = \frac{1000 (A_{269} - A_{320})}{3.14} \quad (1)$$

$$\frac{\text{Viriones}}{\mu\text{l}} = \frac{(6 \times 10^{13})(A_{269} - A_{320})}{\text{Número de bases por virión}} \quad (2)$$

4.4. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune (R_0)

Se realizó un pre-inóculo con 2 μL de células 5 $\alpha\text{F}'$ de la compañía NEB (eficiencia reportada de $1-3 \times 10^9$ ufc/ μg), y se depositó en 7 mL de medio LB complementado con 7 μl de tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó en incubación a una temperatura de 37°C , con agitación constante de 200 rpm durante 16 horas. Posteriormente, en otro tubo de ensayo previamente esterilizado se añadió 1 mL del pre-inóculo realizado con anterioridad, 7 mL de medio LB complementado con 7 μl de tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó en las mismas condiciones hasta conseguir una densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) que comprenda valores de 0.5 - 0.6, durante este proceso el inóculo se mantuvo en una hielera.

Los bacteriófagos recombinantes obtenidos se disolvieron en PBS 1X en una placa de 96 pozos, hasta llegar a una disolución de 10^{-12} (se tomó 10 μl del M13 y se agregó 90 μl de PBS). Subsecuentemente, se tomó 10 μL de cada una de las disoluciones 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} de los bacteriófagos recombinantes para infectar 90 μL de las células 5 $\alpha\text{F}'$ y se dejó en incubación a una temperatura 37°C , durante una hora. Concluido el proceso anterior, se procedió a la siembra de cada una de las células infectadas en placas de medio LB sólido (250ml), suplementado con 250 μl de ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 10 ml de glucosa al 2% y se incubó a una temperatura de 37°C durante 16 horas. Al término del proceso anterior, se llevó a cabo el conteo de las colonias lisogénicas de cada muestra a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ufp}}{\mu\text{L}} = \frac{\# \text{ placas contadas}}{(\text{volumen de infección})(\text{dilución})} \quad (3)$$

4.5. Producción de fago ayudador (VCM13)

Para la producción del fago ayudador, se requirió la preparación de un pre-inóculo con 1 mL del stock y 50 mL del medio de crecimiento 2XTY suplementado con 50 μl de tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Éste se creció hasta la fase de infección que va de 0.5-0.6, a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$, a 200 rpm. El proceso de producción de fago ayudador se llevó a cabo

de acuerdo a la metodología “Rescate y amplificación de los bacteriofagos usando la librería inmune” planteada en el 2014 por Pardon y colaboradores (Pardon et.al., 2014).

4.6. Purificación del fago ayudador (VCM13)

Para la purificación del fago ayudador, se procedió a la centrifugación de la muestra obtenida en la sección 4.5 a $5000\times g$ durante 10 minutos a una temperatura de 4°C ; Seguidamente se depositó cuidadosamente el sobrenadante generado a un nuevo tubo de microcentrifuga previamente esterilizado y se le añadió 250 μL de la solución PEG 6,000 al 20% suplementado con 2.5 M de NaCl y se dejó en incubación a la misma temperatura durante 1 hora. Subsecuentemente, la muestra se centrifugó a $20,000\times g$ durante 15 minutos a una temperatura de 4°C , el sobrenadante obtenido se desechó, mientras que los pellets fueron resuspendidos en 1 mL del tampón fosfato salino (PBS). Finalmente, a la muestra obtenida se le efectuó una breve centrifugación y el sobrenadante generado fue depositado en un nuevo tubo de microcentrifuga previamente esterilizado, para posteriormente medir su absorción por espectrofotometría a longitudes de onda 269 y 320 nm y realizar los cálculos de concentración correspondientes.

4.7. Amplificación del fago ayudador (VCM13)

Lo primero que se realizó para llevar a cabo la amplificación del VCM13, fue el crecimiento de las células 5 $\alpha\text{F}'$ de la compañía NEB que tienen reportado una eficiencia de $1\text{--}3\times 10^9$ ufc/ μg , a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ que comprendan valores de 0.5 a 0.6 a una temperatura de 37°C y a una agitación constante de 200 rpm. El proceso de amplificación del fago ayudador se llevó a cabo de acuerdo a la metodología “Rescate y amplificación de los bacteriofagos usando la librería inmune” planteada en el 2014 por Pardon y colaboradores (Pardon et.al., 2014).

4.8. Preparación de la alícuota CCMV (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Se tomó una alícuota de CCMV (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que se encontraba resguardada a -20°C para atemperarla y mantenerla a -4°C en una hielera. Posteriormente se tomaron 500 μL de

la solución stock del virus para la realizar las rondas de selección empleando como referencia los resultados obtenidos de las ecuaciones 4 y 5.

$$C_2 = \frac{m}{v} \quad (4)$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad (5)$$

4.9. Ronda de selección de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune (R_0) y de las rondas R_1 , R_2 , R_3 .

Para la realización de la ronda de selección se empleó una placa de 96 pozos de la marca *Maxisorp Nunc*, en la cual en dos de sus pozos se depositó 50 μ L del virus CCMV (1 μ g/ μ L) y se dejó en incubación a 4°C durante la toda la noche. Posterior a esto, cada pozo se lavó con 200 μ L de la solución salina tamponada con fosfato y tween 20 al 0.05 % (PBST) y se incubó en agitación constante sobre el plato vibratorio a temperatura ambiente durante 5 minutos (este proceso se realizó tres veces). Después se le agregó 300 μ L del tampón de bloqueo de albúmina de suero bovino (BSA + PBST) al 2% a cada pozo, con el fin de bloquear las uniones inespecíficas generadas, seguidamente se incubó con agitación constante a temperatura ambiente durante dos horas. Concluido el proceso anterior se prosiguió a los lavados de cada pozo con 200 μ L de PBST a temperatura ambiente durante 5 minutos (este proceso se realizó por triplicado). A continuación a cada pozo se le agregó 50 μ L de los bacteriófagos amplificados de la Ronda 0, que poseía una concentración de 1.89×10^9 viriones/ μ L, y se incubó sobre el plato vibratorio con agitación constante por dos horas a temperatura ambiente. Finalizado el proceso anterior, se lavaron nuevamente los pozo con PBST a las mismas condiciones antes mencionadas, sin embargo para este proceso se realizaron 10 lavados.

Posterior a este proceso, se llevo acabo la eludición de los bacteriófagos recombinantes que se encontraban en los pozos de la placa mediante la adición de 50 μ L de tripsina (10mg/mL) diluida en PBS y se incubó en el plato vibratorio durante 1 hora a temperatura ambiente. Los fagos eluidos fueron transferidos en tubos de microcentrífuga que contenían 5 μ L del inhibidor de tripsina (7mg/mL) diluida en PBS. Del tubo de microcentrífuga se tomó 50 μ L de los fagos eluidos para infectar 3 mL de

las células 5αF' y dejó en crecimiento a una DO_{600nm} que comprenda valores de 0.5-0.6 a 37° C por 30 minutos. Después se le agregó 7 mL del medio Luria Bertani (LB), complementado con 10 mL de ampicilina (100 µg/mL) y 2% de glucosa y se dejó crecer a una temperatura de 37°C, con agitación constante de 170 rpm, por toda la noche. Posterior al proceso anterior, se le agregó 5 mL glicerol al 20% volumen final y se alicuotó en tubos de eppendorf previamente esterilizados en volúmenes de 1 mL y se guardó a una temperatura de -80°C para su empleo a futuro, con esto se generó la sub-biblioteca 1.

Este procedimiento también se llevo acabo para las siguientes rondas (R_1 , R_2 , R_3), a excepción de que para estas rondas se agregó 500 µL de la sub-biblioteca obtenida en 50 mL del medio de crecimiento 2xTY complementado con 50 µL de ampicilina (100 µg/mL) y glucosa al 2%. Cabe mencionar que por cada ronda de selección se incrementó la cantidad de lavados después de añadir e incubar a los fagos (10 lavados adicionales por ronda extra). Se llevo acabo tres rondas de selección y se generaron 3 sub-bibliotecas.

4.10. Amplificación de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección R_1 , R_2 , R_3 .

Para la amplificación del bacteriófago recombinante (M13) de cada ronda de selección se tomó 1mL del stock en la sección 4.9 y se colocó en un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado, en el que se suplementó con 50 mL de medio de crecimiento 2XTY, 50 µl de ampicilina (100 µg/mL) y 2 mL de glucosa al 2%. Posteriormente se creció hasta la fase de infección a una DO_{600nm} entre 0.5-0.6 a 37°C y a 200 rpm.

El proceso de amplificación de las siguientes rondas de selección se llevo acabo de acuerdo a la metodología “Rescate y amplificación de los bacteriófagos usando la librería inmune” determinada en el 2014 por Pardon y colaboradores (Pardon et.al., 2014).

4.11. Titulación de los bacteriófagos recombinantes (M13) de las rondas de selección R_1 , R_2 , R_3 .

Después de haber amplificado a los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección, se llevo a cabo el proceso de titulación, para ello se realizó un pre-inóculo con 2 μ L de células 5 α F' de la compañía NEB (eficiencia reportada de $1-3 \times 10^9$ ufc/ μ g) y se depositó en 7 mL de medio LB complementado con 7 μ L de tetraciclina (10 μ g/mL) y se incubó a una temperatura de 37°C, con agitación constante de 200 rpm durante 16 horas. Posteriormente, en un tubo de ensayo previamente esterilizado se añadió 1 mL del pre-inóculo antes mencionado, 10 mL de medio LB complementado con 10 μ g/mL de tetraciclina y se incubó en las mismas condiciones establecidas, a una DO_{600nm} que comprenda valores de 0.5-0.6, el inóculo se conservó en una hielera. Este proceso se llevó a cabo de acuerdo a la metodología empleada en la sección 4.4.

