

5/2/2001



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

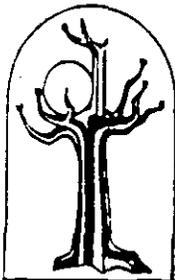
DETECCION DE EPITOPOS DE *Taenia solium* POR MEDIO DE "PHAGE DISPLAY"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
PRESENTA EL ALUMNO:
OSCAR RAMIREZ SALCEDO

L

DIRECTOR DE TESIS: DR. KARLEN GAZARIAN



BIOMEDICAS
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

270563

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Mis Padres

A Mi Hermano

1954

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A D.G.A.P.A.

A Fundación UNAM.

A los Miembros de mi Jurado:

Dr. Edmundo Lamoyi,

Dr. Pascal Herion,

Dr. Juan Pedro Laclette,

Dra. Patricia Tato;

por sus observaciones y consejos.

A mi Director de Tesis:

Dr. Karlen Gazarian;

por permitirme trabajar con él y realizar este trabajo.

Al Dr. Antonio Peña Díaz y al Dr. Georges Dreyfus; por su apoyo.

A Jorge Ramirez; por su asesoría, y por mostrarme el camino.

A mis compañeros y amigos de Biomédicas:

Octavio, Gerardo, Edgar, Óscar, Karla, Paty, Natividad, Michelle, Amaranta, Roberto, Cei, Yazmin, Daniel, Eileen, Saúl, Tatiana, Natasha y todos aquellos que, de momento, se me olvidaron.

A mis amigos no biomédicos:

Rodrigo, Arih, Hugo, Juan, Lalo, David, David, Will, Horacio y demás

FALTA PAGINA

No.

1

RESUMEN

La cisticercosis es una enfermedad provocada por el parásito *T. solium*, del cual el humano es el huésped definitivo siendo el cerdo el huésped intermediario más común; en los países subdesarrollados la cisticercosis se considera un grave problema de salud ya que las malas condiciones de salubridad en general, permiten la continuidad del ciclo de vida del parásito cuya consecuencia es la infección de humanos que consumen alimentos contaminados. La infestación del sistema nervioso por este parásito, o neurocisticercosis, presenta un cuadro clínico difícil de diagnosticar ya que la infección puede variar considerablemente (respuesta inmune, localización del parásito en el cerebro, la cantidad de parásitos, etc.).

En 1985 Young *et al.* introdujeron una metodología para la clonación de secuencias inmunoreactivas tal como antígenos de superficie de bacterias por medio de la expresión de estas secuencias, como proteínas, en placas de fago lambda, para posteriormente identificar las clonas de interés utilizando como sonda el anticuerpo adecuado. Tomando esto como base, se desarrolló una nueva técnica (William *et al.* 1994) en la cual las secuencias inmunorreactivas y la proteína expresada se encuentran físicamente unidas, esto es, la proteína es expresada en el mismo vector viral que acarrea la secuencia ("Phage Display").

En el presente trabajo se utiliza esta nueva metodología de "Phage Display" en el modelo de neurocisticercosis humana y de cisticercosis porcina, ilustrándose su posible uso para identificar y caracterizar epítomos de *T. solium*.

INDICE:

I Introducción.....	4
I.1 <i>T. Solium</i>	
I.2 Cisticercosis	
I.3 Fago Filamentoso	
I.4 "Phage Display"	
II Hipótesis.....	29
III Objetivos.....	30
IV Materiales y Métodos.....	31
IV.1 Medios de Cultivo	
IV.2 Amortiguadores y Soluciones	
IV.3 Biblioteca de Péptidos en "Phage Display"	
IV.4 Biopanning de Sueros y Fluidos Cefalorraquídeos	
IV.5 Aislamiento de Clonas Seleccionadas	
IV.6 Purificación de DNA y Determinación de Secuencia	
IV.7 Determinación de Antigenicidad de los Péptidos	
V Resultados.....	42
V.1 Manejo de Sueros	
V.2 Biopanning	
V.3 Análisis de secuencia	
V.4 Inmunorreactividad	
VI Discusión.....	56
VII Conclusiones.....	61
VIII Bibliografía	

I INTRODUCCION

El cerdo es el hospedero intermediario más común para el parásito *Taenia solium* y actúa como transmisor de la infección a humanos (Flisser *et. al.* 1994). La infección en humanos resulta frecuentemente en neurocisticercosis la cual es la patología parasitaria más importante del sistema nervioso central (Del Brutto *et. al.* 1997). Se han propuesto varios proyectos de control (Keibach *et. al.* 1989; Díaz-Camacho *et. al.* 1991) y de vacunación (Molinari *et. al.* 1993; Sciutto *et. al.* 1995; Valdez *et. al.* 1994) para esta parasitosis. Uno de los principales obstáculos para esto es la falta de conocimiento de las estructuras inmunogénicas y antigénicas del parásito, este conocimiento es necesario para el diagnóstico de la infección (lo cual ayudaría en gran medida a su control) y para el desarrollo de vacunas eficientes (Dempster *et. al.* 1996; Sciutto *et. al.* 1995). Poco es lo que se sabe actualmente de los epítomos de proteínas de *T. solium* o de otros parásitos de este tipo (Del Brutto *et. al.* 1997) que interactúan con el sistema inmune tanto en el hospedero intermediario como en el humano. Como consecuencia de esto, los ensayos de inmunodiagnóstico que se usan actualmente (Tsang *et. al.* 1989; Sciutto *et. al.* 1998; Aluja *et. al.* 1996; Ordoñez *et. al.* 1996) utilizan mezclas de proteínas del parásito. Otros problemas que interfieren con la efectividad de los métodos empleados (ELISA; Western blot) para el inmunodiagnóstico son falsos positivos para neurocisticercosis en pacientes con otros padecimientos neurológicos (Gevorkian *et. al.* 1996), una respuesta inmune al parásito variable en individuos diferentes (Ordoñez *et. al.* 1996; Aluja *et. al.* 1996) y cambios en el tipo de los antígenos expresados por el parásito durante su ciclo de vida (Aluja *et.*

al. 1996).

Desde hace algunos años se han construido bibliotecas de péptidos al azar expresados en la superficie de fagos filamentosos ("Phage Display") y se han usado para el estudio de epítomos (Permley *et. al.* 1988; Scott *et. al.* 1990; Cwirla *et. al.* 1990; Felici *et. al.* 1991). Estas bibliotecas de epítomos consisten de grandes cantidades (10^7 - 10^9 o más) de clonas de fago filamentosos, cada una de las cuales expresa un péptido de secuencia y estructura diferente, entre las cuales se pueden hallar estructuras que actúen como ligandos de proteínas reguladoras, epítomos de anticuerpos o componentes de vacunas (Keller *et. al.* 1993). La mayoría de los estudios de epítomos que utilizan el "Phage Display" han sido realizados con anticuerpos monoclonales. Estos estudios han demostrado la capacidad de esta metodología para el reconocimiento y caracterización de péptidos capaces de ser reconocidos por anticuerpos monoclonales creados contra proteínas como la β -endorfina (Cwirla *et. al.* 1990) o una interleucina (Felici *et. al.* 1991).

Algunos estudios recientes han empezado a usar esta metodología para la selección de clonas peptídicas usando anticuerpos policlonales obtenidos del suero de animales inmunizados (Dybwad *et. al.* 1995; Meola *et. al.* 1995) o de pacientes (Dybwad *et. al.* 1995). Los resultados de estos estudios, sugieren que el suero puede ser usado de manera eficiente para la selección por afinidad de ligandos a partir de una biblioteca de "Phage Display". Sin embargo, a pesar de contar con estos antecedentes, es necesario realizar estudios más extensos con el suero de pacientes, para lograr un panorama completo de las posibilidades y

limitaciones de esta metodología para el aislamiento de epítomos de importancia en la caracterización del patógeno y de los anticuerpos inducidos por este.

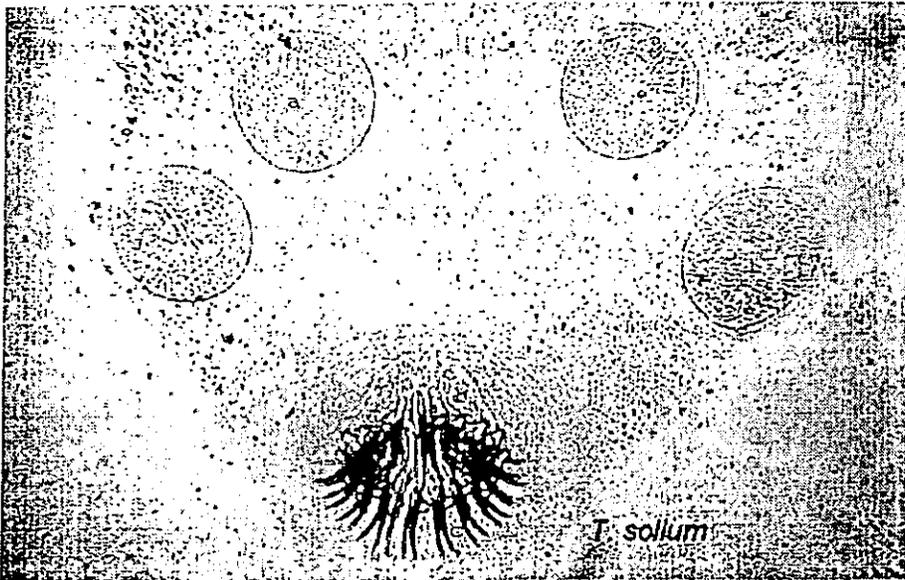
En este trabajo se utiliza el "Phage Display" en el estudio de sueros de pacientes con neurocisticercosis y de sueros de cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium* y se muestra que, al menos en el caso de la cisticercosis porcina, es posible mediante el uso de esta metodología, el aislamiento y caracterización de péptidos antigénicos útiles para el estudio de la infección por *T. solium* en el cerdo, cuyas características se describen en el presente trabajo.

1.1 *Taenia solium*

Su metacéstodo o cisticerco, es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina, el metacéstodo es la forma intermedia en el desarrollo que sigue el embrión hexacanto para convertirse en el gusano adulto o solitaria, el hombre es su único huésped natural definitivo, siendo el cerdo un huésped intermediario.

Figura 1.1.I. Escolex de *Taenia solium* donde se puede observar; A) ventosas; B) rostelum y C) doble hilera de ganchos. (Todas las imágenes relacionadas con *T. Solium* que se muestran en este trabajo fueron tomadas de la página de internet del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Missouri, Columbia)

<http://www.missouri.edu/~vmicroc/platyhelminths/cestodes/tsolium.htm>



I.1a Ciclo de Vida

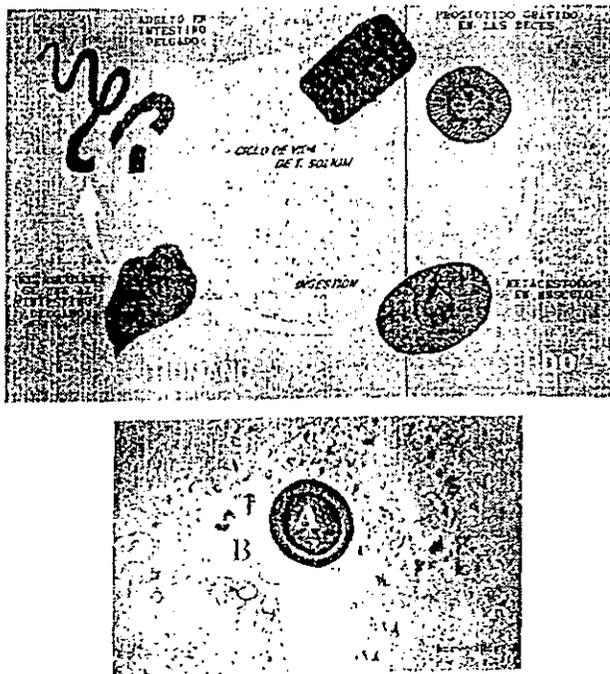
El adulto de *T. solium* o solitaria habita únicamente en el intestino delgado del ser humano, en donde logra sobrevivir hasta 25 años. El parásito se encuentra conformado por un escólex o cabeza, un cuello a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos. El conjunto de proglótidos unidos entre sí se denomina estróbilo. Los proglótidos más lejanos al cuello están totalmente diferenciados y contienen alrededor de 50 000 huevos cada uno, los proglótidos diferenciados o grávidos son desprendidos espontáneamente del parásito adulto y son eliminados hacia el exterior en las heces del huésped; la primera expulsión de huevos ocurre alrededor de 67 días post-infección. Si se ataca al parásito con un medicamento que no provoque la expulsión del escólex, la excreción de huevos se detiene de manera temporal y reaparece de nuevo al recuperarse los proglótidos del parásito (57-61 días). La putrefacción de los proglótidos diferenciados y con huevos en el medio ambiente libera los huevos que pueden alcanzar al huésped intermediario por medios distintos. Generalmente la cisticercosis se adquiere al ingerir alimentos contaminados con huevos, aunque pueden existir otros medios y mecanismos de transmisión.

