

03021

12



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE TAENIA CRASSICEPS
EN LA SUPERFICIE DEL FAGO FILAMENTOSO M13:
SU USO POTENCIAL EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE
NEUROCYSTICERCOSIS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

YETZI ROBLES BUCIO



DIRECTOR DE TESIS: DR. KAREN MANUCHARYAN



ABRIL, 2003

1



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza

Dr. José Narro Robles
Director de la
Facultad de Medicina
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Yetzi Robles Bucio

FECHA: 23 de abril del 2003
FIRMA: Yetzi Robles

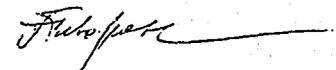
Por medio del presente le informamos que la tesis: " Expresión de antígenos de *Taenia crassiceps* en la superficie del fago filamentosos M13: su uso potencial en el inmunodiagnóstico de neurosticercosis" que presenta la alumna: Yetzi Robles Bucio, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.


Dra. Edda Sciutto Conde

Dr. Karen Manucharyan 


Dr. Abraham Landa Piedra

Dra. Goar Gevorgyan 

Dra. Ana María Cevallos Gaos 

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**El presente trabajo se realizó en el
Departamento de Biología Molecular y
Biotecnología del Instituto de Investigaciones
Biomédicas de la UNAM. Bajo la
dirección del Dr. Karen Manucharyan**

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Karen Manucharyan por brindarme su apoyo y orientación profesional para la realización de esta tesis.
- ❖ A la Dra. Gohar Gevorgyan por su apoyo y orientación profesional.
- ❖ A mis sinodales, la Dra. Edda Sciutto, la Dra. Ana María Cevallos y al Dr. Abraham Landa por sus comentarios y sugerencias al revisar esta tesis.
- ❖ A los técnicos de laboratorio Natasha I., Gónzalo Acero y Mariel Munguía por su apoyo técnico.
- ❖ A mis compañeros de laboratorio Hugo, Erik, Angel y Alberto.
- ❖ A Galileo por su compañía.
- ❖ A mis amigas Jessica, Citlali, Miriam, a mis profesores y compañeros de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica.
- ❖ Al personal de la biblioteca.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción | 2 |
| 2.1 <i>Taenia solium</i> : Morfología y Ciclo de Vida | 2 |
| 2.2 Manifestaciones Clínicas y Tratamiento | 4 |
| 2.3 Diagnóstico de NCC | 5 |
| 2.4 Expresión de antígenos en la superficie del fago filamentoso M13 y su aplicación en el inmunodiagnóstico de la NCC | 7 |
| 3. Objetivo General | 11 |
| 3.1 Objetivos Particulares | 11 |
| 4. Materiales y Métodos | 12 |
| 5. Resultados | 15 |
| 6. Discusión/Conclusión | 30 |
| 7. Referencias | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 8. Protocolos | 38 |
| 8.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 38 |
| 8.1.1 Precipitación del Producto de PCR | 38 |
| 8.1.2 Digestión Enzimática (<i>Sna</i> BI / <i>Nco</i> I) | 38 |
| 8.1.3 Elución de ADN | 39 |
| 8.2 Ligación | 39 |
| 8.2.1 Precipitación de las Ligaciones | 40 |
| 8.3 Preparación de Células Electrocompetentes | 41 |
| 8.4 Células Competentes Preparadas con $RbCl_2$ | 42 |
| 8.5 Purificación de la Biblioteca | 42 |
| 8.6 Método de Bioselección 1 | 43 |
| 8.7 Método de Bioselección 2 | 44 |
| 8.8 Método de Bioselección 3 | 45 |
| 8.9 Ensayos de ELISA | 46 |
| 9. Apéndice: Soluciones y Medios de Cultivo | 47 |