4.12. Eliminación de glicerol en los bacteriofagos recombinantes de las rondas de selección con PEG 6,000

Lo primero que se realizó para la eliminación de glicerol en los fagos recombinantes de cada ronda de selección, fue atemperar dos alícuotas de cada una de las muestras que se encontraban resguardadas a -20°C, seguidamente se le añadió a cada muestra 250 μ L de PEG 6,000 y se incubó a -4°C durante 60 minutos. Concluido el proceso anterior se tararon las muestras que contenían los fagos recombinantes de cada ronda y se centrifugaron a 20,000 $\times g$ durante 15 minutos a una temperatura de -4°C. Posteriormente el sobrenadante fue desechado y el pellet obtenido fue disuelto en 500 μ L de solución amortiguadora PBS 1X y se dejó reposar durante 60 minutos. Seguidamente se les realizó una breve centrifugación a las muestras de cada ronda de selección, se recuperó el sobrenadante generado en cada una de ellas y se colocaron en nuevos tubos de microcentrífuga previamente esterilizado para posteriormente medir la densidad óptica (DO_{600nm}) y así poder calcular la razón A_{269}/A_{320} , considerando como blanco a la solución amortiguadora PBS 1X. Con los datos obtenidos de la DO_{600nm} , se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de ng de viriones/ μ L de cada ronda. Finalmente, las muestras de los fagos recombinantes de la ronda sin glicerol fueron mantenidas a -4°C.

4.13. Evaluación de la viabilidad de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección mediante la prueba ELISA.

Para la realización del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), se preparó una placa de 96 pozos de la marca *Maxisorp Nunc*, en la que se depositó 50 μ L del virus CCMV (1 μ g/ μ l) y se incubó a 4°C durante 16 horas. Consecutivamente, se lavó cada pozo con 200 μ L de PBST y se incubó sobre el plato vibratorio a temperatura ambiente durante 5 minutos (este procedimiento se repitió tres veces). Después en cada pozo se añadió 300 μ L de BSA+PBST al 2% y se incubó sobre el plato vibratorio durante una hora. Posteriormente, se retiró el BSA+PBST y se prosiguió a la realización de lavados en cada uno de los pozos a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Concluido el proceso anterior, se tomó una placa de 96 pozos y se adicionó 50 μ L de los fagos recombinantes generados en cada ronda de selección, suero de llama como control positivo y el fago ayudador como control negativo (cada muestra se ajustó a una concentración de 3.27×10^9 viriones/ μ L) y se incubó sobre el plato vibratorio durante una hora.

Posteriormente se realizó una serie de lavados con PBST a cada pozo que contenía la muestra, a las mismas condiciones mencionadas con anterioridad. Subsecuentemente, a cada pozo se le adicionó 50 μ L del anticuerpo anti-M13-pVIII-HRP (1:1000, diluidos en BSA al 2%) y se incubó durante 1 hora, en agitación constante y a temperatura ambiente. Concluido el proceso anterior, se volvió a realizar una serie de lavados a cada pozo en las mismas condiciones antes mencionadas; luego a cada pozo se le adicionó 50 μ L de TMB-One-Step-Turbo y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó 50 μ L de ácido sulfúrico (2M) en cada pozo con el objetivo de suspender la reacción colorimétrica y medir su absorbancia en el espectrofotómetro a 465 nm.

4.14. PCR de colonia

Se tomó una placa de la ronda número tres obtenida en el proceso de titulación y realizó la recolección cuidadosa de colonias al azar con una punta estéril, posteriormente se diluyó en un tubo de PCR que contenía 50 μ L de H₂O MQ esterilizada (este proceso se repitió 5 veces). En una placa nueva se realizó el estriado

de muestra que contenía la punta estéril y se incubó a 37°C, sin agitación, durante 16 horas. Seguidamente en un tubo nuevo de PCR previamente esterilizado se colocaron los siguientes componentes:

Tabla 1. Componentes empleados para la realización del PCR de colonia	
Componente	Volumen (µL)
Agua-MQ	9.6
Ready Mix Taq PCR Reaction Mix	45
VHH-Back Sfil (10 µM)	2.7
VHH-For Sfil (10 µM)	2.7

Concluido el proceso anterior, se realizaron 5 alícuotas en tubos de PCR previamente esterilizado; colocando en cada una 10 µL del tubo componente preparado con anterioridad y 5 µL de templado (Tubo compuesto de la colonia diluida en agua-MQ). Seguidamente las reacciones fueron colocadas en el Termociclador con las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones empleadas en el termociclador para el PCR usando los oligonucleótidos VHH Back Sfil y VHH For Sfil		
Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	3 minutos
	94°C	30 segundos
27	65°C	30 segundos
	72°C	30 segundos
1	72°C	7 minutos

Finalmente, los productos obtenidos en este proceso se examinó mediante un gel de agarosa LE al 1% que fue colocada en una cámara de electroforésis durante una hora.

CAPÍTULO V. RESULTADOS

5.1. Rescate y amplificación de bacteriófagos recombinantes a través de la biblioteca inmune.

En el proceso del rescate de bacteriófagos recombinantes a través de la biblioteca inmune (R_0), se obtuvo una concentración de 4.76×10^8 Cel/mL y cuatro placas con una eficacia de 10^7 de transformantes (Figura 15).

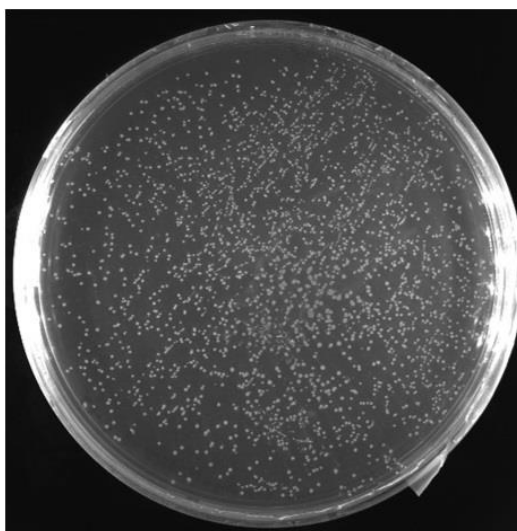


Figura. 15. Transformación de células 5 α F' a escala. De acuerdo a la biblioteca inmune se obtuvo una concentración de 4.76×10^8 Cel/mL y cuatro placas con una eficacia de 10^7 transformantes, estas fueron sembradas en placas de LB sólido, suplementadas con 100 μ g/mL de ampicilina.

Para llevar a cabo la amplificación de los fagos recombinantes a través de la biblioteca inmune, lo primero que se realizó fue la medición de la absorción de la muestra por medio de espectrofotometría a razón A_{269}/A_{320} .

Tabla 3. Espectrofotometría a relación A_{269}/A_{320} de las muestras VHH

	269 nm	320 nm
VHH	0.385	0.183

Acorde con los resultados de la tabla anterior y utilizando la ecuación 2 de Sambrook, J. Rissell, 2001, se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de los viriones presentes en la muestra.

$$\text{Viriones}/\mu\text{l} = \frac{A_{269} - A_{320}}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) \quad (2)$$

- Muestra VHH

$$\text{Viriones}/\mu\text{l} = \frac{0.385 - 0.183}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) = 1.89 \times 10^9 \text{ Viriones}/\mu\text{l}$$

5.2. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune (R_0)

El proceso de titulación de los fagos recombinantes a través de la biblioteca inmune (R_0), nos permitió conocer la cantidad de colonias lisogénicas presentes en nuestra muestra, para ello primero se realizó el conteo en las placas petris y posteriormente se ejecutó la ecuación 3 para conocer la eficiencia obtenida. Acorde a la figura 16.B, se obtuvieron 18 colonias lisogénicas en promedio y una eficacia de $1.8 \times 10^9 \text{ ufp}/\mu\text{l}$.

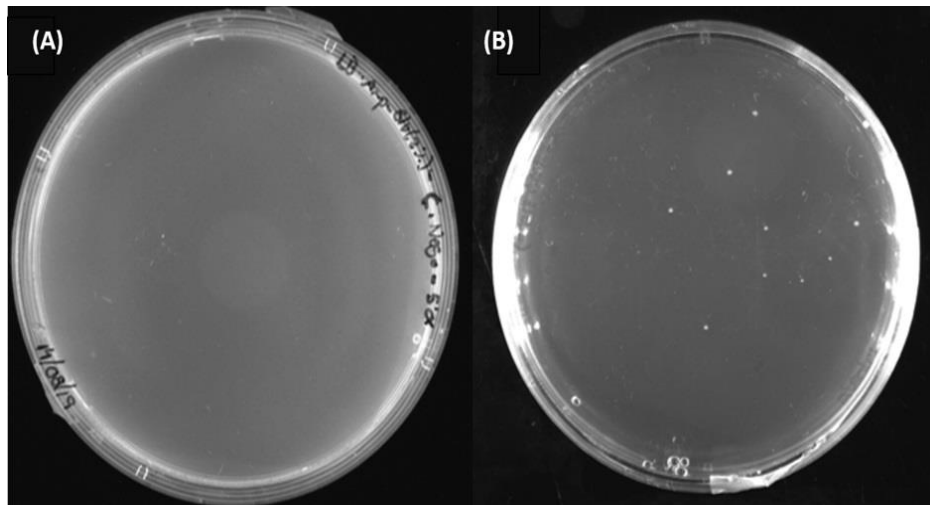


Figura. 16. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de la ronda 0. (A) El control negativo consistió en la siembra de células 5αF'; (B) Células 5αF' infectadas con el fago de la biblioteca inmune (R_0) diluido en 10^{-6} , ambas sembradas en placas con medio LB sólido, suplementado con 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ampicilina.

$$\text{M13 VHH} = \frac{18 \text{ colonias}}{(1 \times 10^{-2})(1 \times 10^{-6})} = 1.8 \times 10^9 \text{ ufp}/\mu\text{l}$$

Acorde al resultado, se pudo constatar que la eficiencia obtenida es igual a la concentración de viriones de la muestra.