En el tubo digestivo del huésped intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación de la oncosfera (embrión hexacanto) contenida en el huevecillo. Una vez activadas, las oncosferas penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos que las distribuyen al organismo en general. El embrión requiere de al menos 10 semanas para convertirse en un metacéstodo, el metacéstodo puede

sobrevivir varios años en el huésped intermediario.

El final del ciclo se da cuando el ser humano ingiere carne contaminada con el metacésto, preparada de manera inadecuada; una vez más los elementos químicos presentes en el tracto digestivo del huésped activan al metacésto y este se fija en la pared intestinal donde crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos (Noble *et. al.* 1989).

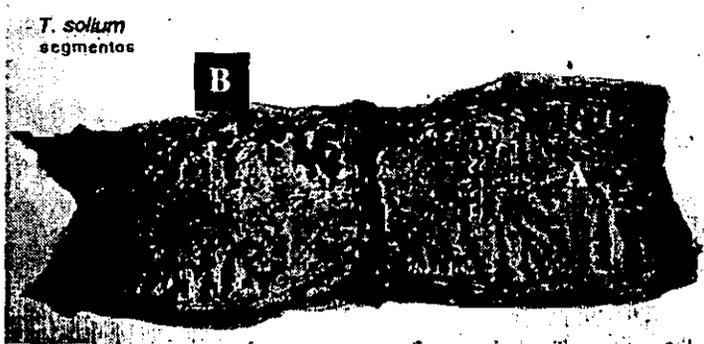
Figura I.1.II. Ciclo de vida del parásito y micrografía de huevo de *Taenia solium* donde se observa: A) oncosfera y B) embrióforo.



I.1b Morfología del Desarrollo

La solitaria, es un gusano plano de entre 1.5 y 5 m de longitud, El escólex posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos los cuales son las estructuras que le permiten a la solitaria fijarse a la pared del yeyuno.

Figura I.1.III. Micrografía de un segmento de *Taenia solium* donde se observan: A) tallo uterino y B) poro genital.



El proceso de producción de proglótidos ocurre empezando en la región distal del cuello, los proglótidos inmaduros cercanos al cuello son de tamaño variable mientras que los maduros y los que contienen huevos generalmente miden de 7 a 12 mm de largo y de 5 a 6 mm de ancho. Un proglótido maduro puede ser considerado como una unidad reproductora independiente ya que posee tanto genitales masculinos como femeninos; los genitales masculinos están constituidos por un gran número de testículos que confluyen en un ducto genital que, a su vez, desemboca por un costado del proglótido en el atrio genital; los genitales

femeninos están constituidos por un ovario trilobulado situado en la base del útero, en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca a través de la vagina en el mismo atrio genital; el útero en los proglótidos grávidos consta de varias ramas laterales hacia cada lado, repletas todas de huevos.

Los huevos presentes en los proglótidos grávidos se encuentran en varios estadios de maduración; alrededor de la mitad contienen oncosferas capaces de ser invasivas, los huevos inmaduros pueden madurar fuera del huésped y permanecer viables e infectivos por semanas o meses.

Los huevos de *T. solium* poseen varias envolturas que facilitan la sobrevivencia de la oncosfera en el medio; la envoltura más externa es el vitelo o cápsula, se encuentra constituida por un grupo de células que forman un sincicio; la siguiente envoltura es el embrioforo, formado por bloques protéicos unidos entre sí por una proteína cementante, esta envoltura es la más importante en cuanto a la protección de la oncosfera y da la apariencia estriada característica de los huevos; finalmente la membrana oncosferal rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto que tiene tres pares de ganchos (Noble *et. al.* 1989).

1.1c Metacéstodo

El metacéstodo de la *T. solium* está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido con un pequeño escólex invaginado. Al igual que la tenia adulta el escólex del metacéstodo posee cuatro ventosas y un rostelo armado con 2 hileras de ganchos. Cuando un metacéstodo es ingerido por el ser humano, el escólex es activado por el contenido del tubo digestivo lo cual produce

su evaginación y adherencia a la pared intestinal.

Ya que los céstodos carecen de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de su superficie tegumental, por lo que, el tegumento se encuentra aumentado por proyecciones digitiformes designadas como microtricas. La superficie del metacéstodo en contacto con el huésped actúa como una membrana plasmática.

Debajo del tegumento se encuentran varias capas de tejido muscular liso y las células subtegumentales. A mayor distancia de la superficie se encuentra una serie de ductos o canales aparentemente relacionados con células ciliadas que constituyen un sistema protonefridial (Noble *et. al.* 1989).

1.2 CISTICERCOSIS

Los metacéstodos en el hombre presentan un tropismo característico por músculo, ojo y sistema nervioso (Sotelo *et. al.* 1988). La cisticercosis en músculo, aun cuando es común en áreas donde la enfermedad es endémica, es una forma benigna de cisticercosis, que produce inflamación local sufriendo usualmente involución espontánea. La presencia de metacéstodos alojados en el ojo es rara y ocurre principalmente en niños (Sotelo *et. al.* 1988).

La cisticercosis afecta a hombres y mujeres de todas las edades por igual, el máximo de incidencia es entre la tercera y cuarta década de la vida (Kennedy *et. al.* 1987).

También es rara la ocurrencia de tenia intestinal en pacientes con cisticercosis (Sotelo *et. al.* 1988).

I.2a Patología de la Neurocisticercosis

La neurocisticercosis es la enfermedad parasitaria más común del sistema nervioso central (Del Brutto *et. al.* 1997).

La patología inducida por la invasión de metacéstodos al sistema nervioso central es altamente variable (Escobar *et. al.* 1972), es capaz de imitar casi cualquier otra afección del sistema nervioso central (Del Brutto *et. al.* 1997). Los principales factores involucrados en la patología de la neurocisticercosis son (Sotelo *et. al.* 1988):

- a) La respuesta inmune particular del individuo ante la invasión, que puede variar desde inmunotolerancia hasta una respuesta inflamatoria severa y edema.
- b) La localización de los parásitos en las cavidades ventriculares, espacio subaracnóideo o parénquima cerebral.
- c) El tamaño del inóculo parasitario que puede ir de un solo metacéstodo a una infestación severa.
- d) El estadio de evolución de las lesiones, desde metacéstodos vivos, edema y exudados inflamatorios, a granulomas, calcificaciones y fibrosis residuales.

En la mayoría de los casos todos estos factores se combinan y dan como resultado complejas formas clínicas. La patología secundaria tal como hidrocefalia por obstrucción, hipertensión y desplazamientos por el efecto de aumento de masa resultan en síntomas adicionales y se dan en un 30% de los casos (Salazar

et. al. 1983; Sotelo et. al. 1987).

El sistema ventricular cerebral es afectado por los metacéstodos de dos maneras, por desarrollo de endodermitis granular o por la presencia de quistes intraventriculares (Del Brutto *et. al.* 1987). Las señas y síntomas, como ya se mencionó, son altamente variables, la manifestación más común, es la epilepsia la cual sólo se presenta en la mitad de los casos. Los ataques son frecuentes cuando hay presencia de quistes parenquimales y granulomas, pero son raros con aracnoiditis o cisticercos ventriculares. La hipertensión intracraneal es frecuente en casos de cisticercosis ventricular ó meningeal, pero es rara en granulomas parenquimales. Aún cuando la cisticercosis meningeal es frecuente, las señales de irritación meningeal son muy raras. En más de un tercio de los casos de neurocisticercosis el examen neurológico es normal y la enfermedad se manifiesta clínicamente como ataques parciales, dolor de cabeza, vértigo, mareo, deterioro intelectual o perturbaciones psiquiátricas (Del Brutto *et. al.* 1987), también puede presentar manifestaciones clínicas inusuales tales como: migraña, síndrome de Parkinson, neuralgia trigeminal hemorragia subaracnoide e infarto cerebral (Del Brutto *et. al.* 1997).

1.2b Evolución de la Neurocisticercosis

Una etapa temprana en la evolución de la enfermedad es la forma vesicular de los metacéstodos, con membrana transparente (del Brutto *et. al.* 1987). En esta etapa la membrana es delgada, el líquido que contiene es claro y la larva

invaginada es de aspecto normal, así mismo, existe poca reacción inflamatoria a su alrededor. La segunda etapa es la vesicular coloidal (del Brutto *et. al.* 1987). En ella, la membrana del metacéstodo es más gruesa, el líquido en su interior es turbio y la larva deleznable; se observa el desarrollo de una cápsula de tejido conectivo alrededor del parásito con un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Existe además, infiltrado inflamatorio perivascular, gliosis moderada, signos de edema tisular, necrobiosis neuronal, e hipervascularización en el parénquima cerebral adyacente. La tercera etapa es la granular nodular, en la cual la vesícula del metacéstodo reduce su tamaño y su contenido se vuelve semisólido, incluyendo a la larva; se forman acúmulos de infiltrado inflamatorio entre la cápsula conectiva y la membrana vesicular, lo cual prácticamente despega al parásito del tejido nervioso adyacente (del Brutto *et. al.* 1987). Dicho infiltrado se introduce a la larva a través del orificio de entrada del canal espinal y posteriormente penetra por el mismo. La membrana vesicular sufre un proceso de hialinización, que posteriormente afecta a la larva. En esta etapa, se observa además depósito temprano de sales de calcio tanto en la membrana como en la larva. La última etapa es la nodular calcificada, en la cual el parásito se transforma en un nódulo sólido, calcificado y se rodea de una cápsula de tejido conectivo denso. En esta etapa se observan macrófagos y células gigantes de cuerpo extraño rodeando al parásito; la gliosis perilesional puede ser intensa (del Brutto *et. al.* 1987).

Dependiendo de la localización de los parásitos dentro del sistema nervioso central, se distinguen varias clasificaciones de neurocisticercosis:

-Neurocisticercosis Parenquimal: En este caso, los metacéstodos normalmente se encuentran en áreas del cerebro con una alta presencia vascular, aunque no hay parte del cerebro que se encuentre exenta de infestación. El número de parásitos varía de uno aislado a pocos cientos (Sotelo *et. al.* 1987). Las manifestaciones clínicas usualmente incluyen ataques, déficits neurológicos focales, deterioro intelectual y perturbaciones mentales (Sotelo *et. al.* 1985). El diagnóstico depende principalmente de una tomografía computarizada y del análisis de líquido cerebroespinal (Sotelo *et. al.* 1988), aún cuando este último ocasionalmente es normal. En estos casos, antes de planear la terapia es necesario determinar la viabilidad de los metacéstodos y el grado de respuesta inmune del parásito.

-Neurocisticercosis Subaracnoidea: En este caso es posible encontrar a los metacéstodos en forma activa o inactiva. La forma activa causa invariablemente aracnoiditis la cual es más marcada en las meninges basales; usualmente se presenta hidrocefalia, de manera secundaria a una oclusión inflamatoria. Otras manifestaciones de este padecimiento son infartos cerebrales múltiples, secundarios a anginitis de las arterias pequeñas, atrofia óptica, y defectos en el campo visual debidos a aracnoiditis optoquiasmática ó cisticercos selares. Los síntomas asemejan los de un tumor ya que son inducidos por cúmulos de metacéstodos. La neurocisticercosis aracnoidea normalmente se asocia con cambios inflamatorios en el líquido cerebroespinal y reacciones inmunológicas positivas a cisticercosis (Sotelo *et. al.* 1987).

-Neurocisticercosis Intraventricular: El sistema ventricular es afectado por los metacéstodos de dos maneras diferentes: el desarrollo de metacéstodos

intraventriculares o de ependimitis granular. Los metacéstodos intraventriculares usualmente se alojan en el cuarto ventrículo aunque también pueden ser hallados en el tercero y los ventrículos laterales. La ependimitis usualmente ocurre en el acueducto de Silvio ó en la foramina de Monroe. Una hidrocefalia interna ocurre en ambas condiciones secundaria a la obstrucción de la circulación del líquido cerebroespinal (Sotelo *et. al.* 1987).

-Neurocisticercosis Espinal: este padecimiento ocurre en forma leptomenígea e intramedular, ambas son raras siendo la leptomenígea la más común de las dos. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas y el diagnóstico diferencial incluye tumores de la espina dorsal, e incluso desórdenes degenerativos. El diagnóstico puede ser muy difícil si se basa sólo en la información clínica. El análisis de líquido cerebroespinal junto con la mielografía y la tomografía computarizada confirman el diagnóstico (Sotelo *et. al.* 1987).

1.2c Diagnóstico y Tratamiento de la Neurocisticercosis

El diagnóstico actual de la neurocisticercosis se basa principalmente en la tomografía computarizada y la resonancia magnética nuclear, la detección por métodos inmunes es confirmatoria más que decisiva (Correa *et. al.* 1989).