1. RESUMEN

El objetivo general de este trabajo es expresar antígenos de *Taenia crassiceps* en la superficie del fago filamentoso M13 e identificar fagos recombinantes, mediante ensayos de bioselección, para evaluar su potencial en el diagnóstico de la neurocisticercosis (NCC). Para esto, se construyó una biblioteca de ADNc de *T. crassiceps* expresada como fusión en el amino terminal de la proteína VIII (pVIII) del fago filamentoso M13. Se realizaron tres bioselecciones utilizando un suero de ratón inmunizado con extracto total de *Taenia solium* o un 'pool' de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes diagnosticados con NCC. Así mismo, se escogieron ocho clonas al azar de cada bioselección para analizarlas en ensayos de ELISA con el suero de ratón inmunizado y LCR con los que fueron originalmente seleccionadas.

En ELISA, los fagos seleccionados tuvieron bajas reactividades con el suero de ratón inmunizado y un 'pool' de LCR de pacientes con NCC, mencionados antes. Sin embargo, cuando se formaron grupos de clonas pertenecientes a la misma bioselección y analizaron con LCR de pacientes con NCC, el 'pool' 1, formado por ocho clonas escogidas en la bioselección 1, tuvo un valor de casi la mitad (43%) con respecto al control positivo (extracto total de *T. solium*) en ese ensayo. Hasta el momento, once secuenciaciones de insertos de fagos recombinantes han sido completadas (siete clonas de la bioselección 1, una clona de la bioselección 2 y cuatro clonas de la bioselección 3) y siete (64%) se expresan como fusiones en el amino terminal de pVIII en M13. Estas secuencias se analizaron a nivel nucleótido y a nivel aminoácido y encontraron homologías con genes y proteínas de varios organismos. Así mismo, se encontró una secuencia de ocho aminoácidos (PNSARAAR) que presentaban dos fagos recombinantes seleccionados. Este es el primer reporte que describe la construcción de una biblioteca de ADNc expresada como fusión en el amino terminal de pVIII en M13 y su utilización para seleccionar fagos recombinantes con potencial para diagnosticar NCC.

2. INTRODUCCIÓN

Taenia solium es un platihelminto cuyas larvas (cisticercos) pueden alojarse en el sistema nervioso central (SNC) causando neurocisticercosis (NCC) en humanos (1). También, pueden localizarse en órganos como los ojos, músculo esquelético, corazón, lengua y peritoneo provocando cisticercosis (CC). La NCC es la causa más común de trastornos serios en el SNC en regiones endémicas, países en vías de desarrollo, y responsable de al menos 50000 muertes al año (2) en América Latina, Africa, Asia y otras regiones del mundo donde prevalecen condiciones de vida insalubres. Además, la NCC es una enfermedad re-emergente en países industrializados debido a la migración de personas provenientes de países endémicos (3).

2.1 *Taenia solium*: Morfología y Ciclo de Vida.

Taenia solium pertenece al orden *Cyclophyllidea* y a la familia *Taeniidae*. En la tenia adulta se pueden distinguir las siguientes estructuras: un escólex provisto de cuatro ventosas y un rostelo con ganchos, un cuello delgado y poco segmentado y el estróbilo (2 – 4 m) formado por segmentos denominados proglótidos (800 - 1000) donde se encuentran los órganos genitales masculinos y femeninos. El grado de madurez del sistema reproductor permite identificar tres tipos de proglótidos: inmaduros que se encuentran cerca del cuello y cuyos órganos son visibles pero no funcionales, maduros donde el aparato reproductor es funcional y los grávidos que están más alejados del escólex y repletos de huevos fértiles en el útero (4, 5). Su ciclo de vida involucra al cerdo como huésped intermediario y al humano como huésped definitivo. El hombre puede infectarse al ingerir carne de cerdo contaminada con cisticercos vivos y desarrollar teniasis. Así mismo, puede ingerir huevos fértiles, por el mecanismo mano-ano-boca, y desarrollar cisticercosis.