5.3. Producción de fago ayudador (VCM13)

En la producción del fago ayudador se obtuvo una concentración de 4.47×10^8 Cel/mL, éste proceso se realizó con el fin de no tener limitante para realizar las siguientes amplificaciones de los fagos recombinantes de las siguientes rondas de selección. Posteriormente se midió la muestra generada a una espectrofotometría A_{269}/A_{320} .

Tabla 4. Espectrofotometría A_{269}/A_{320} del fago ayudador		
Muestra	269 nm	320 nm
VCM13	0.716	0.393

Acorde con los datos de la tabla anterior y usando las ecuaciones 1 y 2 de Sambrook, J. Rissell, 2001, se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de los viriones presentes en la muestra, en la que se obtuvo un valor de 8.41 ng/ μ L y 3.02×10^9 virones/ μ L respectivamente.

5.4. Purificación del fago ayudador (VCM13)

Después de haber realizado la producción del fago ayudador, se procedió a su purificación, para ello se midió la muestra por medio de espectrofotometría a razón A_{269}/A_{320} tal y como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Absorción a las longitudes de onda 269 y 320 nm del fago ayudador		
	269 nm	320 nm
M13	0.863	0.045

Acorde a los datos obtenidos en la tabla anterior y utilizando las ecuaciones 1 y 2 de Sambrook, J. Rissell, 2001, se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de los viriones presentes en la muestra, en la que se obtuvo un valor de 213.02 ng/ μ L y 7.66×10^9 virones/ μ L respectivamente.

5.5. Amplificación del fago ayudador (VCM13)

Después de haber realizado el proceso de producción y purificación del fago ayudador VCM13 se procedió a su amplificación, esto con el fin de no tener limitante al momento de realizar las próximas amplificaciones de los fagos recombinantes de las rondas de selección. Acorde a las ecuaciones (1) y (2), se realizaron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de los viriones presentes en la muestra, en la que se obtuvo 41.15 ng/μL correspondiente a 1.48×10^9 viriones/μl.

5.6. Preparación de la alícuota CCMV

Para la preparación de la alícuota CCMV se emplearon las ecuaciones de concentración (4) y (5). Y para obtener el volumen requerido se uso la solución amortiguadora PBS 1X. Después de haber realizado los cálculos correspondientes, tal y como se muestra en la tabla 6, se tomó 10 μl de la alícuota de CCMV (1 μg/μl) y se diluyó en 490 μl de solución amortiguadora.

Tabla 6. Preparación de la alícuota CCMV

Ecuación	Datos	Resultados
$C_2 = \frac{m}{v}$	m=1 μg v= 50 μl	$C_2 = \frac{1 \mu g}{50 \mu l} = 0.02 \mu g / \mu l$ CCMV
$C_1 V_1 = C_2 V_2$	C ₁ = 1 μg/μl V ₁ = ? C ₂ = 0.02 μg/μl V ₂ = 500 μl	$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$ V ₁ = 10 μl de CCMV

5.7. Amplificación de los bacteriófagos recombinantes de cada ronda de selección R_1 , R_2 , R_3 .

Para llevar a cabo el proceso de amplificación de los fagos recombinantes de las rondas de selección, lo primero que se realizó fue la medición de las muestras a longitudes de onda de 269 y 320 nm, tal y como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Absorción a las longitudes de onda 269 y 320 nm de las rondas de selección.

	269 nm	320 nm
R1	2.191	0.617
R2	1.660	0.494
R3	0.384	0.049

Acorde a los datos obtenidos en la tabla anterior, se llevo acabo la ejecución de las ecuaciones 1 y 2, para realizar los cálculos correspondientes y conocer la concentración de viriones en las muestras.

- Ronda 1

$$ng/\mu l = \frac{2.191 - 0.617}{3.84} (1000) = 409.89 \text{ ng}/\mu l$$

$$Viriones/\mu l = \frac{2.191 - 0.617}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) = 14.740 \times 10^9 \text{ Viriones}/\mu l$$

- Ronda 2

$$ng/\mu l = \frac{1.660 - 0.494}{3.84} (1000) = 303.64 \text{ ng}/\mu l$$

$$Viriones/\mu l = \frac{1.660 - 0.494}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) = 10.9 \times 10^9 \text{ Viriones}/\mu l$$

- Ronda 3

$$ng/\mu l = \frac{0.384 - 0.049}{3.84} (1000) = 87.23 \text{ ng}/\mu l$$

$$Viriones/\mu l = \frac{0.384 - 0.049}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) = 3.13 \times 10^9 \text{ Viriones}/\mu l$$

5.8. Titulación de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección.

La titulación de los fagos recombinantes de cada ronda de selección se llevo a acabo con el fin de obtener las colonias lisogénicas presentes en cada una, para ello primero se realizó el conteo de las placas petris y posteriormente se ejecutó la ecuación 3 para conocer la eficacia en cada ronda. En la figura 17 B, C y D, se puede observar las colonias lisogénicas obtenidas.

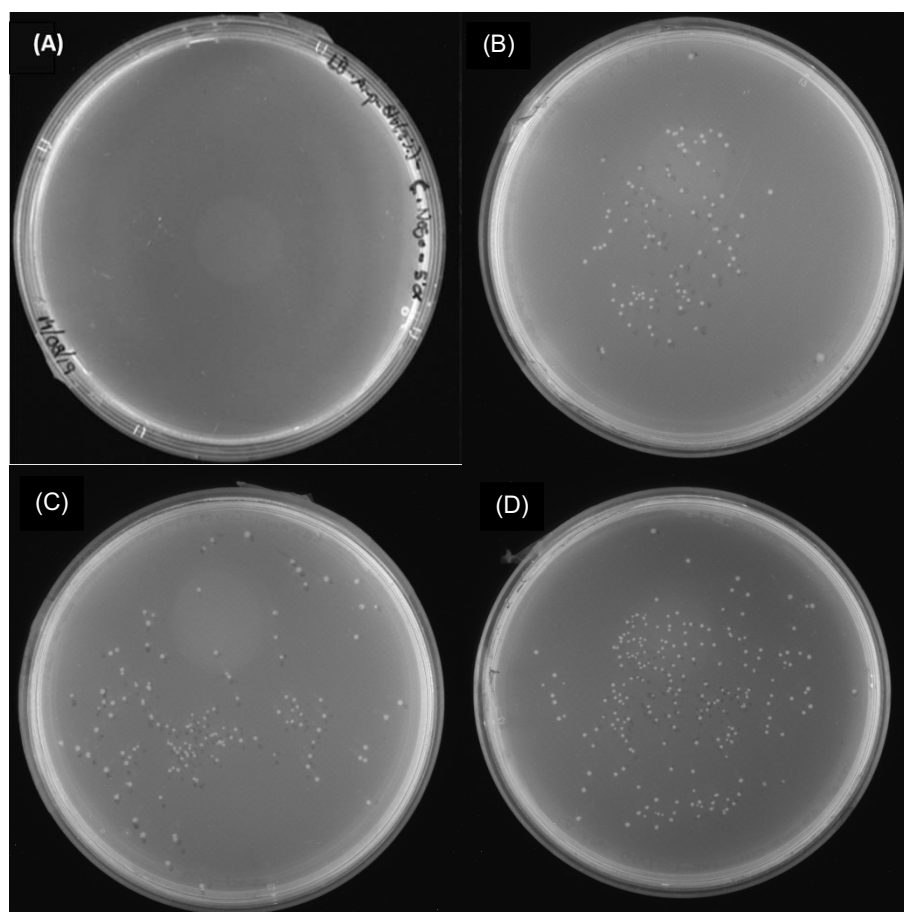


Figura. 17. Titulación de los fagos recombinantes de las rondas de selección. (A) Control negativo consistió en la siembra de células 5αF'; (B) células 5αF' infectadas con el bacteriófago R1; (C) células 5αF' infectadas con el bacteriófago R2; (D) células 5αF' infectadas con el bacteriófago R3. Todas las muestras fueron sembradas en placas con medio LB sólido, suplementado con 100 µg/µl ampicilina.

Los resultados obtenidos en la ejecución de la ecuación 3 para las unidades formadoras de placas (ufp) de cada ronda de selección son:

$$\mathbf{R1} = 2.19 \times 10^{10} \text{ ufp}/\mu\text{l} ; \mathbf{R2} = 3.04 \times 10^{10} \text{ ufp}/\mu\text{l} ; \mathbf{R3} = 5.0466 \times 10^{10} \text{ ufp}/\mu\text{l}$$

Acorde a los resultados obtenidos de la titulación de los fagos recombinantes, se puede concluir que la eficiencia obtenida en cada ronda de selección es cada vez más específica.

5.9. Ronda de selección de los bacteriófagos recombinantes de la biblioteca inmune y de las rondas R1, R2 y R3.

Se realizaron tres rondas de selección en este proceso con el fin de aumentar la afinidad hacía la proteína de la cápside del CCMV y para ello lo primero que se realizó fue la cuantificación de la eficiencia de infección de los fagos recombinantes sobre cada ronda de selección (ver Fig.18). Seguidamente los fagos eluidos de las rondas de selección fueron amplificados, para posteriormente realizar la titulación del mismo de acorde a la sección 5.8 (titulación de bacteriofagos recombinantes).