Desde principios de este siglo, se han empleado métodos inmunológicos para el diagnóstico de la neurocisticercosis. La técnica de fijación del complemento se estandarizó en Brasil en 1911 por Moses (Flisser *et al.* 1994). La prueba de fijación del complemento es relativamente complicada ya que es necesario estandarizar frecuentemente varios reactivos, además no es específica en suero, por lo que únicamente se puede emplear líquido cefalorraquídeo (Flisser *et. al.*

1994). La inmunolectroforesis (IEF), es una técnica que se basa en la separación de los componentes protéicos de la mezcla antigénica según su carga eléctrica y la reacción posterior con anticuerpos en un medio semisólido de tal manera que cada reacción antígeno-anticuerpo precipita formando un arco. Esta técnica permitió identificar al antígeno B como el más frecuentemente reconocido por los anticuerpos séricos de los enfermos de neurocisticercosis y a otras siete bandas antigénicas con diferentes movibilidades electroforéticas y de menor frecuencia de reconocimiento (Flisser A. *et. al.* 1980). Las principales ventajas de la IEF son que la técnica es sencilla, emplea un extracto crudo de metacéstodos de fácil obtención y permite reconocer reacciones cruzadas; sin embargo, es poco sensible por lo que no se puede emplear líquido cefalorraquídeo y sólo se detectan anticuerpos séricos en el 44% de los enfermos con neurocisticercosis (Flisser *et. al.* 1980). El ELISA ya sea con antígeno B o con extracto crudo tiene similar sensibilidad y especificidad, ambos antígenos permiten discernir claramente a los pacientes con neurocisticercosis (Espinoza *et. al.* 1986). Con esta técnica es posible detectar anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo aún con mayor eficiencia que en el suero. La desventaja más notable del ELISA es que no es útil para valorar muestras de población abierta, ya que en ensayos con sueros de enfermos con otras parasitosis se obtiene reacciones cruzadas (Espinoza B. *et. al.* 1986). Sin embargo, el uso de ELISA con líquido cerebroespinal es altamente confiable para la detección de todas las formas de neurocisticercosis activa (Rosas *et. al.* 1986). La inmunolectrotransferencia (IET), mejor conocida como "western blot", permitió superar el problema de la reactividad cruzada del

ELISA sin afectar la sensibilidad (Flisser *et. al.* 1994). Este método emplea una fracción enriquecida en glicoproteínas que se obtiene al purificar un extracto crudo de metacéstodos por cromatografía con lentil lecitina. Las glicoproteínas de esta fracción se separan por electroforesis en acrilamida y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, la cual se corta en tiras de tres milímetros. Cada tira se incuba con una muestra de suero o líquido cefalorraquídeo y, por un ensayo inmunoenzimático similar al ELISA se revelan de una a siete bandas específicas para la cisticercosis humana (Tsang VWC. *et. al.* 1989; Feldman M. *et. al.* 1990). Esta técnica tiene una sensibilidad cercana al 100% en cuanto a la cisticercosis se refiere, lo cual indica que es ideal para el diagnóstico, excepto por la dificultad metodológica que implica y el costo que es más de tres veces superior al de un ensayo de ELISA (Plancarte *et. al.* 1993). Otro inconveniente de esta técnica es el reportado por Landa *et. al.* (1994) que muestra en sus estudios la posible presencia de moléculas del hospedero en la fracción de glicoproteínas.

De acuerdo a otros autores (Del Brutto *et. al.* 1997), la mayoría de las pruebas inmunológicas desarrolladas para el diagnóstico de la neurocisticercosis carecen de la sensibilidad y especificidad necesarias, existe la presencia de falsos positivos dada por la exposición al parásito adulto o reacciones cruzadas con otros helmintos (Del Brutto *et. al.* 1997) y de falsos negativos debida a una producción local de anticuerpos en el sistema nervioso central sin un incremento paralelo de los anticuerpos en los sistemas periféricos (Del Brutto *et. al.* 1997). La tomografía computarizada también se encuentra sujeta a errores, ya que las lesiones provocadas por un granuloma de cisticercos, pueden imitar a varias

enfermedades infecciosas, vasculares o neoplásicas del sistema nervioso central, tales como: toxoplasmosis, tuberculomas, abscesos piogénicos, angiomas cavernosos y tumores cerebrales primarios o metastásicos (Del Brutto *et. al.* 1997). Así mismo se han encontrado discrepancias entre el diagnóstico obtenido por tomografía computarizada y el obtenido por Western blot (García *et. al.* 1994). Se puede decir que la introducción de técnicas inmunológicas modernas aunado a los métodos de tomografía computarizada han incrementado la precisión diagnóstica de la neurocisticercosis (Del Brutto *et. al.* 1997), sin lograr hasta el momento hacerla infalible, además de que los métodos más sofisticados para el diagnóstico, no siempre se encuentran disponibles en los lugares del mundo donde esta enfermedad es endémica (Preux *et. al.* 1996).

Hasta la década pasada no existía un tratamiento farmacológico específico para la neurocisticercosis, la cirugía y los esteroides eran las únicas alternativas para este padecimiento. El Praziquantel, una isoquinoleina, fue la primera droga que mostró eficacia en el tratamiento de la neurocisticercosis (Sotelo J. *et. al.* 1984, 1985). Pero, estudios posteriores han demostrado que posee un efecto comutagénico con varios mutágenos y carcinógenos (Montero *et. al.* 1997). Más recientemente se ha usado otra droga en el tratamiento de la neurocisticercosis, el albendazol, que da un 97% de reducción en el número de quistes (Escobedo *et. al.* 1988).

I.3 FAGO FILAMENTOSO

I.3a Características del Fago

Existen tres tipos de fagos filamentosos: fd, f'y M13. Tienen forma de fibras largas (900 x 6 nm) que acomodan un DNA circular de cadena sencilla de alrededor de 6408 nucleótidos. El virión se conforma de 2000 copias de una proteína de cubierta pequeña (5.2 kDa) arreglada como hélice alrededor del DNA del fago, y una proteína de unión (42 kDa). La inclinación de la hélice es de 1.5 nm con 9 unidades protéicas cada 2 vueltas, su espesor es de 3.5 nm. Los fagos filamentosos infectan a bacterias masculinas al unirse al pili, no son líticos ni impiden la reproducción de la bacteria hospedera, simplemente desvían sus recursos metabólicos hacia su propia replicación y hacen más lentos los procesos de la bacteria.

En el caso del fago M13 (que es el usado para las bibliotecas de "Phage Display") el virión es capaz de aceptar 40, 000 nucleótidos extra dentro de su genoma sin que esto afecte su infectividad, simplemente se arma un virión más largo para acomodar el excedente de DNA.

1.3b Ciclo Replicativo

El ciclo infectivo del fago se inicia con su unión, por medio de la proteína pIII (producto del gen III), al pili de la bacteria. Debido a su adaptación para interactuar con estructuras externas al fago, esta proteína es adecuada para la expresión (display) de péptidos extraños. La parte C-terminal de pIII se encuentra insertada en uno de los extremos de la cubierta del fago (4 o 5 copias), la parte N-terminal se une al pili; una vez dada esta unión, el fago es atraído a la superficie

de la bacteria, las proteínas de la cápside se disocian en la membrana interna y el DNA del virus, que es circular y de cadena sencilla, entra a la bacteria. Una vez dentro, el DNA es convertido a una forma de cadena doble (forma replicativa) por medio de la acción combinada de la polimerasa de RNA de la bacteria y la maquinaria de síntesis de DNA bacterial y no requiere de la participación de ninguna de las proteínas codificadas por el genoma viral. La molécula inicial de DNA de cadena doble sirve como templado para la replicación, transcripción y síntesis de proteínas y todos los genes virales son expresados inmediatamente. Una de las proteínas expresadas por el fago (gen II) hace un corte específico en la cadena (+) del DNA de doble cadena y el extremo 3' resultante es elongado por la maquinaria de síntesis de DNA de la bacteria hasta que alcanza el doble de la longitud unitaria, la cadena desplazada es cortada y circularizada de forma concertada para dar una cadena sencilla de DNA circular y conservar la molécula original de DNA circular de doble cadena. El proceso de ensamblaje de virus inicia con el acumulamiento del producto del gen V (pV) el cual es una proteína de unión a DNA de cadena sencilla que se acumula a lo largo del proceso y que secuestra al DNA recién sintetizado, impidiendo la generación de más DNA en forma replicativa y lo moviliza hacia la membrana de la bacteria donde se da el ensamblaje del virus maduro debido al intercambio de pV que cubre al DNA por el producto del gen VIII (pVIII) el cual se acumula insertado en la membrana por medio de una pequeña cola hidrofóbica la cual pierde al intercambiarse por pV y empezar a cubrir al DNA, este mismo proceso de sustitución excreta el virus hacia el exterior de la membrana al mismo tiempo que se agregan los demás

componentes del virus maduro que son el producto del gen III que es la proteína de unión al pili y los productos de los genes VI, VII y IX que forman la punta del otro extremo del virus maduro. El control metabólico de la producción de virus se da por competencia entre el producto del gen II que induce la forma replicativa y el producto del gen V que secuestra al DNA de cadena sencilla para formar virus maduros.

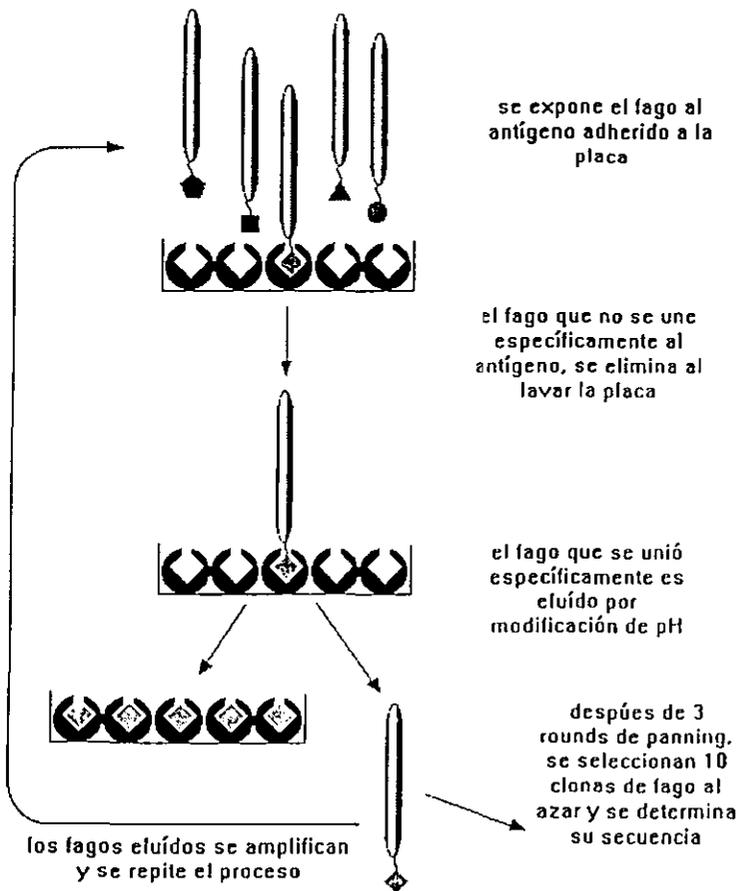
1.4 "PHAGE DISPLAY"

1.4a Principios de Expresión de Péptidos

Los métodos basados en la unión física de los organismos que expresan proteínas y los vectores de DNA para la clonación de secuencias inmunoreactivas, conocidos como técnicas de expresión de péptidos, comprenden la clonación de secuencias que se expresan como péptidos o proteínas fusionados a una proteína acarreadora, expresados y expuestos ("display") en la superficie externa de un microorganismo. La proteína de superficie es inmunorreactiva, y el DNA es incluido dentro del microorganismo. Las clonas de interés se aíslan por medio de purificación por afinidad ("panning") del péptido expresado usando una matriz de anticuerpo inmovilizado o de la proteína de unión correspondiente. Debido a que esta metodología permite, de una manera eficiente, aislar microorganismos individuales de una compleja mezcla, posibilita la inspección de una gran cantidad de clonas. Los más avanzados de estos sistemas de expresión de péptidos, utilizan la fusión de péptidos a las proteínas de cubierta de fagos filamentosos ("Phage Display"). Esta metodología desarrollada en 1985 empleó la proteína

menor de superficie, pIII, como vehículo de expresión (Smith *et. al.* 1985.; Parmley *et. al.* 1988). Este método ha encontrado su mayor utilidad en la creación de grandes bibliotecas de secuencias de péptidos al azar; ya sean péptidos cortos fusionados azarosamente o segmentos cortos de péptidos más largos (ver sección 1.4b).