El ciclo se cierra cuando el cerdo ingiere huevos presentes en las heces de humanos infectados por la tenia adulta (figura 1). Se ha calculado que una tenia puede liberar de 1-5 proglótides al día y que cada proglótide produce aprox. 50000 - 60000 huevos fértiles (2, 4). Los huevos de la tenia son muy resistentes a las diferentes condiciones ambientales, se ha reportado que pueden ser viables hasta por 8 meses en climas húmedos y cálidos (2).

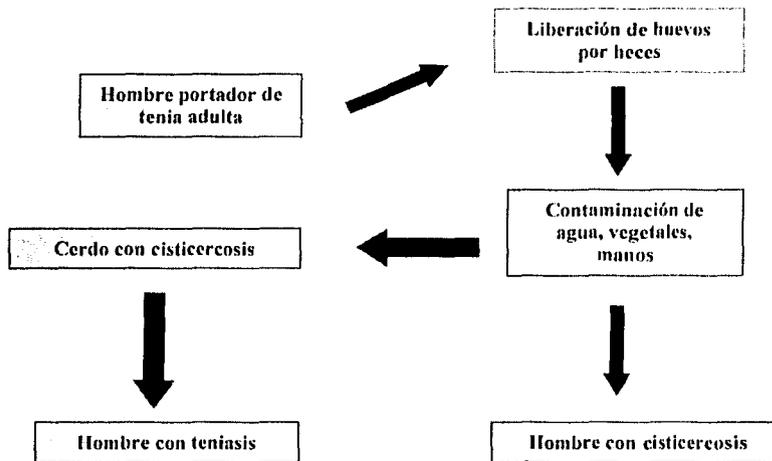


Figura 1: Ciclo de vida de *Taenia solium*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el intestino humano o porcino, la oncosfera conocida como embrión hexacanto, provista de seis ganchos y varias capas protectoras, es liberada del huevo por los jugos digestivos, atraviesa la pared intestinal y, por vía sanguínea, se establece en varios órganos donde se convierte en larva o cisticerco (4, 5). El cisticerco es una vesícula llena de fluido que está formada por: la pared vesicular, compuesta por tres capas, un escólex que tiene cuatro ventosas y un roseto con ganchos y un estróbilo rudimentario que incluye el canal espiral (4).

2.2 Manifestaciones Clínicas y Tratamiento.

La infección por la tenia adulta, es en la mayoría de los casos, asintomática aunque puede ocasionar algunos síntomas gastrointestinales en el huésped. Las manifestaciones clínicas más severas son ocasionadas por la presencia de larvas en el SNC. Aunque los síntomas de la NCC son variados e inespecíficos, el síntoma más común es epilepsia y se manifiesta por la ubicación de cisticercos en el parénquima del cerebro. También puede presentarse hipertensión intracraneal, relacionada con la falta de circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR) o por la obstrucción de su absorción, asociada con la presencia de larvas en el espacio subaracnoideo. En la forma severa de NCC se encuentran cisticercos necróticos rodeados por infiltrado celular, algunas lesiones presentan linfocitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas y algunos eosinófilos. En la forma benigna de NCC se presentan cisticercos calcificados con un infiltrado celular escaso (1, 4). El pleomorfismo clínico manifestado por la NCC está relacionado con el número de larvas, localización, edad y género del paciente, así como, la respuesta inmune de cada individuo evocada contra los cisticercos.

Los medicamentos, praziquantel y albendazol, han sido muy eficaces en combatir la cisticercosis en humanos y cerdos. La primera aumenta la permeabilidad de la membrana del parásito provocando una pérdida de calcio intracelular y el albendazol causa la degeneración de los microtúbulos en el cisticerco (6). En México, el 85% de los cisticercos en el parénquima del cerebro son destruidos con una dosis de albendazol, aprox. el 75% son eliminadas con una dosis de praziquantel y el 95% si ambos son empleados por separado (1). El empleo de estos medicamentos aumenta la reacción inflamatoria alrededor del cisticerco en el SNC, para controlar esta reacción se administran anti-inflamatorios (corticoesteroides). El tratamiento dependerá del número, localización de cisticercos y la respuesta del paciente ante los medicamentos administrados.