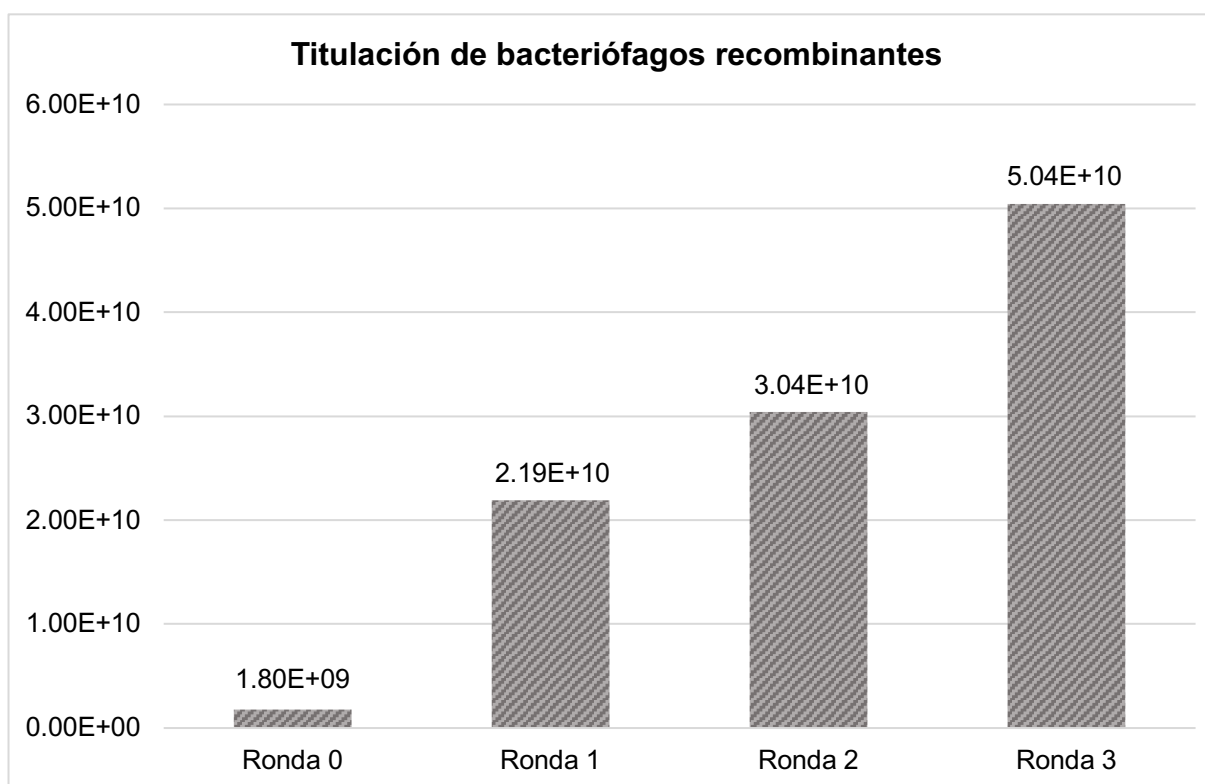


Figura. 18. Obtención de los bacteriófagos recombinantes amplificados de las rondas de selección contra el CCMV. La ronda 0 corresponde a los fagos recombinantes amplificados a partir de la biblioteca inmune; las rondas 1, 2 y 3 representan a los fagos recombinantes de las ronda de selección realizada en el biopanning.

Acorde con los resultados de la fig.18, se llegó a la conclusión que durante el proceso de titulación de los fagos recombinantes, estos fueron incrementandose conforme se realizaban las rondas de selección. Las rondas 1,2 y 3 aumentaron un orden de magnitud en comparación a los fagos recombinantes recuperados de la biblioteca inmune.

5.10. Eliminación del glicerol en los bacteriófagos recombinantes de la ronda de selección (R_0) con PEG 6000

Después de haber realizado la eliminación del glicerol en las muestras de la ronda de selección (R_0), se llevó a cabo la medición de la densidad óptica de los fagos recombinantes, tal y como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Densidad óptica de los fagos recombinantes a longitudes de onda de 269 y 320 nm.

	269 nm	320 nm
R0 IMN	0.175	0.092
R0 VHH	0.263	0.138

Acorde a los datos obtenidos de la densidad óptica y empleando las ecuaciones (1) y (2), se obtuvo la concentración de viriones en cada una de las muestras:

IMN

$$\text{ng}/\mu\text{l} = \frac{0.175 - 0.092}{3.84} (1000) = 21.61 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{Viriones}/\mu\text{l} = \frac{0.175 - 0.092}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) = 7.77 \times 10^8 \text{ Viriones}/\mu\text{l}$$

VHH

$$\text{ng}/\mu\text{l} = \frac{0.263 - 0.138}{3.84} (1000) = 32.55 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{Viriones}/\mu\text{l} = \frac{0.263 - 0.138}{6407 \frac{\text{bases}}{\text{virión}}} (6 \times 10^{13}) = 1.17 \times 10^9 \text{ Viriones}/\mu\text{l}$$

5.11. Ensayo ELISA para evaluar la viabilidad de los fagos recombinantes

Los resultados obtenidos en el ensayo ELISA, nos permitió conocer la capacidad de reconocimiento de los fagos recombinantes de las rondas de selección sobre el CCMV, tal y como se muestra en la Figura 19. Para esta prueba de viabilidad se empleó como control negativo al fago ayudador (VCM13) y como control positivo al suero inmune de llama.

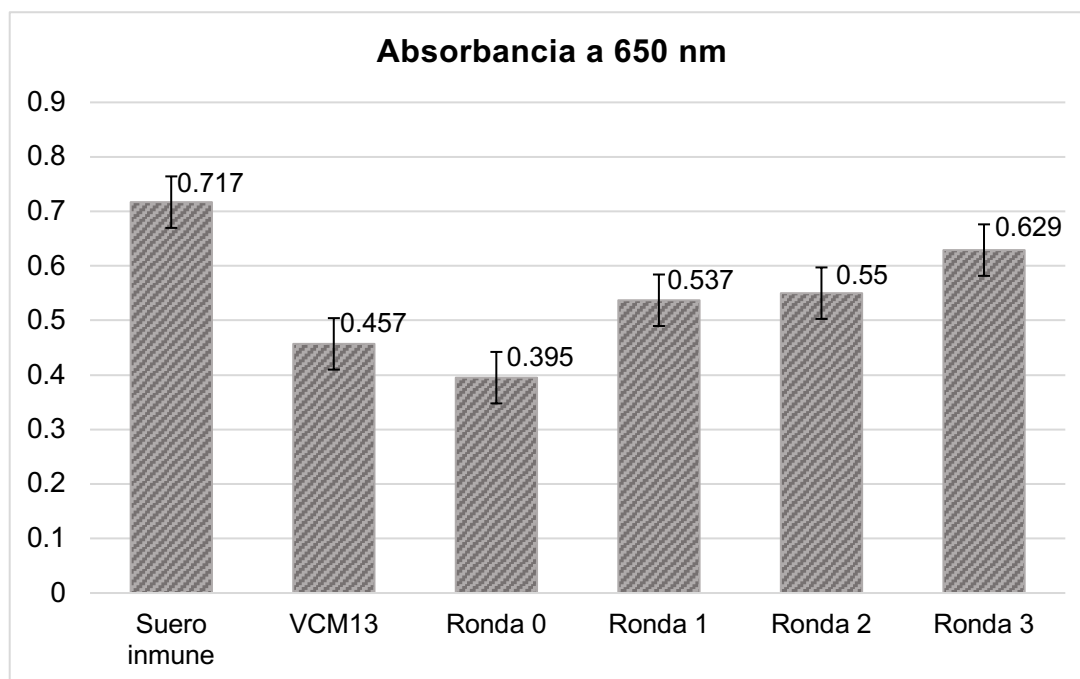


Figura. 19. ELISA de los bacteriófagos recombinantes de las rondas de selección contra el CCMV. El nivel de reconocimiento y afinidad de los fagos recombinantes en contra del CCMV se llevo a cabo mediante el anticuerpo anti-M13-pVIII (Con actividad peroxidasa); mientras que para la detección del suero inmune se uso un anticuerpo antillama acoplado a una peroxidasa (este proceso se realizo por triplicado).

Acorde a los resultados obtenidos en el ensayo ELISA, se pudo constatar que el nivel de reconocimiento de los fagos recombinantes de las rondas 1,2 y 3 hacía el CCMV presentó un aumento considerable en contraste con los de la ronda 0, obtenidos a través de la biblioteca inmune. Así mismo, cabe mencionar que en las rondas 1,2 y 3 no se observó aumento considerable hacía el reconocimiento del antígeno. Por otro lado, se constató que existe mayor capacidad de reconocimiento de los fagos recombinantes del suero inmune, pero no existe diferencia significativa entre estos.

5.12. PCR de colonia

Después de haber obtenido las colonias transformadas con el fagémido (pComb3XSS) asociado con el fragmento VHH se llevo acabo un PCR de colonia, esto con el fin de corroborar la presencia del gen del fragmento de interés (VHH) en las muestras. Para ello se tomaron 5 colonias al azar de la ronda 3 y acorde a los resultados reflejados en la figura 20, de las 5 colonias evaluadas 4 fueron positivas, es decir que 80% de las colonias estudiadas si presentaron el fragmento de interés.