Figura 1.4.I: Esquema general que muestra el funcionamiento básico del proceso de "biopanning" del "Phage Display"



I.4b Expresión de Péptidos en Fago ("Phage Display")

Los fagos filamentosos tienen varias propiedades que los hacen buenos candidatos para su uso como vectores de expresión de péptidos. Se encuentran muy bien caracterizados, son fáciles de manejar, y la superficie del virión es de baja complejidad. Rutinariamente se utilizan tres variaciones del sistema de "phage display". El sistema original que usa a pIII como proteína de fusión contiene al oligonucleótido clonado insertado cerca del extremo 5' del gene III en el genoma del fago. Los péptidos codificados por el oligonucleótido son expresados en fusión junto al extremo N-terminal de pIII y ensamblados en la superficie de las partículas de fago donde se encuentran disponibles para unirse al ligando (anticuerpo, receptor, etc.). Todas y cada una de las cuatro o cinco copias de pIII en el virión contienen una copia del péptido fusionado.

Una variación de este sistema utiliza un vector para fago que contiene al gene III y sitios de clonación para oligonucleótidos. Usualmente el promotor para pIII es reemplazado con un promotor inducible para permitir su expresión controlada. El gene III silvestre y otros productos que el fago requiere, son proporcionados por un fago "ayudador" y el número de péptidos expresados en cada partícula puede variar de cero a cinco por medio el control del número relativo de fagos "ayudadores" y plásmidos modificados (Dower *et. al.* 1994).

Otro sistema utiliza como vector la proteína de cubierta pVIII, aún cuando en este caso el número de copias del péptido por fago es mucho mayor, el tamaño de los péptidos que pueden ser expresados está limitado a seis residuos o menos. Como en el caso de pIII existe un sistema alternativo que utiliza un vector para fago con una

pVIII modificada y un fago ayudador que proporciona pVIII normal, con esta variación, es posible expresar péptidos más largos en pVIII, pero, se reduce el número de copias por fago y el manejo del sistema se hace más complicado (Dower *et. al.* 1994).

I.4c "Phage Display" en pIII

El sistema de "Phage Display" usando como vector a la proteína pIII es el más sencillo. En este sistema es posible evitar los pasos de inducción de pIII y el uso de un fago ayudador. Las bibliotecas de pIII son normalmente de entre 10^8 y 10^9 péptidos diferentes de 6 hasta 20 residuos de longitud.

Existen dos sitios de pIII que pueden ser usados para la fusión del péptido, uno de ellos es el espaciador flexible entre los dos dominios de pIII, el otro es el extremo N-terminal. Es posible expresar en fago, péptidos con estructura secundaria y terciaria tal como fragmentos de anticuerpos, lo que permite construir repertorios de regiones variables sin necesidad del uso de hibridomas o inmunización. Los repertorios de genes variables son obtenidos de una población de linfocitos, o ensamblados *in vitro*. Posteriormente son clonados para su expresión como dominios variables de cadena pesada y cadena ligera asociados en la superficie de fago. Las estructuras específicas son localizadas en el repertorio por su unión a un antígeno.

De acuerdo con los experimentos realizados hasta la fecha, el "phage display" es capaz de realizar un proceso de selección tan preciso como la selección inmune. Los péptidos expresados en fago pueden ser aislados por unión directa a

anticuerpos en fase sólida (Smith *et. al.* 1985) y también por unión a un anticuerpo biotinilado en solución, el cual es posteriormente capturado con estreptavidina en fase sólida. De la misma manera, fagos que expresen fragmentos de anticuerpos pueden ser aislados por su unión a antígenos en placa de ELISA, columnas de purificación o a antígeno biotinilado en solución. Los fagos atrapados en fase sólida son lavados y eluidos por un hapteno soluble, ácido o álcali. Un fago en particular puede ser enriquecido (aumento del número de clones de un fago con el mismo epítipo) de 20 a 1000 veces en una sola reacción de selección.

1.4d Mimetismo de Epítopos: mimotopos

Por medio de la selección de péptidos individuales de una biblioteca de "phage display" usando anticuerpos presentes en el suero de individuos enfermos (Folgori *et. al.* 1994), es posible identificar y caracterizar péptidos que reaccionan de manera específica con el suero de individuos enfermos pero no con el de individuos sanos y que están relacionados con la enfermedad. En el caso de enfermedades infecciosas, esta estrategia permite discernir parte de la información dejada por el patógeno en el sistema inmune del paciente. Esta información no se encuentra normalmente disponible al estudiar el patógeno ya que el sistema inmune reacciona con los antígenos de una forma compleja que tiene que ver con procesamiento y presentación. Una de las consecuencias de la interacción del sistema inmune con un patógeno es la producción de anticuerpos, los péptidos relacionados a la enfermedad obtenidos de la biblioteca de "phage display" podrían en principio, ya que fueron seleccionados por los mismos

receptores, inducir una reacción en el sistema inmune, que imite a la del antígeno original. Esta teoría ha sido probada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (Meola, A. *et. al.* 1995), con el que se ha visto que péptidos expresados en fago, específicos para dicho antígeno, son capaces de originar anticuerpos contra el antígeno original. Dado que estos péptidos expresados en fago son capaces de inducir una respuesta inmune imitando al antígeno original, sin tener la misma secuencia de aminoácidos, se definen como mimotopos.

II HIPOTESIS

Tomando en cuenta los recientes trabajos publicados que utilizan el sistema de "Phage Display" para el aislamiento, identificación y caracterización estructural de epítomos específicos relacionados con algún padecimiento (Dybwad *et. al.* 1993, 1995; Felici *et. al.* 1993; Du Plessis *et. al.* 1994; Veronese *et. al.* 1994; Jellis *et. al.* 1993; Sioud *et. al.* 1994; Hodits *et. al.* 1995; Keller *et. al.* 1993), o para la disección de epítomos de ligandos o receptores de moléculas de importancia biológica y su caracterización (Koivunen *et. al.* 1994; Doorbar *et. al.* 1994; Petersen *et. al.* 1995; Barret *et. al.* 1992; Stephen *et. al.* 1995; Luzzago *et. al.* 1993). Creemos que el "Phage Display" es un sistema por el cual es posible caracterizar epítomos de relevancia en la cisticercosis porcina y la neurocisticercosis humana, aún cuando en este caso se está trabajando con un suero policlonal y un antígeno altamente complejo, tal como es un parásito multicelular altamente especializado como *T. solium*.

III OBJETIVOS

- 1) Adecuar las técnicas existentes de "Phage Display" para el modelo particular de la cisticercosis porcina.
- 2) Obtener clonas de fago reconocidas de manera específica por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes de neurocisticercosis y cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*.
- 3) Caracterizar las clonas obtenidas y comparar su secuencia de aminoácidos con una base de datos de proteínas de *T. solium*.
- 4) Caracterizar la antigenicidad de las clonas obtenidas y caracterizadas para identificar aquellas que más probablemente sean mimotopos de los antígenos de *T. solium*.

IV MATERIALES Y METODOS

IV.1 MEDIOS DE CULTIVO

LB (Luria Bertani):

Triptona 1%; Extracto de levadura 0.5%; NaCl 1%. Para solidificar se añade Agar 1.5%.

2 x YT:

NaCl 1%; Extracto de levadura 1%; Triptona 1.6%.

Agarose Top:

Triptona 1%; Extracto de levadura 0.5%; NaCl 0.5%; MgCl₂ 0.1%; Agarosa 0.7%.

IV.2 AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES

TBS pH 7.5:

NaCl 150 mM; TRIZMA-base 1.18g/l; TRIZMA-HCl 6.35g/l.

PEG/NaCl 40%:

NaCl 5M; PEG(8000) 400g/l.

Gel de Agarosa:

Agarosa 0.5 g + 49 ml H₂O, se hierve y se añade 1ml TAE 50x + 8 µl bromuro de etidio 1.0%.

TAE 0.04M pH 8.0 (50x):

Tris 242g/l; CH₃COOH glacial 57.1 ml/l; EDTA 0.5M 100ml/l.

TBE pH8.0:

Tris 54 g/l; Acido Bórico 27.5 g/l; EDTA 0.5M 20 ml/l.

Gel de Acrilamida Para Secuencia de DNA (6%):

Urea 33.6 g; Stock de Poliacrilamida (40%) 11.6 ml; TBE 5x 16.0 ml; H₂O 28.0 ml

Esta mezcla se filtra con papel filtro y se degasifica usando el vacio local. Para solidificar se añade a la mezcla anterior: persulfato de amonio (10%) 640 µl; TEMED (0.1 mg/µl de H₂O) 16 µl.

PBS (10x) para panning:

Na₂HPO₄ 6.1 g/l; KH₂PO₄ 1.9 g/l; NaCl 80.0 g/l; KCl 2.0 g/l.

Amortiguador de Yoduro:

10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA; 4 M NaCl.

Amortiguador de Dietanolamina al 10% pH 9.8:

Dietanolamina 100 ml; MgCl₂ 6H₂O 102 mg; NaN₃ 0.40 gr.; se ajusta al pH deseado con HCl; H₂O c.b.p. 1 L.

Amortiguador de Elución:

0.1 N HCl-glicina, pH 2.2

IV.3 BIBLIOTECA DE PEPTIDOS EN "PHAGE DISPLAY"

Para la realización de los experimentos descritos en este trabajo, se utilizó una biblioteca de "Phage Display" del tipo pIII, esto es, el péptido artificial de siete residuos se encuentra unido a la región N-terminal de la proteína III de la cápside del fago, hay de 1 a 5 copias por fago, no requiere de un fago ayudador para ser infectiva. Esta biblioteca fue adquirida comercialmente de la compañía BioLabs (PhD.-7 TM. New England, USA., lotes 1.5 y 2.0) con las siguientes

especificaciones: La biblioteca consiste de 2×10^9 diferentes clonas de fago, cada una de las cuales presenta un péptido de 7 aminoácidos diferente. La biblioteca fue amplificada por el fabricante para obtener 10^2 copias de cada clona individual (título final 10^{11} clonas). El procedimiento de panning se realizó esencialmente siguiendo las indicaciones del fabricante.

IV.4 "BIOPANNING" DE SUEROS Y LIQUIDOS

IV.4a Inmunización de Cerdos y Preparación de Suero; Obtención de líquidos

Se utilizaron cerdos de raza mezclada (Landras-Durock, Landras-Spot) de una granja porcícola tecnificada, los cuales no tenían antecedentes de teniasis o cisticercosis. Los cerdos fueron infectados con huevos de *T. solium* obtenidos de enfermos de teniasis que se encontraban siguiendo un tratamiento con niclosamid (Yomesan, Bayer). Los huevos fueron aislados de los segmentos grávidos del parásito y un número controlado de huevos viables fueron dados en el alimento a cerdos como ha sido descrito (Atuja de *et. al.* 1996) . Un mes después de la última inoculación, las lenguas de los animales fueron inspeccionadas para confirmar la infección. Los sueros fueron preparados por un proceso estándar y el título de anticuerpos fue determinado para cada suero por medio de ELISA. El suero de un cerdo no infectado fue usado como control .

Los líquidos cefalorraquídeos se obtuvieron de pacientes del Instituto de Neurología usándose como control líquidos de pacientes con neurocisticercosis no confirmada, esto es, que presentaban trastornos neurológicos atribuibles a la

neurocisticercosis pero cuya tomografía computarizada no mostraba indicios de presencia de metacéstodos (todo el proceso de infección de los cerdos y obtención de los sueros y líquidos fue realizado por el grupo de la Dra. Edda Sciutto).

IV.4b Proceso de Biopanning

El Biopanning (cromatografía de afinidad) con los sueros y líquidos cefalorraquídeos fue realizado siguiendo el siguiente esquema (Dower *et. al.* 1994):

- 1) Biopanning: los sueros y líquidos fueron diluidos 1:100 en PBS para su uso, posteriormente se añadieron a placas de poliestireno de 96 pozos (Inmulon 4 flat bottom plates) poniéndose 50 µl por pozo, utilizándose 6 pozos para cada suero o líquido. Los sueros se dejaron incubar a 4 °C toda la noche con agitación suave. Se lavaron los pozos 5 veces con PBS-tween 20 0.1%, añadiendo 200 µl por pozo y dejándolo 1 min. Se procedió a bloquear los pozos con PBS-BSA 1% usando 350 µl por pozo. Se incubó para el bloqueo a 37 °C por 1hr. Se repitieron los lavados. Se añadieron los fagos de la biblioteca diluidos 1:60 en PBS-BSA 0.1% (10^{10} clonas diferentes de fago) a cada pozo usando 100 µl por pozo. Se incubó a 4 °C por 2 hr con agitación. Se repitieron los lavados. Después de los lavados se incubó con PBS-BSA 0.1%, 350 µl por pozo a 4 °C por 30 min. Se repitieron los lavados.
- 2) Elución del Fago: A los pozos en los que se realizó el "biopanning", se le añadió 100 µl del amortiguador de elución incubándose a temperatura

ambiente 10 min. Los 6 eluidos de cada suero o líquido se recuperaron, se acumularon en un solo tubo usando microcentrífuga y fueron neutralizados con 35 µl de TRIS base 2M.