2.3 Diagnóstico de NCC.

La heterogeneidad en la manifestación de NCC dificulta su diagnóstico basado en datos clínicos. Actualmente, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM) son los métodos utilizados para diagnosticar casos donde se sospecha de NCC. La TC permite visualizar formas activa e inactiva de NCC, mientras que la RM detecta las lesiones en la base del cerebro, en los ventrículos y en la médula espinal, así como también, permite evaluar la reacción inflamatoria alrededor del cisticerco (1). Desafortunadamente, en regiones endémicas, estos métodos son poco accesibles, poseen un alto costo y requieren de personal capacitado. Varios grupos de investigación se han enfocado en el diseño de inmunodiagnósticos para minimizar los costos del diagnóstico actual. Sin embargo, la reactividad cruzada con antígenos de otros parásitos, la dudosa representatividad de antígenos, la discriminación entre formas activa e inactiva de NCC y la exclusión entre la NCC y la cisticercosis en otras partes, son problemas que no resuelven, en su totalidad, las técnicas diseñadas hasta el momento (1). En la actualidad, el ensayo de ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay) y el ensayo serológico denominado EITB (enzyme-linked immunotransfer blot) con antígeno total o fracciones purificadas de antígenos de *T. solium*, son los más usados. Para ambos ensayos se han reportado varios porcentajes de sensibilidad (porcentaje de resultados positivos por el ensayo de un grupo de muestras confirmadas para NCC) y especificidad (porcentaje de resultados negativos en el ensayo de un grupo de muestras utilizadas como control) (7, 8). Las diferencias entre la sensibilidad y especificidad para estos ensayos dependen de las muestras utilizadas en cada trabajo, ya que, se han observado reacciones cruzadas con muestras provenientes de pacientes con otras infecciones helmínticas.

Se ha reportado que EITB puede diagnosticar pacientes con lesiones múltiples (>2 cisticercos) (6, 9). Esta técnica utiliza una mezcla de antígenos de *T. solium* que es difícil de obtener sin equipo sofisticado. En un estudio realizado por Correa y cols. compararon los ensayos de ELISA e EITB para diagnosticar NCC, y demostraron que EITB es más sensible que ELISA especialmente cuando se utiliza con suero. Así mismo, encontraron que ambas técnicas son más sensibles para detectar casos con múltiples cisticercos vivos que casos con un cisticerco vivo o lesiones calcificadas (10).

En los últimos años se han buscado otras fuentes de antígenos para diagnosticar NCC. La obtención de antígenos de *T. solium* es difícil y laboriosa, ya que la única fuente proviene de cisticercos en carne de cerdo infectada. Algunos estudios describen el diseño de inmunodiagnósticos sustituyendo antígenos de *T. solium* por aquellos de *Taenia crassiceps* (8, 11, 12, 13, 14). En un reporte, utilizando ensayos de ELISA, ambas mezclas totales de antígenos detectaron la NCC en muestras de LCR de pacientes enfermos mientras que no reaccionaron con las muestras de pacientes control (8). Otro reporte analiza la eficacia de los diferentes inmunodiagnósticos como fijación de complemento, ELISA y Western blot para detectar la NCC usando antígenos de *T. crassiceps* y *T. solium* en LCR (11). Actualmente, para la obtención de antígenos de *T. crassiceps* se cuenta con un modelo murino donde los cisticercos se reproducen asexualmente en el peritoneo del ratón. De esta forma se pueden obtener antígenos, no relacionados a *T. solium*, que pueden detectar la NCC en muestras de LCR y suero de pacientes.