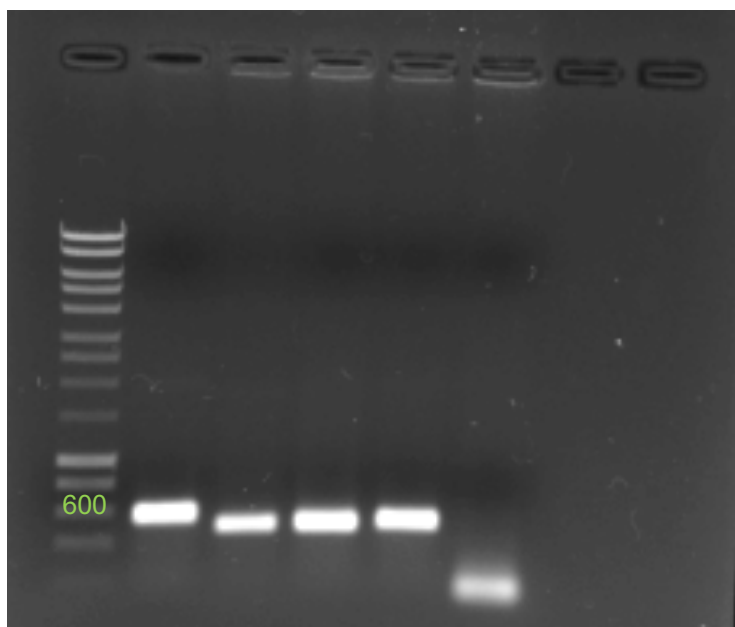


Figura. 20. Electroforésis de los bacteriófagos recombinantes. En un gel de agarosa al 1%, se evaluaron 5 colonias en total de las cuales 4 fueron positivas, esto significa que el 80% de las colonias transformadas presentan el gen del fragmento VHH.

DISCUSIÓN

Uno de los desafíos que enfrenta la industria agrícola de *vigna unguiculata* (caupí) son las enfermedades de origen viral, provocada particularmente por el virus moteado clorótico del caupí (CCMV), que se encuentra determinado por las afectaciones de la lámina foliar, carencia de vainas y alteración en la distribución de la clorófila, además de estos síntomas que afectan a la planta se forman mosaicos, enanismo y hojas deformes, que perturban su ciclo de vida y de su producción. Es por ello que el objetivo fundamental de este proyecto de investigación es generar una alternativa que proporcione un diagnóstico temprano y eficiente contra el CCMV, mediante el empleo de nanoanticuerpos de camélidos capaces de detectar al antígeno de interés, esto con el fin de evitar grandes pérdidas en el rendimiento, calidad y durabilidad de los cultivos. *Vigna unguiculata* (Caupí) proviene de la familia Fabaceae y subfamilia Papilionoideae de la tribu phaseoleae (Meena et al., 2015), su importancia se debe a que es considerada como una leguminosa de alto valor nutricional (Adeola et al., 2011; Freitas, Teixeira & Ferreira, 2004) para los países en desarrollo (Olunike, 2014). Su ventaja radica por que es capaz de adaptarse distintos tipos de suelos y a regiones tropicales (Meena et al., 2015). En México, esta leguminosa se cultiva principalmente en los estados de Guerrero, Tabasco, Campeche y Yucatán (Lagunes-Espinoza et al., 2008), donde se consumen de diferentes maneras los granos verdes y secos (Márquez-Quiroz et al., 2015).

El empleo de los nanoanticuerpos, se debe a sus ventajas significativas como su pequeño tamaño (15 kDa), poseen un dominio único (VHH), tienen estabilidad química y térmica (Cortez-Retamozo et al., 2004 ; Wang et al., 2014), presentan una elevada afinidad de reconocimiento hacia la molécula de interés o antígeno y posee baja inmunogenicidad por su homología en contraste con los anticuerpos monoclonales que poseen el dominio VH (Klarenbeek et al., 2015).

Para llevar a cabo la selección de los nanoanticuerpos contra el CCMV, se empleó la metodología establecida en el 2014 por Pardon y Colaboradores (Pardon et al., 2014) y el método de selección de despliegue en fagos; lo primero que se realizó fue el rescate y amplificación de los fagos recombinantes a través de la biblioteca inmune

(figura 15), en la que se obtuvo una concentración de 4.76×10^8 cel/mL y una eficiencia de 10^7 transformantes; seguidamente se llevo a cabo su amplificación y los resultados obtenidos en su concentración fue de 52.6 ng/ μ L y 1.89×10^9 virión/ μ L. En el proceso de titulación de los fagos recombinantes de la R_0 se obtuvieron 18 colonias lisogénicas y una eficacia de 1.8×10^9 ufc/ μ L. Para la creación de la biblioteca inmune, una eficiencia calificada válida para la selección de anticuerpos es de aproximadamente 10^6 , en contraste a las requeridas para las bibliotecas de fragmentos derivados de anticuerpos monoclonales (IgG). Esto se debe a que la especificidad de las bibliotecas de VHH tiene un solo dominio y ya clonado presenta la especificidad original (Rosales Fuerte I.A, 2020) y no requieren de una dimerización para crear un anticuerpo funcional (Muyldermans, 2013); mientras que la especificidad de las bibliotecas de anticuerpos igG dependen del apareamiento de los dominios VH y VL (Rosales Fuerte I.A, 2020). Posteriormente se llevo a cabo la amplificación de los fagos recombinantes de las rondas de selección, en la ronda 1 se obtuvo una concentración de viriones: 409.89 ng/ μ L y 14.740×10^9 virión/ μ L; mientras que en la ronda 2: 303.64 ng/ μ L y 10.9×10^9 virión/ μ L y en la ronda 3: 87.23 ng/ μ L y 3.13×10^9 virión/ μ L. Acorde a los resultados conseguidos se pudo constatar que la cantidad de fagos recombinantes incrementaron su afinidad en comparación a los obtenidos en la ronda 0.

En el proceso de titulación de las rondas de selección, las rondas 1,2 y 3 incrementaron un orden de magnitud en comparación a la ronda 0. Este incremento se debe a que después de haber realizado la primera ronda de selección, los fagos recombinantes obtenidos poseían mayor capacidad de reconocimiento hacia el CCMV. También se observó un pequeño incremento entre las rondas siguientes, no obstante este incremento no fue tan relevante en contraste con los fagos de la ronda 0 (Figura 18). Posteriormente, se llevo a cabo un ensayo ELISA con el fin de verificar la presencia y capacidad de reconocimiento de los fagos recombinantes hacia el antígeno de interés (Figura 19). Los fagos de las rondas 1,2 y 3 presentaron mayor nivel de reconocimiento en comparación con los fagos de la ronda 0. Sin embargo, no presentaron un nivel de reconocimiento mayor frente al suero inmunizado de llama, esto se debe a que se encuentra compuesta de inmonoglobulinas de cadena pesada (hcAbs) como de igG, lo que le confiere la capacidad de reconocer al antígeno de interés (CCMV). Acorde a

la metodología presentada por Pardon y colaboradores en el 2014, la literatura establecida menciona que para llevar a cabo la selección de los fagos recombinantes con éxito, éstas deben poseer un grado de reconocimiento mayor hacia el antígeno de interés y deben presentar en el proceso de titulación como mínimo 2 niveles de magnitud sobre los fagos obtenidos a través de la biblioteca inmune (Ronda 0). Para conseguir este resultado pueden emplearse varios métodos como incrementar las rondas de selección, elevar el porcentaje de BSA ó Tween 20, realizar más lavados antes de realizar la elución de los fagos recombinantes (Rosales Fuerte I.A, 2020). Concluido el proceso anterior, se llevo acabo un PCR de colonia, en el que se evaluaron 5 muestras de la ronda tres, de las cuales el 80% de los transformantes presentaron el gen VHH con bandas de 600 pb, que corresponden al tamaño promedio de un nanoanticuerpo. Es importante destacar que este trabajo de investigación puede servir como base para el desarrollo de biosensores basados en nanoanticuerpos para detección de enfermedades fotopatológicas.

CONCLUSIÓN

A través de la producción de nanoanticuerpos de camélidos contra el CCMV, podríamos obtener un diagnóstico temprano y eficiente contra los virus que amenazan al reino de los vegetales. Con esta alternativa se pretende reducir las grandes pérdidas en el rendimiento, calidad y durabilidad de los cultivos de *vigna unguiculata* (caupí). La importancia de este cultivo radica por su elevado valor nutricional y por ser fuente principal de muchas partes del mundo.

Acorde al trabajo de investigación realizado, se pudo constatar que durante el proceso de rescate y amplificación de los fagos recombinantes a través de biblioteca inmune para la obtención de la subbiblioteca 1 contra el antígeno, se logró obtener una eficiencia $\approx 10^7$ transformantes. Mediante la técnica de despliegue en fagos, se logró expresar la biblioteca recombinante del nanoanticuerpo VHH en el fago recombinante M13, el cual posee la capacidad de reconocer al CCMV. Mientras que los resultados obtenidos de las subbibliotecas en el ensayo ELISA de las rondas 1,2 y 3 presentaron un incremento significativo en el nivel de reconocimiento al antígeno en comparación con la ronda 0.