- 3) Titulación: Para determinar el número de clonas recuperadas después del proceso de "biopanning" y elución se hicieron 2 diluciones de fagos inoculando en 200µl de LB con *E. Coli* (cepa ER 2537 BioLabs; cultivo de toda la noche) a una dilución de 1:20 y 1:200, se dejó incubando 3 min. a temperatura ambiente y se transfirieron esos 200 µl a 4 ml de agarose top fundido (40 °C) y de ahí a una caja petri con LB sólido donde se dejó incubando toda la noche. Después de la incubación se contaron las unidades formadoras de placa para determinar el número de clonas de fago recuperadas.
- 4) Amplificación: Posterior a la titulación de las clonas de fago, se procedió a amplificarlas usando una dilución 1:100 de un cultivo saturado de *E. coli* en 2 x YT en 50 ml de 2 x YT al cual se añadió el total del eluido obtenido en el "biopanning" y se dejó incubando a 37 °C con agitación durante toda la noche.
- 5) Precipitación del Fago: Después de la incubación toda la noche, se centrifugó el cultivo con fago 10 min. a 10,000 r.p.m. (12,000 g) a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió ¼ de volumen de PEG/NaCl 40%, se dejó a 4 °C toda la noche. Después de la incubación se centrifugó de nuevo 15 min. a 10,000 r.p.m. (12,000 g) a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 1 ml de TBS. Después de resuspender se centrifugó en microfuga (eppendorf) a 14,000 r.p.m. (14,000 g) por 5 min. El sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo y se le añadió ¼ de volumen de PEG/NaCl 40% incubándose en hielo 60 min. se

centrifugó en microfuga (eppendorf) a 14,000 r.p.m. (14,000 g) 10 min. a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 300 µl de TBS + NaN₃ 0.02%. Se centrifugó una vez más en microfuga 1 min. y se trasladó el sobrenadante (fago purificado) a un tubo eppendorf limpio. Una vez purificado, se almacenó en refrigerador hasta volverse a usar para "biopanning". De este stock de fago purificado se volvió a hacer titulación para asegurar que se estuviera usando la misma cantidad de fago para cada experimento de "biopanning", esta titulación se llevó a cabo de la misma manera que la ya descrita con una modificación, la dilución aumentó a 1:10⁸ y 1:10⁹.

Esta estrategia general de "biopanning" se repitió 3 veces para cada suero o líquido usándose en la segunda y tercera vez los fagos eluidos y amplificados del "biopanning" anterior. Después de la tercera reacción de "biopanning" las clonas no se amplificaron sino que se procedió a usar el eluido para aislamiento de clonas particulares.

IV.5 AISLAMIENTO DE CLONAS SELECCIONADAS

Posterior al proceso de "biopanning" (tercera reacción) se procedió a seleccionar 10 clonas individuales de fago de cada uno de los "biopanning" con los sueros o líquidos, para posteriormente proceder a determinar la secuencia del péptido expresado en cada clona y caracterizarlos. El proceso de aislamiento de las clonas particulares se llevó a cabo según el siguiente esquema (Dower *et. al.* 1994):

1) Después de terminar la tercera reacción de "biopanning" no se amplificaron los eluidos obtenidos. De las 10^7 - 10^8 unidades formadoras de placa recuperadas de la reacción de "biopanning" se hizo una dilución 1:1,000 y se inoculo 1 μ l en 200 μ l de LB con *E. Coli* (cepa ER 2537; cultivo de toda la noche) se dejó incubando 3 min. a temperatura ambiente y se transfirieron esos 200 μ l a 4 ml de agarose top fundido (40 °C) y de ahí a una caja petri con LB sólido donde se dejó incubando toda la noche. Después de la incubación toda la noche, se picaron placas individuales de la caja de LB-agarose top y se procedió a amplificarlas individualmente siguiendo el esquema general de amplificación descrito en "biopanning". Se realizó posteriormente el proceso de precipitación del fago, para purificarlo como se describe en "biopanning". Del cultivo de toda la noche para amplificar las clonas individuales también se tomo 1 ml para purificación de DNA el cual se usó para determinación de secuencia de las clonas individuales.

IV.6 PURIFICACIÓN DE DNA Y DETERMINACION DE SECUENCIA

Del cultivo de toda la noche para amplificar las clonas individuales se tomó 1 ml para purificación de DNA y determinación de secuencia siguiendo el siguiente esquema (Dower *et. al.* 1994):

1) Purificación de DNA: A la muestra de 1 ml del cultivo de toda la noche se añadieron 250 μ l de PEG/NaCl 40%, se mezcló y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó 10 min. en microfuga a 14,000 r.p.m. (14,000 g), se resuspendió el precipitado en 100 μ l de amortiguador de

Yoduro y se le añadió 250 µl de etanol. Se incubó 10 min. a temperatura ambiente se centrifugó de nuevo a 14,000 r.p.m. (14,000 g) por 10 min. se lavó el precipitado con etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo a 14,000 r.p.m. por 4 min.; se resuspendió el precipitado en 30 µl de agua destilada estéril y se almacenó en el congelador a -20 °C. Para determinar la efectividad del proceso de purificación de DNA, se tomó 1 µl de la solución final en agua de cada una de las clonas individuales y se corrieron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se vieron las bandas esperadas para cada clona individual.

- 2) Determinación de Secuencia: La reacción de determinación de secuencia se realizó siguiendo el protocolo del kit de secuenciación de Amersham (T7 Sequenase, _{v. 2.0}; T7 sequenase Quick-denature plasmid sequencing kit. Amersham LIFE SCIENCE). Brevemente, se realizó para cada clona individual una reacción de secuenciación con dideoxinucleótidos usando la secuenasa T7 utilizando iniciadores específicos para la región de inserción del péptido.
- 3) Comparación de secuencia: Una vez determinada la secuencia particular de aminoácidos del péptido de cada clona individual de fago, se procedió a comparar cada secuencia contra una base de datos de proteínas de *Taenia*. Para este fin, se usó el programa de cómputo GCG versión 9.1 para UNIX (Genetics Computer Group Inc. Una subsidiaria del Oxford Molecular Group). Por medio de la función de FASTA del programa, se hizo una búsqueda de similitud entre cada secuencia y la base de datos de proteínas con el algoritmo de Pearson y Lipman. A partir de aquí se seleccionaron aquellos

péptidos que, por su similitud de secuencia con proteínas relevantes de *Taenia*, fueran buenos candidatos para ser epitopos.

IV.7 DETERMINACION DE LA ANTIGENICIDAD DE LOS PEPTIDOS

Una vez caracterizados los péptidos y hecha la comparación de secuencia, se procedió a tomar las clonas individuales que fueron consideradas buenas candidatas para ser antigénicas y se realizó con estas clonas un experimento de antigenicidad de la siguiente manera:

- 1) **ELISA de Fago:** Esta técnica esta basada en lo descrito por Anne Dybwad *et. al.* (1993). En una placa de 96 pozos marca Nunc (F96 Cert. Maxisorp; Nunc-Immuno plate) se añadieron 10^9 - 10^{10} fagos de cada clona seleccionada diluidos en PBS-BSA (50 ng por pozo), usando tres pozos para cada clona (triplicados). Se incubaron toda la noche a 4 °C. Después de la incubación se lavó la placa con PBS-tween 20 0.3% dejando los lavados 5 min.; se bloqueó la placa con PBS-BSA 0.5% durante 1 hr. a 37 °C. Se lavó. Se añadieron los sueros o líquidos respectivos para cada clona a los pozos, diluidos 1:100 en PBS-Tween 20 0.2%-BSA 0.2% y se incubaron 1 hr. a 37 °C. Se lavó. Se añadió el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina diluido de acuerdo a la recomendación del fabricante en PBS-Tween 20 0.2%-BSA 0.2%. Se lavó. Se aplicó el sustrato para fosfatasa alcalina (p-Nitrofenil fosfato; SIGMA) diluido en amortiguador de dietanolamina usando 100 µl por pozo. Se dejó que reaccionara la fosfatasa alcalina con el sustrato a 37 °C y se midió la absorbancia de cada pozo a los 10 min. y a los 30 min. en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Humareader; Humanco) a 405 nm, con un diferencial de 630 nm. Los resultados se consideraron como positivos si $As-Ab > 0.2$; donde As es la absorbancia del suero uniéndose a pozos

cubiertos con fago y A_b es la absorbancia del suero en pozos sin fago. Además la reactividad del suero contra un fago no seleccionado debería de ser menor que contra uno de los fagos seleccionados. Para comprobar si las clonas reaccionaban de manera específica con los sueros, se compararon los resultados de este experimento contra los resultados de un experimento en el que se usó en lugar de los sueros o líquidos específicos (infectados), sueros o líquidos normales (no infectados)

V RESULTADOS

V.1 MANEJO DE SUEROS

V.1a Sueros de Cerdo Infectados Experimentalmente con Huevos de *T. solium*.

Datos de ELISA obtenidos de los sueros de los cerdos usados para los experimentos descritos en este trabajo (C1, C4, C33, C36) muestran la existencia de altos (C1, C4) y moderados (C32, C36) niveles de reactividad con los antígenos totales de *T. solium* y *T. crassiceps* (esta última presenta un alto nivel de reacción cruzada con *T. solium* lo que le hace útil para este estudio (Larralde *et. al.*, 1990). Se utilizó el suero de un cerdo no infectado (G10) como control.

V.1b Sueros de Pacientes con Neurocisticercosis.

Dentro de los experimentos realizados para este trabajo se analizaron, además de los sueros de cerdo ya mencionados, tres sueros de pacientes con neurocisticercosis (40S, 68S, 69S) para probar la capacidad de la metodología de "Phage Display" tanto en la cisticercosis porcina como en la neurocisticercosis. Desafortunadamente, en el caso de los sueros humanos, es imposible asegurar un control en cuanto al historial inmunológico de los individuos, previo a la obtención de las muestras de sueros utilizadas para este trabajo, por lo que los datos obtenidos no son tan claros como los obtenidos en el modelo porcino y no se muestran ya que no es posible concluir nada a partir de ellos.

V.2 "BIOPANNING"

V.2a Clonas Seleccionadas con Sueros de Cerdos Infectados Experimentalmente

Por medio del tamizaje repetido de la biblioteca de péptidos utilizando los sueros de cerdos (C1, C4, C32, C36, G10), se obtuvieron poblaciones de clonas capaces de unirse específicamente a cada suero (fig V.2.1). Después de la primera reacción de panning con cada uno de los sueros, se recuperaron de 10^6 - 10^7 partículas de fago que habían permanecido unidas a las paredes del pozo después de los lavados.

Figura V.2.1: Secuencias de Aminoácidos de los Péptidos seleccionados por cada suero.

C1

Clona	secuencias						
2	<u>leu</u>	<u>thr</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	gln	his	asp
3	<u>leu</u>	<u>thr</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	asn	ser	pro
4	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	thr	tyr	pro
6	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	thr	tyr	pro
8	<u>leu</u>	his	<u>phe</u>	his	pro	ala	arg
9	thr	<u>thr</u>	<u>pro</u>	val	ala	his	ser
10	gly	<u>thr</u>	<u>pro</u>	pro	ser	leu	trp
1	phe	his	<u>ser</u>	<u>pro</u>	ile	ser	his
5	<u>leu</u>	pro	pro	ala	ser	arg	asn
7	arg	asn	thr	his	leu	pro	his

C4

Clona

secuencias

2	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	gln	his	asp
3	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	asn	ser	pro
5	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	thr	gln	ala
9	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>ser</u>	tyr	asp	phe
6	glu	arg	pro	thr	ile	thr	lys
7	val	pro	pro	ala	ala	leu	pro
8	leu	pro	phe	ser	ser	thr	arg

C32

Clona

secuencias

2, 7	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>leu</u>	<u>thr</u>	<u>met</u>
3	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	met	trp	leu
6	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	phe	ser	asp
9	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	ile	trp	ala
1	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	his	met	ser	gln
10	lys	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	ile	gln	met
8	ser	leu	arg	pro	ala	phe	leu
4	leu	ala	phe	pro	arg	thr	ser
5	thr	phe	ala	leu	ser	phe	pro

C36

Clonas

secuencias

5	his	<u>pro</u>	<u>val</u>	lys	pro	leu	ala
1	pro	phe	thr	<u>pro</u>	<u>val</u>	phe	glu
4	ala	les	phe	<u>pro</u>	<u>val</u>	met	gln
2	thr	pro	ser	val	ala	ala	lys
3	asn	pro	tyr	pro	pro	trp	val
6	leu	arg	ser	thr	val	arg	pro
7	thr	ala	ala	gln	asn	met	ala
8	asp	phe	gly	gln	leu	arg	gln
9	leu	asp	asn	leu	trp	met	val
10	glu	gly	ala	his	ser	leu	gly

G10

Clonas

secuencias

1, 2	<u>ser</u>	<u>gly</u>	<u>lys</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>phe</u>	<u>arg</u>
3, 5,	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>ile</u>	<u>asn</u>	<u>gln</u>
6, 10	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>ile</u>	<u>asn</u>	<u>gln</u>
4	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	trp	trp	leu
7	asp	ala	ser	pro	lys	arg	pro
9	ser	his	tyr	thr	leu	arg	glu

Estas partículas recuperadas se amplificaron para obtener alrededor de 10^{12} partículas virales por ml y se usaron para una segunda reacción de panning con una nueva porción del mismo suero. Se tomaron diez clonas al azar de cada población de las que presentaron afinidad por los sueros, después de tres reacciones de panning, se amplificó cada clona por separado, y se determinó la secuencia particular de cada péptido. Es de notar que, en este proceso, la cantidad de partículas virales recuperadas durante cada una de las reacciones de panning aumenta debido al enriquecimiento de la población de clonas capaces de unirse específicamente a los anticuerpos presentes en el suero (Tabla V.2.I). Esto se evidencia en que las secuencias de las clonas seleccionadas y analizadas de cada suero presentan similitudes, al contrario de las secuencias tomadas al azar de clonas presentes en la biblioteca original. Digno de mención es también el hecho de que la cantidad de partículas virales recuperadas con el suero del cerdo control (G10), se encuentra dentro del mismo rango que las recuperadas con los sueros de cerdos infectados (Tabla V.2.I). Esto es consecuencia del hecho de que el tamizaje de la biblioteca de "Phage Display" conduce a la selección de péptidos que se unen a todo tipo de anticuerpos. Debido a que el suero del cerdo control contiene anticuerpos de varias especificidades, generados previamente a la realización de este trabajo, es capaz de seleccionar cantidades de fagos similares a las de los sueros de cerdos infectados con *T. solium*. Sin embargo, los fagos seleccionados con el suero control no deben de presentar similitud con los fagos obtenidos con los sueros de cerdos infectados.

Tabla V.2.1: Títulos de fagos obtenidos después del proceso de "biopanning"

Suero Usado	Título	Título	Título
Para la Selección	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3
C1	1.7×10^6	5.6×10^7	NSD*
C4	3.4×10^6	4.2×10^7	NSD*
C32	4×10^4	2.5×10^6	2×10^7
C36	7×10^4	6×10^6	2.5×10^7
G10	3×10^4	1.6×10^6	4×10^7

* No se realizó titulación para la tercera reacción de "biopanning" con estos dos sueros

Las secuencias peptídicas expresadas en cada una de las clonas seleccionadas se compararon contra 69 clonas de la biblioteca original y se comparó la frecuencia de cada aminoácido en la biblioteca original (promedio) y en las diez clonas seleccionadas por cada suero (promedio) como un primer paso para determinar si las clonas aisladas después del proceso de panning fueron seleccionadas de manera específica por los anticuerpos presentes en los sueros, o por algún artefacto experimental. Como se puede ver en la tabla V.2.1, la frecuencia de los aminoácidos particulares cambió en los péptidos seleccionados, comparada con sus frecuencias en la biblioteca original. Existe una selección preferencial de algunos aminoácidos (pro-phe) y una selección en contra de otros (Ile, Gln, Asn, Tyr).

Tabla V.2.I: Frecuencia de Aminoácidos en la Biblioteca Original y en Los Péptidos Seleccionados

	Arg	Leu	Ser	Ala	Gly	Pro	Thr	Gln	Val	Asn	Asp	Glu	His	Ile	Lys	Met	Phe	Trp	Tyr	Cys
Biblioteca	3.9	11.8	11.4	7.2	3.7	<u>12.0</u>	<u>9.3</u>	<u>6.4</u>	4.3	<u>4.1</u>	2.1	1.2	4.3	<u>5.4</u>	1.7	3.3	<u>2.9</u>	1.0	<u>2.9</u>	0.8
C1	4.3	11.4	12.8	4.3	1.4	20.0	10.0	1.4	4.3	4.3	1.4	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	8.5	1.4	1.4	0.0
C4	6.1	12.2	16.3	6.1	0.0	20.8	10.4	2.0	2.0	0.0	2.0	4.0	0.0	2.0	2.0	0.0	12.2	0.0	2.0	0.0
C32	2.8	10.0	15.7	5.7	0.0	12.8	15.7	2.8	0.0	0.0	1.4	0.0	11.4	1.4	1.4	7.1	7.1	2.8	0.0	0.0
C36	4.3	10.0	4.3	12.8	4.3	12.8	5.7	5.7	10.0	4.3	2.8	2.8	2.8	0.0	2.8	4.3	5.7	2.8	1.4	0.0
G10	5.7	4.3	15.7	1.4	4.3	14.2	10.0	5.7	0.0	5.7	1.4	1.4	10.0	5.7	4.3	0.0	5.7	2.8	1.4	0.0

V.3 ANALISIS DE SECUENCIA

V.3a Comparación de Secuencias.

Todos los péptidos analizados se encuentran distribuidos en tres grupos:

- Péptidos de secuencia totalmente idéntica
- Péptidos con homologías parciales
- Péptidos únicos

Los sueros de los cerdos estudiados demuestran una diferente representación de estos tres tipos de secuencias. De los sueros de cerdos infectados, solamente uno (C32), seleccionó péptidos idénticos, mientras que los péptidos con similitud parcial fueron más abundantes de entre los obtenidos con este y otros dos sueros (C1, C4). El suero del cerdo C36 dió casi exclusivamente péptidos únicos con sólo tres péptidos de escasa similitud (fig V.3.I).

Figura V.3.I: Secuencias Según su Tipo de Similitud

a) Secuencias Idénticas:

C32

Clonas

2, 7

ser

his

secuencias

thr

pro

leu

thr

met

G10

Clonas	secuencias						
1, 2	<u>ser</u>	<u>gly</u>	<u>lys</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>phe</u>	<u>arg</u>
3, 5,	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>ile</u>	<u>asn</u>	<u>gln</u>
6, 10	<u>ser</u>	<u>his</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>ile</u>	<u>asn</u>	<u>gln</u>

a) Secuencias Parcialmente Homólogas:**C1**

Clonas	secuencias						
2	<u>leu</u>	<u>thr</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>gln</u>	<u>his</u>	<u>Asp</u>
3	<u>leu</u>	<u>thr</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>asn</u>	<u>ser</u>	<u>pro</u>
4	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>thr</u>	<u>tyr</u>	<u>pro</u>
6	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>thr</u>	<u>tyr</u>	<u>pro</u>
8	<u>leu</u>	<u>his</u>	<u>phe</u>	<u>his</u>	<u>pro</u>	<u>ala</u>	<u>arg</u>
9	<u>thr</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>val</u>	<u>ala</u>	<u>his</u>	<u>ser</u>
10	<u>gly</u>	<u>thr</u>	<u>pro</u>	<u>pro</u>	<u>ser</u>	<u>leu</u>	<u>trp</u>
1	<u>phe</u>	<u>his</u>	<u>ser</u>	<u>pro</u>	<u>ile</u>	<u>ser</u>	<u>his</u>
5	<u>leu</u>	<u>pro</u>	<u>pro</u>	<u>ala</u>	<u>ser</u>	<u>arg</u>	<u>asn</u>

C4

clonas	secuencias						
2	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>gln</u>	<u>his</u>	<u>asp</u>
3	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>asn</u>	<u>ser</u>	<u>pro</u>
5	<u>leu</u>	<u>ser</u>	<u>phe</u>	<u>pro</u>	<u>thr</u>	<u>gln</u>	<u>ala</u>

9 leu ser phe ser tyr asp phe

C32

Clonas

secuencias

3 ser his thr pro met trp leu

6 ser his thr pro phe ser asp

9 ser his thr pro ile trp ala

1 ser his thr his met ser gln

10 lys his thr pro ile gln met

C36

Clonas

secuencias

5 his pro val lys pro leu ala

1 pro phe thr pro val phe glu

4 ala les phe pro val met gln

c) Secuencias Unicas:

C1

Clonas

secuencias

7 arg asn thr his leu pro his

C4

Clonas

secuencias

6 glu arg pro thr ile thr lys

7 val pro pro ala ala leu pro

8 leu pro phe ser ser thr arg

C32

Clonas

	secuencias						
8	ser	leu	arg	pro	ala	phe	leu
4	leu	ala	phe	pro	arg	thr	ser
5	thr	phe	ala	leu	ser	phe	pro

C36

Clonas

	secuencias						
2	thr	pro	ser	val	ala	ala	lys
3	asn	pro	tyr	pro	pro	trp	val
6	leu	arg	ser	thr	val	arg	pro
7	thr	ala	ala	gln	asn	met	ala
8	asp	phe	gly	gln	leu	arg	gln
9	leu	asp	asn	leu	trp	met	val
10	glu	gly	ala	his	ser	leu	gly

G10

Clonas

7	asp	ala	ser	pro	lys	arg	pro
9	ser	his	tyr	thr	leu	arg	glu

Los péptidos seleccionados por el suero del cerdo C1 son de particular interés debido a que cuatro de diez de ellos tienen una similitud parcial con regiones

similares o idénticas, de cuatro aminoácidos (L-T/S-F-P). Una quinta clona presenta parte de esta similitud en los residuos L y F que se encuentran en la misma posición. Esto sugiere que estas cinco clonas fueron seleccionadas por un mismo anticuerpo o un grupo de anticuerpos que reconocen al mismo epítipo. De las cinco clonas restantes, tres tenían pares de residuos similares (T-P, S-P). De los péptidos obtenidos con el suero del cerdo C4, cuatro presentan una región N-terminal idéntica (L-S-F-P), dos de estos también presentaban una región de pares de residuos similares (T-P, S-P). En el caso del suero del cerdo C32 se encontró en 6 clonas, en la región N-terminal, una secuencia similar (S-H-T-P) la cual también se encontró en 5 clonas obtenidas con el suero del cerdo no infectado (G10)(fig. V.3.II). El suero del cerdo C36 no seleccionó clonas similares en ningún caso.

Figura V.3.II: Similitud de secuencias entre los péptidos seleccionados con el suero de un cerdo sano (G10) y un cerdo infectado (C32)

G10	SHTPI - Q	(4)
C32	SHTPI - Q	(1)
G10	SHTP- - -	(1)
G32	SHTP- - -	(2)
G32	SHTP- - -	(1)
G32	SHTP- - -	(1)
G32	-HTP- - -	(1)

Las cifras entre paréntesis indican la frecuencia de las clonas mostradas en el total de clonas seleccionadas con cada suero.

V.3b Búsqueda de Similitud

Las secuencias de los péptidos seleccionados fueron comparadas contra las secuencias de aminoácidos de las tres proteínas de *T. solium* reportadas en la

base de datos Swiss Prot (paramiosina, actina y una proteína ribosomal) y contra la región terminal 3' (100 aminoácidos) del antígeno recombinante de *T. crassiceps* KETc 7. Esta última se incluyó dentro de la búsqueda debido a la alta frecuencia de reacciones cruzadas entre estas dos especies de tenias (Larralde *et. al.*, 1990). En el antígeno KETc 7 se encontró una sección en la región N-terminal, con la siguiente secuencia: SFSPPP, la cual presenta diferentes grados de similitud con los péptidos similares (L-T/S-F-P; L-S-F-P) seleccionadas por los sueros de los cerdos C1 y C4 (fig. V.3.III). Ninguna de las otras proteínas incluidas en la base de datos presentó una similitud útil con los péptidos analizados.