Para finalizar, se llevo acabo un PCR de colonia, en el que se pudo obtener una eficiencia del 80% con la presencia del VHH. Los nanoanticuerpos producidos contra el CCMV, poseen un gran interés debido a sus diversas aplicaciones biotecnológicas, por lo que este trabajo de investigación puede servir como base para el desarrollo de biosensores basados en nanoanticuerpos que permitan detectar aquellas enfermedades que afectan los cultivos agrícolas de *vigna unguiculata* (caupí).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeola, S. S., Folorunso, S. T., Gama, E. N., Amodu, M. Y. & Owolabi, J. O. (2011). Productivity and Profitability Analyses of Cowpea Production in Kaduna State. *Advances in Applied Science Research*, 2(4), 72-78. <https://www.primescholars.com/articles/productivity-and-profitability-analyses-of-cowpea-production-in-kaduna-state.pdf>

Annamalai, P., & Rao, A.L. (2006). Packaging of Brome Mosaic Virus Subgenomic RNA Is Functionally Coupled to Replication-Dependent Transcription and Translation of Coat Protein. *Journal of Virology*, 80(20), 10096–10108. <https://doi.org/10.1128/JVI.01186-06>

Araméndiz-Tatis, H., Espitia-Camacho, M., & Sierra, C. M. (2011). Comportamiento agronómico de líneas promisorias de frijol caupí *Vigna unguiculata* L. Walp en el Valle del Sinú. *Temas Agrarios*, 16(2), 9-17. <https://doi.org/10.21897/rta.v16i2.687>

Araya Fernández C.M & Hernández Fonseca J.C. (2006) .Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. San José Costa Rica, MAG.44p; 22cms. ISBN 9968-877-19-0. <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H20-5247.pdf>

Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., & Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters*, 414(3), 521–526. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01062-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01062-4)

Arias, L., Jarvis, D., Williams, D., Latournerie, L., Márquez, F., Castillo, F., Ramírez P., Ortega R., Ortiz J., Sauri E., Duch J., Bastarrachea J., Guadamarra M., azares E., Interian V., Lope D., Duch T., Canul J., burgos L., Camacho T., González M., Tuxill J., Eyzaguirre C., Cob V.(2004) Conservación in situ de la biodiversidad de

las variedades locales en la milpa de Yucatán, México. In: Chávez-Servia, J.L.J., Tuxill, J., & Jarvis, D.I., (eds): Manejo de la diversidad de los cultivos en los agroecosistemas tradicionales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. pp: 36-46.

https://www.researchgate.net/publication/232041690_Manejo_de_la_diversidad_de_los_cultivos_en_los_agroecosistemas_tradicionales

Aydin S. (2015). A short history history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 72, 4-15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>

Azizgolshani, O., Garmann, R.F., Cadena-Nava R., Knobler, C.M., & Gelbart, W.M. (2013). "Reconstituted Plant Viral Capsids Can Release Genes to Mammalian Cells." Virology 441 (1). Elsevier: 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.001>

Bancroft, J.B., Hiebert E., & Bracker, C.E. (1969). "The Effects of Various Polyanions on Shell Formation of Some Spherical Viruses." Virology 39 (4): 924–30. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90029-4)

Baral, T.N., Magez, S., Stijlemans, B., Conrath, K., Vanhollebeke, B., Pays, E., Muyldermans, S. & De Baetselier, P. (2006). Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. Nature Medicine, 12(5), 580-584.

https://core.ac.uk/reader/200225234?utm_source=linkout

Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2001). Section 1: Phage Display. En R. Webster (Ed.), Phage Display: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

<https://books.google.com.ec/books?id=uCNAay6pVAgC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>

Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., & Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 7978–7982. <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.88.18.7978>

Calderón-Cerdas, R., & Araya-Fernández, C. M.(2022). Síntomas del amachamiento del frijol común. *Revista Tecnología En Marcha*, 35(3), Pág. 158–166. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i3.5716>

Cardeiro, A., Da Costa, D., Lopes, D., da Silva, P. B., Cavalcante, R., & Siviero, A. (2019). Cowpea: A strategic legume species for food security and health. En J. C. Jimenez-Lopez & A. Clemente (eds.), *Legume seed nutraceutical research* (pp. 79-86). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79006>

Cariello, N. F., Swenberg, J. A., & Skopek, T. R. (1991). Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, 19(15), 4193–4198. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4193>

Carvalho, A. F. U., De Sousa, N. M., Farias, D. F., Da Rocha-Bezerra, L. C. B., Da Silva, R. M. P., Viana, M. P. & De Moraes, S. M. (2012). Nutritional Ranking of 30 Brazilian Genotypes of Cowpeas including Determination of Antioxidant Capacity and Vitamins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1-2), 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.01.005>

Carvalho, M., Castro, I., Matos, M., Lino-Neto, T., Silva, V., Rosa, E., & Carnide, V. (2016). Caracterização agro-morfológica de acessos de feijão frade (*Vigna unguiculata*): Bases para o melhoramento. *Revista de Ciências Agrárias*, 39(4), 506-517. <http://dx.doi.org/10.19084/RCA16091>

Co.K.G. & Berthold Technologies GmbH. (2024).
<https://www.berthold.com/es/bioanalitica/aplicaciones/elisa/fundamentos/>

Comellas-Aragonés, M., Engelkamp H., Claessen V.I., Sommerdijk N.A.J.M., Rowan A.E., Christianen P.C.M., Maan J.C., Verduin B.J.M., Cornelissen J.J.L.M., & Nolte R.J.M.(2007). A Virus-Based Single-Enzyme Nanoreactor. *Nature Nanotechnology* 2 (10): 635–39. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>

Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S. & Revets, H. (2004). Efficient Cancer Therapy with a Nanobody-Based Conjugate. *Cancer Research*, **64(8)**, 2853-2857.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3935>

Coulibaly, O., Lowenberg-DeBoer, J., (2002). The economics of cowpea in West Africa. In *Proceedings, Third World Cowpea Conference, Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production*. Ibadan: IITA. Nigeria. pp: 351-366.
<https://biblio.iita.org/documents/S02ProcChallengesFatokunNothomNodev.pdf-2a50d34ca2b3da7ceabc0c446148cb0c.pdf>

Cuillel, M., Jacrot, B., & Zulauf, M. (1981). AT=1 Capsid Formed by Protein of Brome Mosaic Virus in the Presence of Trypsin. *Virology*, 72(110), 63–72.
[http://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90008-8](http://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90008-8)

De almeida, S.S., Maghalaes, A.A., De Castro Soares, S., Zurita-Turk, M., Goulart, L.R., Miyoshi,A. & Azevedo, V. (2011). The phage display technique: advantages and recent patents. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, Volume 5(2),136-148. <https://doi.org/10.2174/187221511796392060>

De Meyer, T., Muyldermans, S. & Depicker, A. (2014). Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends in Biotechnology*, 32(5), 263-270. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.03.001>

De-Paula, C. D., Jarma-Arroyo, S. & Aramendiz-Tatis, H. (2018). Nutritional characterization and determination of phytic acid as an anti-nutritional factor of cowpea beans. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 30-41. <http://dx.doi.org/10.15517/ma.v29i1.27941>

Deng, GF., Lin, X., Xu, XR., Gao, LL., Xie, JF., Li, HB. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of Functional Foods* 5: 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.015>

Díaz-Valle, A., García-Salcedo, Y. M., Chávez-Calvillo, G., Silva-Rosales, L., & Carrillo-Tripp, M. (2015). Highly efficient strategy for the heterologous expression and purification of soluble Cowpea chlorotic mottle virus capsid protein and in vitro pH-dependent assembly of virus-like particles. *Journal of virological methods*, 225, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.023>

Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G., Muyldermans, S., Wyns, L. y Matagne, A. (2002). Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science*, 11(3), 500-515. <https://doi.org/10.1110/ps.34602>

Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L. & Muyldermans, S. (2001). Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *The Journal of biological chemistry*, 276(10), 7346-7350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007734200>

Fageria, N. K., Baligar, V. C., & Bailey, B. A. (2005). Role of cover crops in improving soil and row crop productivity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(19), 2733-2757. <https://doi.org/10.1080/00103620500303939>

Famata, A. S., Modu, S., Mida, H. M., Hajjagana, L., Shettima, A. Y. & Hadiza, A. (2013). Chemical Composition and Mineral Element Content of two Cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) Varieties as Food Supplement. *International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 93-96.

<https://www.interesjournals.org/articles/chemical-composition-and-mineral-element-content-of-two-cowpea-igna-unguiculata-l-walp-varieties-as-foodsupplement.pdf>

Food and Agriculture Organization (FAO). (2018). Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá, pp.58-65. CCBY-NC-SA-3.0 IGO. ISBN 978-92-5-131129-5.

<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/bbacf768-1b9a-4ab7-8de8-0a08cc2cf835/content>

Fox J. M., Wang G., Speir J.A., Olson N.H., Johnson J.E., Baker T.S., & Young M.J. (1998). Comparison of the Native CCMV Virion with in Vitro Assembled CCMV Virions by Cryoelectron Microscopy and Image Reconstruction. *Virology*, 244(1), 212–218. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9107>

Freitas, R. L., Teixeira, A. R. & Ferreira, R. B. (2004). Characterization of the Proteins from *Vigna unguiculata* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1682-1687. <https://doi.org/10.1021/jf0300588>

García-Hernández, J.L., Valdez-Cepeda, R.D., Avila-Serrano, N.Y., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Magallanes-Quintanar, R., et al. (2005). Preliminary compositional nutrient diagnosis norms for cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

grown on desert calcareous soil. *Plant and Soil* 271: 297-307.
<https://doi.org/10.1007/s11104-004-3092-0>

Garmann, R. F., Comas-Garcia, M., Koay, M. S., Cornelissen, J. J., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2014). Role of electrostatics in the assembly pathway of a single-stranded RNA virus. *Journal of virology*, 88(18), 10472–10479.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01044-14>

Geil P.B & Anderson J. W. (1994). “Nutrition and health implications of dry beans: a review”, *Journal of the American College Nutrition*, vol. 13, no 6, pp. 549–558.
<https://doi.org/10.1080/07315724.1994.10718446>

Gergerich, R.C. & Dolja, V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0122-01>

Ghalmi, N., Malice, M., Jacquemin, JM., Ounane, SM., Mekliche, L., Baudoin, JP., (2010). Morphological and molecular diversity within Algerian cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57: 371-386. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9476-5>

Goncalves, A., Goufo, P., Barros, A., Dominguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, EA., Ferreira, L., & Rodrigues, M. (2016). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. *Journal Science Food Agricultural* 96: 2941-2951.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7644>

Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S. y Saerens, D. (2012). Efecto beneficioso dual del enlace disulfuro interloop para fragmentos de anticuerpos de dominio único. *The Journal of Biological Chemistry*, **287**(3), 1970-1979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242818>

Granito, M., Guerra, M., Torres, A. & Guinand, J. (2004). Efecto del procesamiento sobre las propiedades funcionales de Vigna Sinensis. *Interciencia*, 29(9), 521-526.

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000900009&lng=es&tlng=es

Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C. & Flajnik, M.F. (1995). Una nueva familia de genes de receptores de antígenos que sufre reordenamiento y diversificación somática extensa en tiburones. *Nature*, **374**(6518), 168-173. <https://doi.org/10.1038/374168a0>

Gupta, A., Shrivastava, N., Grover, P., Singh, A., Mathur, K., Verma, V., Kaur, C., & Chaudhary, V. K. (2013). A Novel Helper Phage Enabling Construction of Genome-Scale ORF-Enriched Phage Display Libraries. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075212>

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, EB, Bendahman, N. & Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, **363**(6428), 446-448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>

Hammers, C. M., Stanley, J. R. (2014). Antibody phage display: Technique and applications. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.521>

Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Nijman, I.J., Niewold, T.A., Frenken, L.G. & de Geus, B. (2000). Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Molecular Immunology*, **37**(10), 579-590. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(00\)00081-x](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(00)00081-x)

Hassani-Mehraban, A., Creutzburg, S., van Heereveld, L., & Kormelink, R. (2015). Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope

presentations. BMC biotechnology, 15, 80. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0180-6>

Herschhorn, A., & Hizi, A. (2010). Retroviral reverse transcriptases. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 67(16), 2717-2747. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0346-2>

Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnology, 23 (9), 1126-1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>

Jovčevska, I. & Muyldermans, S. (2020). The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*, **34**, 11-26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>

Kaiser, C.R., Flenniken M.L., Gillitzer E., Harmsen A.L., Harmsen, A.G., Jutila, M.A., Douglas T., & Young M.J. (2007). Biodistribution Studies of Protein Cage Nanoparticles Demonstrate Broad Tissue Distribution and Rapid Clearance in Vivo. *International Journal of Nanomedicine* 2(4),715–33. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2676807/>

Klarenbeek, A., El Mazouari, K., Desmyter, A., Blanchetot, C., Hultberg, A., de Jonge, N., Roovers, RC, Cambillau, C., Spinelli, S., Del-Favero, J., Verrips, T., de Haard, H.J., & Achour, I. (2015). Camelid Ig V genes reveal significant human homology not seen in therapeutic target genes, providing for a powerful therapeutic antibody platform. *mAbs*, **7(4)**, 693-706. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1046648>

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 (5517),495-497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>

Korotkov, K.V., Pardon, E., Steyaert, J. & Hol, W.G. (2009). Crystal Structure of the N-Terminal Domain of the Secretin GspD from ETEC Determined with the Assistance of a Nanobody. *Structure*, 17(2), 255-265. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.11.011>

Lagunes-Espinoza, L. C., Gallardo-López, F., Becerril-Hernández, H., & Bolaños-Aguilar, E. (2008). Diversidad cultivada y sistema de manejo de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Revista Chapingo Serie horticultura* 14: 13-21. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000100003&lng=es&tlng=es

Lam, P., & Steinmetz, N. F. (2019). Delivery of siRNA therapeutics using cowpea chlorotic mottle virus-like particles. *Biomaterials science*, 7(8), 3138–3142. <https://doi.org/10.1039/c9bm00785g>

Lavelle, L., Michel, J. P., & Gingery, M. (2007). The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *Journal of virological methods*, 146(1-2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.020>

Lee, C. M. Y., Iorno, N., Sierro, F., & Christ, D. (2007). Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2(11), 3001–3008. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.448>

Lequin R. M. (2005). Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical chemistry*, 51(12), 2415–2418. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>

Liu, W., Song, H., Chen, Q., Yu, J., Xian, M., Nian, R. & Feng, D. (2018). Recent advances in the selection and identification of antigen-specific nanobodies. *Molecular Immunology*, 96, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.02.012>

Mafakheri, K., Bihamta, MR., Abbasi, AR., Tejada-Moral, M. (2017). Assessment of genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) germplasm using morphological and molecular characterisation. *Cogent Food & Agriculture* 3: 1-20

<https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1327092>

Márquez-Quiroz, C., De-la-Cruz-Lázaro, E., Osorio-Osorio, R., & Sánchez-Chávez, E. (2015). Biofortification of cowpea beans with iron: iron's influence on mineral content and yield. *Journal of soil science and plant nutrition* 15: 839-847.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000058>

Meena, H. K.; Krishna, K. R. & Singh, B. (2015). Genetic variability, heritability and genetic advance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *The J. Plant Sci. Res.* 31(1):13-16.

<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20203001404>

Menssen, M., Linde, M., Otunga-Omondi, E., Abukutsa-Onyango, M., Dinssa, FF., Winkelmann, T. (2017). Genetic and morphological diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) entries from East Africa. *Scientia Horticulturae* 226: 268-276.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.003>

Minten, I.J., Claessen V.I., Blank K., Rowan A.E., Nolte Roeland J. M., & Cornelissen J.J.L.M. (2011). Catalytic Capsids: The Art of Confinement. *Chemical Science* 2 (2): 358-362. <https://doi.org/10.1039/C0SC00407C>

Modu, Y., Putai, A. J. & Petu-Ibikunle, A. M. (2010). An Economic Analysis of Cowpea Production among Women Farmers in Askira/Uba Local Government Area Borno State Nigeria. *African Journal of General Agriculture*, 6(1), 7-17.

<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:155430726>

Molecular Devices, LLC. (2024).

<https://es.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>

Monsalve Castro, L. M. (2007). Efecto de la suplementación con mezclas de leguminosas tropicales sobre la fermentación ruminal, el flujo de proteína duodenal y la absorción de nitrógeno en ovejas. (Tesis Doctorado Zootecnia). Universidad Nacional de Colombia, Posgrado en Ciencias Agrarias, énfasis en Producción Animal Tropical. <https://hdl.handle.net/10568/66202>

Morales, F.J.; Araya, C.M.; Hernández, J.C.; Arroyave, J. A.; Cuervo, M.; Velazco, A.C.; Castaño M. (1999). “Etiología del amanchamiento del frijol común en Costa Rica”, Manejo Integrado a Plagas Agroecológicas. CATIE, Turrialba (Costa Rica), Vol.52, N.1, pp.42-48.. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/7189>

Moreno, L.L., Tuxill, J., Moo, E.Y., Reyes, L.A., Alejo, J.C., Jarvis, DI. (2006). Traditional Maize Storage Methods of Mayan Farmers in Yucatan, Mexico: Implications for Seed Selection and Crop Diversity. *Biodiversity & Conservation* 15: 1771-1795. <https://doi.org/10.1007/s10531-004-6679-0>

Murphy K., Travers P. & Walport M. (2008). *Inmunobiología de Janeway*. Séptima Edición. McGraw Hill Interamericana Editores. México, D.F., México. ISBN-13-978-970-7347-6.

<https://archive.org/details/MurphyTraversWalportInmunologiaDeJaneway7Edicion/page/n3/mode/2up?view=theater>

Muyldermans S. (2013). Nanocuerpos: anticuerpos naturales de dominio único. *Annual Review of Biochemistry*, **82**, 775-797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.

Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A.R.G. & Hamers, R. (1994). Sequence and structure of V_H domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering Design & Selection*, 7, 1129-1135. <https://doi.org/10.1093/protein/7.9.1129>

Núñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodríguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R. & Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein J. Nanotechnol.* 11, 372-382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>

Nuttall, S.D., Krishnan, U.V., Hattarki, M., De Gori, R., Irving, R.A., & Hudson, P.J. (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. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00057-8](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00057-8)

Olunike, A. A. (2014). Utilization of legumes in the Tropics. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 4(12):77-84.
<https://www.iiste.org/Journals/index.php/JBAH/article/view/12949/13487>

Ortega-Portilla, P.A., Cancino-Villeda, L., Coronado-Aceves, E.W., & Espitia-Pinzón, C.(2021). Nanoanticuerpos: desarrollo biotecnológico y aplicaciones. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24, e398. Epub 17 de abril de 2023. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.398>

Ortega, P.A., Silva-Miranda, M., Torres-Larios, A., Campos-Chávez, E., Franken, K., Ottenhoff, T., Ivanyi, J. & Espitia, C. (2020). Selection of a Single Domain Antibody, Specific for an HLA-Bound Epitope of the Mycobacterial Ag85B Antigen. *Frontiers in Immunology*, 11, 577815. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.577815>

Padlan, E.A (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology*, **31**(3), 169-217. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0161-5890(94)90001-9)

Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S. G., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W. G., Kobilka, B. K., & Steyaert, J. (2014a). A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature protocols*, 9(3), 674–693. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.039>

Patterson, D. P., Prevelige P.E, & Douglas, T. (2012). Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano* 6 (6): 5000–5009. <https://doi.org/10.1021/nn300545z>

Pellis, M., Pardon, E., Zolghadr, K., Rothbauer, U., Vincke, C., Kinne, J., Dierynck, I., Hertogs, K., Leonhardt, H., Messens, J., Muyldermans, S., & Conrath, K. (2012). A bacterial-two-hybrid selection system for one- step isolation of intracellularly functional Nanobodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.04.023>

Phillips, R. D., McWatters, K. H., Chinnan, M. S., Hung, Y. C., Beuchat, L. R., Sefaddeh, S., Sakyi-Dawson, E., Ngoddy, P., Nnanyelugo, D., Enwere, J., Komey, N. S., Liu, K., Mensa-Wilmot, Y., Nnanna, I. A., Okeke, C., Prinyawiwatkul, W., & Saalia, F. K. (2003). Utilization of Cowpeas for Human Food. *Fiel Crops Research*, 82(2-3), 193-213. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(03\)00038.8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(03)00038.8)

Porstmann, T. & Kiessig S.T. (1992). Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of Immunological Methods*. 150 (1-2), 5-21. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90061-w](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90061-w)

Ramos-Carreño, S., Giffard-Mena, I., Zamudio-Ocadiz, J. N., Nuñez-Rivera, A., Valencia-Yañez, R., Ruiz-Garcia, J., Viana, M. T., & Cadena-Nava, R. D. (2021). Antiviral therapy in shrimp through plant virus VLP containing VP28 dsRNA against WSSV. *Beilstein journal of organic chemistry*, 17, 1360–1373. <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.95>