Figura V.3.III: Similitud entre los péptidos seleccionados con los sueros de cerdos infectados (C1, C4, C36) y el antígeno KETc 7 de *T. crassiceps*

C1.2	LTFPQHD
C1.3	LTFPQHP
C4.5	LSFPTQA
C4.2	LSFPETR
C1.6	LSFPSV
C1.4	LSFPTY
C4.3	LSFPSPP
KETc 7:	NSARAFMQPHPSFSPPPGDYLYQ...
	1 10 20
C36.3:	NPYPPW
KETc 7:	APNPGPPPPYTGA
	40 50

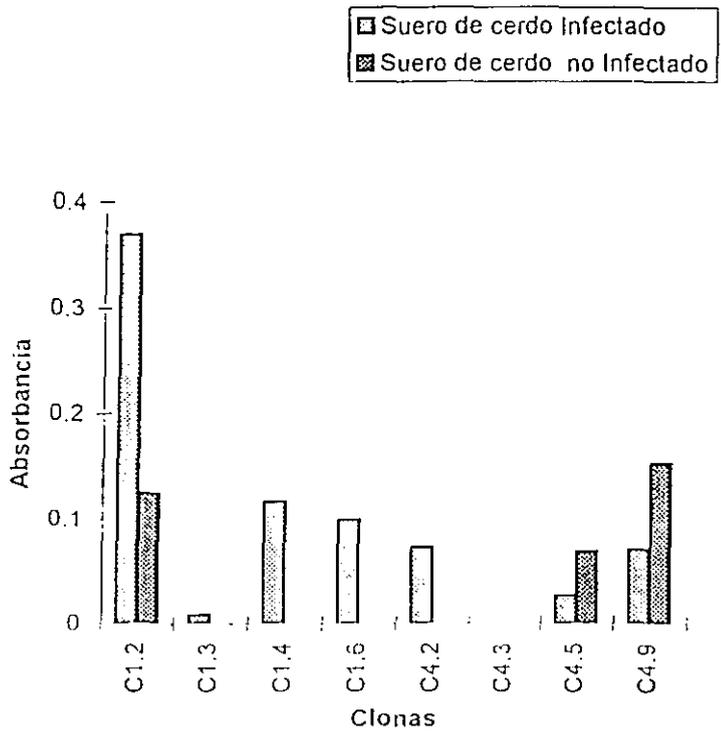
Ninguno de los péptidos analizados al azar de la biblioteca de "Phage Display" (69) presentó una secuencia similar a esta. Un segundo sitio dentro del antígeno KETc 7 (NPGPP) tuvo similitud con uno de los péptidos seleccionados por el

suero del cerdo C36 (fig. V.3.III). Este sitio se encuentra dentro de una región inmunogénica previamente caracterizada de este antígeno (Manoutcharian *et. al.* 1996; Gevorkian *et. al.* 1996).

V.4 INMUNOREACTIVIDAD

Para confirmar los resultados obtenidos a partir de la comparación de secuencias y búsqueda de similitud se realizó una prueba de antigenicidad basada en un ensayo de ELISA tal como se describe en Materiales y Métodos (Sección IV.7). En este ensayo se probaron 8 clonas (C1.2, C1.3, C1.4, C1.5; C4.2, C4.3, C4.5, C4.9) de las seleccionadas por los sueros de cerdos infectados, estas clonas fueron obtenidas con los sueros de los cerdos C1 y C4 (L-T/S-F-P, L-S-F-P) y expresan epítomos que tienen similitud con la secuencia SFSPPP de KETc 7. Los resultados obtenidos permitieron determinar, de acuerdo con el criterio descrito en Materiales y Métodos para esta prueba (sección IV.7), que algunas de estas clonas (C1.2, C1.4, C1.6 y C4.2) son positivas con los sueros particulares con que se aislaron y, no son positivas contra un suero control no infectado (G10) (fig. V.4.I).

Figura V.4.1 Reacción inmune de las clonas analizadas contra un suero de cerdo infectado (C1, C4) y uno no infectado (G10). En esta figura se muestran los valores de absorbancia de la reacción de cada clona contra el suero respectivo menos el valor de reacción de cada suero contra un fago silvestre



VI DISCUSION

Los métodos tradicionales de obtención de inmunoglobulinas y antígenos se basaban en procedimientos que involucraban líneas celulares especializadas, plantas y animales. Estos métodos están siendo gradualmente substituidos por otros más eficientes y rápidos basados en las técnicas del DNA recombinante. Uno de estos nuevos procesos aprovecha la capacidad de los fagos filamentosos para expresar en su superficie proteínas y péptidos ajenos a ellos mismos. Dado que los fagos son uno de los mejores sistemas vectores para la clonación simultánea de muchos genes diferentes, es posible utilizarlos para construir bibliotecas de epítomos reales o potenciales.

En el presente trabajo, usamos esta metodología, como una nueva manera de enfocar el problema de la cisticercosis por medio de la detección de epítomos de este parásito y su caracterización.

Como se muestra en los resultados, el proceso de panning de los diferentes sueros nos dió como resultado una población de secuencias de epítomos de tres tipos: únicas, de similitud variable e idénticas. Estas últimas pueden surgir a partir de un sesgo en la biblioteca o durante el panning y amplificación, que dé preferencia a ciertas secuencias peptídicas, por un artefacto experimental, o por selección con un anticuerpo presente en gran cantidad en el suero. Las clonas con una similitud parcial en sus secuencias son probablemente originadas por selección específica por anticuerpos presentes en el suero, y las clonas con secuencias únicas pudieran deberse a selección específica por un anticuerpo

presente en baja concentración en el suero o por un artefacto experimental.

Los sueros de cerdo estudiados presentaron una variada representación de los tres tipos de secuencias. Por lo que concierne a los cerdos infectados, solo el suero del cerdo C36 seleccionó secuencias únicas como mayoría, mientras que los sueros de los cerdos C1 y C4, seleccionaron una mayor cantidad de secuencias con homologías parciales. Un dato muy interesante es el hecho de que el suero del cerdo control (G10) seleccionó una mayor cantidad de secuencias idénticas y en general una población de secuencias más uniforme que cualquiera de los sueros de cerdos infectados, esto pudo deberse a varios motivos: como ya se comentó anteriormente pueden existir sesgos en la biblioteca o generarse durante el panning o amplificación, también pueden deberse a la presencia en grandes cantidades de un anticuerpo particular en el suero del cerdo G10. El propósito principal de estos experimentos era el de encontrar péptidos con secuencias similares (parcialmente o idénticos) en los sueros de cerdos diferentes, esto es, aquellos péptidos que fuesen seleccionados por anticuerpos iguales o que presentaran reacción cruzada y que fueron inducidos por *T. solium*. Aún cuando en general la selección de péptidos con secuencias similares es frecuente con antisueros de diferentes individuos contra el mismo inmunógeno (Dybwad *et. al.* 1995), en este trabajo en particular, esta similitud entre los cuatro sueros de cerdos estudiados (C1, C4, C32, C36) no se encontró por varias razones:

- a) En trabajos previos (Aluja de *et. al.* 1996) se ha mostrado que los cerdos presentan un alto grado de variación en su reacción inmune humoral contra la

infección por *T. solium*.

- b) En el transcurso de la infección el conjunto de epítomos reconocidos por el suero cambia.
- c) Los péptidos estudiados representan una parte menor (aun cuando es la más representativa) de las clonas recobradas después de los tres experimentos de panning.

De cualquier manera, se obtuvieron dos grupos de péptidos con secuencias de similitud parcial a partir de los sueros estudiados. El primer grupo se obtuvo a partir de los sueros de dos cerdos infectados (C1 y C4) en el cual se encontró la secuencia L-S/T-F-P-T/S compartida en varios de los péptidos de ambos sueros. El segundo grupo se obtuvo a partir de un suero de cerdo infectado (C32) y el suero del cerdo control (G10) con la secuencia S-H-T-P siendo común entre los péptidos de ambos sueros. Dado que, en ambos grupos, la parte C-terminal de todos los péptidos presentó diferencias, es escasa la posibilidad de que su selección se deba a algún artefacto experimental. Más probablemente, se deba a un anticuerpo o varios anticuerpos de reacción cruzada presentes en el suero. En el caso del grupo formado por el suero C32 y el suero control G10 la similitud indica que los péptidos seleccionados por el suero del cerdo infectado C32 fueron seleccionados de manera específica por algún anticuerpo o grupo de anticuerpos no relacionados con *T. solium* sino con algún otro inmunógeno al cual el cerdo control G10 también debió de encontrarse expuesto en algún momento, o se deben a una selección inespecífica.

La similitud detectada por computadora entre los péptidos seleccionados por los sueros C1, C4 y C36 y el antígeno sintético de *T. crassiceps*, Ketc7, confirma el hecho de que estos fueron seleccionados de manera específica por un anticuerpo o grupo de anticuerpos relacionados a la cisticercosis. Se ha demostrado, tanto en cerdos infectados con *T. solium* (Manoutcharian *et. al.* 1996), como en pacientes enfermos de neurocisticercosis (Gevorkian *et. al.* 1996), que existe una reacción cruzada entre los antígenos de *T. solium* y el antígeno KETc 7. Esta similitud entre los péptidos seleccionados y regiones particulares de este antígeno implica que hemos aislado mimotopos comunes para *T. solium* y *T. crassiceps*. Un dato más que apoya nuestra hipótesis es el hecho de que la similitud hallada entre C36 y KETc7 se localiza en una región de este antígeno previamente caracterizada y altamente inmunogénica (Gevorkian *et. al.* 1996; Manoutcharian *et. al.* 1996). Esto sugiere que por medio de la metodología de "Phage Display" ha sido posible aislar, partiendo de una biblioteca de péptidos al azar, un péptido seleccionado específicamente por un anticuerpo específico de un sitio inmunodominante de KETc7. Para apoyar todo lo anterior con un dato bioquímico se decidió realizar un ensayo tipo ELISA probando la antigenicidad de las clonas seleccionadas por los sueros C1 y C4 que presentaban similitud entre si y con el antígeno KETc 7 (lo que las hace las más interesantes). Los resultados de este ensayo confirman, de acuerdo con el criterio establecido por Dybwad *et. al.* (1995) que dichos péptidos son capaces de ser reconocidos de manera específica por los anticuerpos presentes en el suero de los cerdos infectados con los que se seleccionaron originalmente y que no son producto de un artefacto experimental,

ni reaccionan de manera inespecífica con un suero no infectado.

El objetivo de este estudio ha sido el de probar la utilidad de esta metodología para el estudio de modelos experimentales en los que se requiera trabajar con sueros totales e inmunógenos complejos (tal como *T. solium*) y aislar a partir de una biblioteca de "Phage Display", péptidos para la posterior investigación de la reacción inmune inducida en cerdos por la infección con *T. solium*.

Como es posible ver por todo lo expuesto anteriormente, hemos logrado aislar péptidos interesantes, de los cuales la mayoría pueden ser considerados como ligandos específicos de anticuerpos inducidos por la infección con *T. solium*. A pesar de la variabilidad individual en el nivel y conjunto de anticuerpos que reaccionan contra antígenos totales del parásito (Aluja de *et. al.* 1996; Sciutto *et. al.* 1998) en ensayos de ELISA y Western Blot, fuimos capaces de aislar péptidos reconocidos por los sueros con los que se seleccionaron y que comparten secuencias comunes. Así pues, nuestro intento de caracterizar la reacción inmune en cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*, muestra que es posible obtener clonas de péptidos que son probables mimotopos de los antígenos de *T. solium* a partir de una biblioteca de péptidos al azar, usando la metodología de "Phage Display".

VII CONCLUSIONES

- 1) Existen péptidos dentro de la biblioteca de "Phage Display" usada para este trabajo que son reconocidos específicamente por anticuerpos presentes en el suero de cerdos infectados experimentalmente con *T. solium*.
- 2) Estos péptidos pueden ser seleccionados, aislados, purificados y caracterizados
- 3) Es posible hallar similitud de secuencia entre los péptidos seleccionados y entre estos y la secuencia de antígenos relevantes de *T. solium* y *T. crassiceps*.
- 4) Dicha similitud, aunada al ensayo inmunológico permite afirmar que estos péptidos no fueron seleccionados por un artefacto experimental sino que fueron específicamente seleccionados por ser mimotopos de antígenos de *T. solium*.
- 5) Es posible caracterizar la reacción inmune en un suero policlonal contra un inmunógeno complejo por medio de "Phage Display"

VIII BIBLIOGRAFIA

- Aluja, A. S., Villalobos A.N.M., Plancarte, A., Rodarte, L.F., Hernández, M., Sciutto, E. 1996. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet. Parasitol.*, 61: 49-59
- Barret, R. W., Cwirla, S. E., Ackerman, M. S., Olson, A. M., Peters, E. A., Dower, W. J. 1992. Selective enrichment and characterization of high affinity ligands from collections of random peptides on filamentous phage. *Anal. Biochem.* 204:357-364
- Castillo, M., Salgado, P., Rojas, R., Sotelo, J., Sanches, J., Mukherji, S.K. 1996. Unusual imaging manifestations of Neurocysticercosis. *Intern. J. Neuroradiol.* 2:168-175
- Correa, D., Sandoval, M. A., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E., Plancarte, A., Meza-Lucas, A., Flisser, A. 1989. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:814-816
- Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barret, R.W., Dower, W.J. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying the ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 87: 6378-6382
- Del Brutto, O. H. 1997. Neurocysticercosis. *Curr. Op. Neurol.* 10:268-272