Ren, X., Yue, X., Mwakinyali, S.E., Zhang, W., Zhang, Q. & Li, P. (2020). Small molecular contaminant and microorganism can be simultaneously detected based on nanobody-phage: using carcinogen aflatoxin and its main fungal *Aspergillus section flavi ssp.* In stored maize for demonstration. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03023>

Rosales-Fuerte, I. A. (2020). Selección y caracterización de nanoanticuerpos de camélidos anti-CDH11. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 68 pp. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3226>

Rossotti, M. A. (2015). Plataforma para acelerar el descubrimiento de nanobodies contra blancos de interés biomédico y sus aplicaciones.1–116. <http://riquim.fg.edu.uy/archive/files/4ad5a6da4c490acf41c3c074e68b5045.pdf>

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>

Salvador, J.P., Vilaplana, L. & Marco, M.P. (2019). Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. *Anal Bioanal Chem*, 411(9), 1703-1713. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01633-4>

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. edition, Vol.1, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. https://books.google.com.mx/books/about/Molecularcloning.html?id=Bosc5JVxNp_kC&rediresc=y

Sánchez Rios, O.F & Gutiérrez López K.G. (2022). Frijol caupí , un cultivo alternativo con amplios beneficios. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural y el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

<https://www.cimmyt.org/es/noticias/frijol-caupi-un-cultivo-alternativo-con-amplios-beneficios/#:~:text=Los%20resultados%20en%20San%20Pedro,zonas%20de%20Oaxaca%20donde%2C%20en>

Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava R.D., Palomares L.A., Ruiz Garcia, Koay M.S., Cornelissen, J.J., & Vazquez-Duhalt R.(2014). Chemotherapy pro-Drug Activation by Biocatalytic Virus-like Nanoparticles Containing Cytochrome P450. Enzyme and Microbial Technology 60 (June). Elsevier Inc.: 24–31.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.003>

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.(2013). Enfermedades que afectan al cultivo de frijol, ciclo agrícola otoño-invierno 2013-2014.

<https://www.gob.mx/agricultura%7Csinaloa/articulos/enfermedades-que-afectan-al-cultivo-de-frijol-ciclo-agricola-otono-invierno-2013-2014>

Segura-Campos M., Ruiz-Ruiz J., Chel-Guerrero L., & Betancur-Ancona D. (2013) Antioxidant activity of Vigna un- guiculata L. walp and hard-to-cook Phaseolus vulgaris L. protein hydrolysates. CyTA - Journal of Food 11(3): 208-215.

<https://doi.org/10.1080/19476337.2012.722687>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). [Estadística de Producción Agrícola Nacional]. Agricultura.

<https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

Servicio de Información Agrícola y Pecuaria. (2017). Anuario estadístico de la producción agrícola - producción agrícola 2017.

<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>

Singh, A., Kaur, G., Singh, S., Singh, N., Saxena, G., & Verma, P. C. (2017). Recombinant Plant Engineering for Immunotherapeutic Production. *Current molecular biology reports*, 3(4), 306–316. <https://doi.org/10.1007/s40610-017-0078-2>

Singh, S., Kumar, N. K., Dwiwedi, P., Charan, J., Kaur, R., Sidhu, P., & Chugh, V. K. (2018). Monoclonal Antibodies: A Review. *Current clinical pharmacology*, 13(2), 85–99. <https://doi.org/10.2174/1574884712666170809124728>

Siontorou, C.G. (2013). Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *International Journal of Nanomedicine*, **8**, 4215-4227. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39428>

Smith, G.P. (1985). Fago de fusión filamentoso: nuevos vectores de expresión que muestran antígenos clonados en la superficie del virión. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315-1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

Sockolosky, J.T., Dougan, M., Ingram, J.R., Ho, C.C., Kauke, M.J., Almo, S.C., Ploegh, H.L., & Garcia, K.C. (2016). Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(19), E2646-2654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604268113>

Stanfield, R. L., Dooley, H., Verdino, P., Flajnik, M. F., & Wilson, I. A. (2007). Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding. *Journal of molecular biology*, 367(2), 358–372. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.045>

Stoilova, T., & Pereira, G. (2013) Assessment of the genetic diversity in a germplasm collection of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using morphological traits. *African Journal of Agricultural Research* 8: 208-215.

https://academicjournals.org/article/article1380870902_Stoilova%20and%20Pereira.pdf

Tamay D.L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2(2):70-78.

<https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>

Tanha, J., Xu, P., Chen, Z., Ni, F., Kaplan, H., Narang, S. A., & MacKenzie, C. R. (2001). Optimal Design Features of Camelized Human Single-domain Antibody Libraries. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24774–24780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100770200>

Timmermans, S. B. P. E., Vervoort, D. F. M., Schoonen, L., Nolte, R. J. M., & van Hest, J. C. M. (2018). Self-Assembly and Stabilization of Hybrid Cowpea Chlorotic Mottle Virus Particles under Nearly Physiological Conditions. *Chemistry, an Asian journal*, 13(22), 3518–3525. <https://doi.org/10.1002/asia.201800842>

Tórtora, G.J., Funke B.R., & Case C.L. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9ª. Editorial: Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina, Pág. 258-259. ISBN: 978-950-06-0740-7.

<https://books.google.es/books?id=Nxb3iETuwplC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Valdés Reséndiz, O. E. (2015). Estabilización de cápsides virales para su potencial uso como bionanorreactores. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

<http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/654>

Valdez-Cruz, N.A., García-Hernández, E., Espitia, C., Cobos-Marín, L., Altamirano, C., Bando-Campos, C.G., Cofas-Vargas, L.F., Coronado-Aceves, E.W., González-

Hernández, R.A., Hernández-Peralta, P., Juárez-López, D., Ortega-Portilla, P.A, Restrepo-Pineda, S., Zelada-Cordero, P. & Trujillo-Roldán, M.A. (2021). Integrative overview of antibodies against SARS-CoV-2 and their possible applications in COVID-19 prophylaxis and treatment. *Microb Cell Fact*, **20(1)**, 88. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01576-5>

Van der Linden, R., de Geus, B., Stok, W., Bos, W., van Wassenaar, D., Verrips, T., & Frenken, L. (2000). Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *Journal of immunological methods*, 240(1 2), 185 195. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(00\)00188-5](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(00)00188-5)

Vara-Sánchez, I., & Cuéllar Padilla, M.C. (2013). Biodiversidad cultivada: una cuestión de coevolución y transdisciplinariedad. *Revista Ecosistemas* Volúmen 22(1), 5-9. Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España. <https://www.redalyc.org/pdf/540/54026241016.pdf>

Vieira, J., & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 153, 3– 11. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53044-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53044-0)

Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S. & Conrath, K. (2009). General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3273-3284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806889200>

Wamalwa, E.N., Muoma, J., & Wekesa, C. (2016). Genetic diversity of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Accession in Kenya gene bank based on simple sequence repeat markers. *International Journal Genomics*, 8956412. <https://doi.org/10.1155/2016/8956412>

Wang, J., Bever, C.R., Majkova, Z., Dechant, J.E., Yang, J., Gee, S.J., Xu, T. & Hammock, B.D. (2014). Heterologous Antigen Selection of Camelid Heavy Chain

Single Domain Antibodies against Tetrabromobisphenol A. *Analytical Chemistry*, **86**(16), 8296-8302. <https://doi.org/10.1021/ac5017437>

Wang, Y., Fan, Z., Shao, L., Kong, X., Hou, X., Tian, D., Sun, Y., Xiao, Y. & Yu, L. (2016). Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 3287-3303. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107194>

Waterbeemd M. Van De, Snijder J., Tsvetkova I., B., Dragnea B. G., Cornelissen J. J., & Heck A. J.R. (2016). Examining the Heterogeneous Genome Content of Multipartite Viruses BMV and CCMV by Native Mass. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 27, 1000–1009. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1348-6>

Watson, J.D., & Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 (4356), 737-738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>

Wrapp, D., De Vlieger, D., Corbett, K. S., Torres, G. M., Wang, N., Van Breedam, W., Roose, K., van Schie, L., VIB-CMB COVID-19 Response Team, Hoffmann, M., Pöhlmann, S., Graham, B. S., Callewaert, N., Schepens, B., Saelens, X., & McLellan, J. S. (2020). Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. *Cell*, 181(5), 1004–1015.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.031>

Wu, C.H., Liu, I.J., Lu, R.M. & Wu, H.C. (2016). Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *Journal of Biomedical Science*, 23: 8. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0223-x>

Xu, C., Liu, X., Zhang, C., Zhang, X., Zhong, J., Liu, Y., Hu, X., Lin, M. y Liu, X. (2017). Establishment of a sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for detection

of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie toxin based nanobody from a phage display library. *Analytical Biochemistry*, 518, 53-59. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.11.006>

Yau, K. Y. F., Dubuc, G., Li, S., Hiram, T., MacKenzie, C. R., Jeremut, L., Hall, J. C., & Tanha, J. (2005). Affinity maturation of a VHH by mutational hotspot randomization. *Journal of Immunological Methods*, 297(1–2), 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.12.005>

Zhu, X., Wang, L., Liu, R., Flutter, B., Li, S., Ding, J., Tao, H., Liu, C., Sun, M. & Gao, B. (2010). COMBODY: one-domain antibody multimer with improved avidity. *Immunology and cell biology*, 88(6), 667-675. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.21>

Zinkhan, S., Ogrina, A., Balke, I., Reseviča, G., Zeltins, A., de Brot, S., Lipp, C., Chang, X., Zha, L., Vogel, M., Bachmann, M. F., & Mohsen, M. O. (2021). The impact of size on particle drainage dynamics and antibody response. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 331, 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.012>