- Del Brutto, O.H. and Sotelo, J. 1987. Neurocysticercosis. *Medicina de hoy*. 6:21-40
- Del Brutto, O.H. and Sotelo, J. 1988. Neurocysticercosis: an update. *Rev. Infect. Dis.*, 10:1075-1087
- Dempster, R.P., Robinson, C.M., Harrison, G.B.L. 1996. Parasite vaccine development: A large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45(B/X) from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Parasitol. Res.* 82:291-296
- Díaz-Camacho, S., Candil-Ruiz, A., Suate-Peraza, V., Zazueta-Ramoz, M.L., Felix-Medina, M., Lozabo, R., Willm, K., 1991. Epidemiological study control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:522-531
- Doorbar, J., Winter, G. 1994. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J. Mol. Biol.* 244: 361-369
- Dower, W., J., Cwirla, S., E. 1994. Epitope mapping using libraries of random peptides displayed on phage. *Peptide Antigens, a Practical Approach*. Wisdom, G., B. (Ed.). IRL Press (Oxford University Press). pp: 219-243
- Du Plessis, D. H., Wang, L., Jordaan, F. A., Eaton, B. T. 1994. Fine mapping of a continuous epitope on VP7 of bluetongue virus using overlapping synthetic peptides. *Virology* 198:346-349
- Dybwad, A., Bogen, B., Natvig, J.B., Forre, O., Sioud, M. 1995. Peptide phage libraries can be an efficient tool for identifying antibody ligands for polyclonal antisera. *Clin. Exper. Immunol.* 102:438- 442

- Dybwad, A., Forre O., Kjeldsen-Kragh J., Jacob B., Natvig and Sioud M. 1993
Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur. J. Immunol.* 23: 3189-3193
- Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J.B., Sioud, M. 1995. Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: a novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75(1): 45-50
- Escobedo, F., 1988. Tratamiento de neurocisticercosis humana con albendazole evaluación controlada con tomografía computarizada y con resonancia magnética. *Rev. Asoc. Guatemalteca Parasitol Med. Trop.* 3:24-26
- Espinoza, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M., Plancarte, A., Flisser, A. 1986. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral response in patients with neurocysticercosis and its applications in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24:536-41
- Feldman, M., Plancarte, A., Sandoval, M., Wilson, M., Flisser, A. 1990. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. Royal. Soc.Trop. Med. Hyg.* 84:559-62
- Felici, F., Castegnoli, L., Musachio, A., Jappelli, R., Cesarebi, G. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222:301-310

- Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A., Cortese, R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Genes* 128:21-27
- Flisser, A. 1985. Cysticercosis: a major threat to human health and livestock production. *Food technol.* 39:61-64
- Flisser, A. 1994. Teniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Tsieh Sun (Ed.), *Progress in Clinical Parasitology*, v.4. CRC Press, Boca Raton, pp.77-116
- Flisser, A., Madrazo, I., Gonzalez, D., Sandoval, M., Rodriguez-Carbajal, J. 1988. Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 739-742
- Flisser, A., Plancarte, A., Correa, D. 1991. *Taenia solium* Cysticercosis: a review. *Res. Rev. Parasitol.* 51:17-23
- Flisser, A., Plancarte, A., Avila, G., 1994. III. Aplicación de Métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniasis a estudios epidemiológicos. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 37(2):21-38
- Flisser, A., Woodhouse, E., Larralde, C. 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39:27-37
- Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfré, G., Cortese, R., Monaci, P., Nicosia, A. 1994. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* 13:22-36

- García, H. H., Herrera, H., Gilman, R. H., Tsang, V. C. W., Pilcher, J. B., Díaz, J. F., Candy, E. J., Miranda, E., Naranjo, J., The cysticercosis Working Group in Peru. 1994. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50:152-157
- Gemmel, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E.J.L., Larralde, C., Nelson, G.S., Rosick, B. 1983. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. VPII/83.49. World Health Organization, Geneva 1-207
- Gevorkian G., Manoutcharian, K., Larralde, C., Hernández, M., Almagro, J.C., Viveros. M., M., Sotelo, J., Garcia, E., Sciutto, E. 1996 Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Letters.* 49:185-189
- Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J. 1986. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23:709-715
- Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L., Lacleste, JP. 1982. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium* Cysticercosis, Present state of knowledge and perspectives, New York academic Press. 437-51
- Hodits, R. A., Nimpf, J., Pfistermueller, D. M., Hiesberger, T., Schneider, W. J., Vaughan, T. J., Johnson, K. S., Haumer, M., Kuechler, E., Winter, G., Blaas, D. 1995. An antibody fragment from a phage display library competes for

ligand binding to the low density lipoprotein receptor family and inhibits rhinovirus infection. *J.B.C.* 270:24078-24085

Jellis, C.L., Gradic, T.J., Rennert, P., Salinas, P., Boyd, J., Amirault, T., Gray, G.S. 1993. Defining critical residues in the epitope for a HIV-neutralizing monoclonal antibody using phage display and peptide array technologies. *Gene.* 137:63-68

Johnson, K. S., Chiswell, D. J. 1993. Human antibody engineering. *Curr. Op. Struct. Biol.* 3:564-571

Kay, B.K., Adey, N.B., He, Y.-S., Manfredi, J.P., Mataragnon, A.H., Fowikes, D.M. 1993. An M13 phage library displaying random 38-amino- acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene.* 128:59-65

Keilbach, N., Aluja, A.S., de; Sarti-Gutiér, E., Rez, E. 1989. A program to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*): experiences in a Mexican village. *Acta Leiden.* 57:181-189

Keller, P.M., Arnold, B.A., Shaw, A.R., Tolman, R.L., Middlesworth Van, F., Bondy, S., Rusicki, V.K., Koenig, S., Zolla-Pazner, S., Konard, P., Emini, E.A., Conley, A.J. 1993. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology.* 193:709-716

Kennedy, P. G. E., Johnson, R. T. (Eds). 1987. Infections of the nervous system. Butterworths, London. 145-155

Ko, R. C., Ng, T. F. 1998. Specificity of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis. *Parasitol. res.* 84:565-569

- Koivunen, E., Wang, B., Ruoslahti, E. 1994. Isolation of a highly specific ligand for the $\alpha_5\beta_1$ integrin from a phage display library. *J. Cell Biol.* 124:373-380
- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Plückthun, A., 1995. Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages. *FEBS Letters.* 377:227-231
- Kunz, J., Kalinna, B., Watschake, V., Geyer, E. 1989. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralbl. Bacteriol.* 272:510-516
- Landa, A., Merchant, M. T., Willms, K., Lacleste, J. P. 1994. Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *taenia solium* (cestoda) cysticerci. *Int. J. Parasitol.* 24:265-269
- Lane, D.P., Stephen, C.W. 1993. Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries. *Curr. Opin. Immunol.* 5:268-271
- Larralde, C., Montoya, R.M., Scitutto, E., Diaz, M.L., Govézensky, T., Coltorti, E. 1989. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:284-292.
- Larralde C., Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz M.L. Scitutto, E. 1990. Antigens from murine *Taenia crassiceps* effectively substitute those from porcine *Taenia solium* in immunodiagnosis for human neurocysticercosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114:926-928

- Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A., Cortese, R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene*. 128:51-57
- Manoutcharian, K., Rosas,G., Hernandez,M., Fragoso,G., Aluja,A., Villalobos,N., Rodarte,L.F., Sciutto, E. 1996. Cysticercosis:Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82:250-254
- McLafferty, M. A., Kent, R. B., Ladner, R. C., Markland, W. 1993. M13 Bacteriophage displaying disulfide-constrained microproteins. *Gene*. 128:29-36
- Meola A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago,A., Nicosia, a.,Felici, F., Cortese, R., Galfre, G. 1995 Derivation of vaccines from mimotopes. *J. Immunol.* 154:3162-3172
- Miceli, R.M., DeGraaf, M.E., Fischer, H.D. 1994. Two-stage selection of sequences from a random phage display library delineates both core residues and permitted structural range within an epitope. *J. Immunol. Methods.*167:279-287
- Molinary, J.L., Soto, R., Tato, P., Rodriguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J., Palet, A. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:502-512
- Montero, R., Ostrosky, P. 1997. Genotoxic activity of Praziquantel. *Mut. Res.* 387:123-139

- Noble, E. R. (Ed.), 1989, *The Biology of animal parasites*, 6th edition. Lea & Febiger, Philadelphia, London.
- Ordoñez, G., Medina, M. T., Sotelo, J. 1996. Immunoblot analysis of serum and CSF from patients with various forms of neurocysticercosis. *Neurological Infections and Epidemiol.* 1:57-61
- Orlandi, R., Ménard, S., Colnagi M., Boyer, C.M., Felici, F. 1994. Antigenic and immunogenic mimicry of the HER2/neu oncoprotein by phage displayed peptides. *Eur. J. Immunol.* 24:2868-2873
- Pinilla, C., Appel, J.R., Houghten, R.A. 1993. Functional importance of amino acid residues making up peptide antigenic determinants. *Molecular Immunol.* 30(6): 577-585
- Parmley, S.F., Smith, G.P. 1988. Antibody selectable fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Genes.* 73:305-318
- Petersen, G., Song, D., Hügler-Dörr, B., Oldenburg, I., Bautz, R.K.F. 1995. Mapping of Linear epitopes recognized by monoclonal antibodies with gene-fragment phage display libraries. *Mol. Gen. Genet.* 249:425-431
- Plancarte, A., Espinoza, B., Flisser, A. 1987. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's Nerv. Syst.* 3:203-205
- Plancarte, A., Fexas, M., Flisser, A., 1994. Reactivity in ELISA and Dot Blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 24:733-738
- Preux, P. M., Melaku, Z., Druet-Cabanac, M., Avode, G., Grunitzky, E., K., Bouteille, Cruz, M., Durnas, M. 1996. Cysticercosis and neurocysticercosis

- in Africa: current status. *Neurol. Infect. Epidemiol.* 1:63-68
- Ramon-Kuri, M., Montoya, R.M., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L., Sciutto, E., Sotelo, J., Larralde, C. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 49:633-636
- Rodríguez-del-Rosal, E., Correa, D., Flisser, A. 1989. Swine cysticercosis: Detection of parasite products in serum. *Vet. Rec.* 124:488
- Rosas, N., Sotelo, J., Nieto, D. 1986. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 43
- Salazar, A., Sotelo, J., Martinez, H., Escobedo, F. 1983. Differential diagnosis between ventriculitis and fourth ventricle cyst in neurocysticercosis. *J. Neurosurg.* 59:660-663
- Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L.F., Hernandez, M., Villalobos, M.N., Padilla, A., Kelbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S., Larralde, C. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60:53-67
- Sciutto, E., Hernández, M., Garcia, G., de Aluja, A.S., Villalobos, A.N.M., Rodarte, L.F., Parkhouse, M., Harrison, L. 1998. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.* 14:1-10
- Scott, J.K., Smith, G.P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* 249:386-390
- Sela, M. (Ed.), 1974. The antigens Vol. II. Academic Press. New York

- Sioud, M., Dybwad, A., Jespersen, L., Suleyman, S Natvig, J.B., Forre, O. 1994. Characterization of naturally occurring autoantibodies against tumour necrosis factor-alpha (TNF-a): *in vitro* function and precise epitope mapping by phage epitope library. Clin. Exper. Immunol. 98:520-525
- Sotelo, J., Del Brutto, O. H. 1987. Therapy of neurocysticercosis. Child's Nerv. Syst. 3:208-211
- Sotelo, J. M.D., Guerrero, V. M.D., Rubio, F. M.D. 1985. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. Archives of Internal Medicine 145.
- Sotelo, J., M.D., Marin, C., M.D. 1987 Hydrocephalus secondary to cysticercosis arachnoiditis. J. Neurosurg. 66:686-689
- Sotelo, J. M.D., Torres, B. M.D., Rubio-Donnadieu, F. M.D., Escobedo, F. M.D., Rodriguez-Carbajal, J. M.D. 1985. Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. Neurology. 35:752-755
- Stephen, C. W., Helminen, P., Lane, D. P. 1995. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. JMB. 248:58-78
- Teixeira, F., Flisser, A., Plancarte, A., Madrazo, I., Flores, I., Aguilera, M.C., Tornel, O. 1990. Inflammatory reaction induced by antigen B from *Taenia solium* cysticercus in the subarachnoid space of mice. Rev. Lat-amer. Microbiol. 32:285-289
- Tsang, C. W. V., Brand, J. A., Boyer, A. E. 1989. An Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing

- human cysticercosis (*Taenia solium*). J. Inf. Dis. 1:50-59
- Valdez, F., Hernández, M., Govezensky, T., Fragoso, G., Sciutto, E. 1994. Immunization against *T. crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. J. of Parasitol. 80:931-936
- Veronese, F. D. M., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E., Perham, R. N. 1994. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V_H loop of HIV-1 gp120. J. Mol. Biol. 243:167-172
- Waterhouse, P., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Winter, G. 1993. Combinatorial infection and *in vivo* recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. Nucleic Acid Res. 21:2265-2266
- Willis, A. E., Perham, R. N., Wraith, D. 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. Genes. 128:79-83
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R. 1994. Making antibodies by phage display technology. Annu. Rev. Immunol. 12:433-55
- Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M., Ivany, J., Thomas, D., Davis, R. W. 1985. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:2583