2.4 Expresión de antígenos en la superficie del fago filamentoso M13 y su aplicación en el inmunodiagnóstico de NCC.

En el 80 – 90% de los casos con NCC se encuentran anticuerpos en suero y LCR. Al menos 50 bandas electroforéticas han sido detectadas en Western Blot utilizando antígeno total de *T. solium* y muestras de pacientes con NCC (1). Sin embargo, hay un 10% de pacientes confirmados con NCC que no presentan anticuerpos al momento del ensayo, mientras que los pacientes con NCC serológicamente negativos presentan una lesión o algunas lesiones calcificadas. La presencia de anticuerpos en suero y LCR ha permitido desarrollar varios inmunodiagnósticos para NCC, sin embargo, hay problemas (la reactividad cruzada con infecciones parasitarias no relacionadas a NCC, poca representación de los antígenos empleados, falta de discriminación entre formas activa e inactiva de NCC y exclusión entre la NCC y la cisticercosis en otras partes) que no han sido resueltos. De aquí surge la necesidad de identificar y caracterizar epitopos o antígenos específicos con el fin de mejorar los ensayos existentes. El escaso conocimiento que se tiene acerca de los genes de este parásito y su organización limitan esta búsqueda. Recientemente, Manoutcharian y cols. han identificado una secuencia de un antígeno partir de una biblioteca de ADNc de *T. crassiceps* (15), así mismo, hay otros reportes que describen el perfeccionamiento del ensayo EITB utilizando antígenos recombinantes obtenidos de una biblioteca de ADNc de *T. solium* (16, 17). En el presente trabajo se pretenden expresar antígenos de *T. crassiceps* en la superficie del fago filamentoso para después evaluar los fagos recombinantes en ensayos de bioselección y determinar su potencial para diagnosticar NCC. La estrategia consiste en emplear la técnica de Phage Display que permite expresar hasta 10^9 diferentes péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpos (Fab o scFv) fusionados al gen de la proteína III (pIII) o al de la proteína VIII (pVIII) en la superficie del fago filamentoso M13 (18, 19, 20, 21).

La primera biblioteca de péptidos descrita fue de Scott y Smith (22). Actualmente, esta técnica ha permitido estudiar las interacciones de varios complejos como aquellos de antígeno-anticuerpo o ligando-receptor además de resultar útil para la expresión de fragmentos de genes individuales o del genoma completo de varios organismos (23, 24, 25, 26).

Las bibliotecas construídas, en los diferentes trabajos, fueron sometidas a un ensayo de bioselección denominado 'biopanning' que consiste en colocar el fago recombinante con moléculas blanco (anticuerpos, proteínas, péptidos, etc) para permitir la interacción de ambos. Los fagos que tienen gran afinidad por la molécula blanco son eluidos y amplificados para someterlos a una nueva bioselección. Las ventajas que tiene este sistema de expresión y bioselección son: selecciona fagos recombinantes con afinidad por el blanco a partir de una población de hasta 10^9 diferentes fagos recombinantes en un procedimiento fácil y rápido, además, se obtiene una población enriquecida de fagos recombinantes con afinidades por la molécula blanco. Una característica de este sistema de expresión es que permite identificar epítomos, relacionados con el antígeno estudiado, y mimótopos, que son secuencias no relacionadas con el antígeno original pero que son capaces de mimetizar la unión original del antígeno con su epítomo. El potencial de este sistema es grande y ha despertado gran interés para utilizarlo con ADN complementario (ADNc). Sin embargo, es imposible clonarlos directamente en el extremo 5' del *gen III* o *gen VIII* de M13 por los codones de terminación, la cola poli-A y las regiones no traducibles en sus extremos 3'. Cramer y cols. generaron el vector de expresión pJuFo, basado en la interacción de los 'zippers' de leucina de Jun y Fos, que les permitió expresar ADN complementarios fusionados indirectamente a pIII (27, 28). Los zippers de leucina interactúan con gran afinidad para mantener estable al complejo AP-1, formado por Jun y Fos.

Otra estrategia describe la expresión de ADNc mediante la fusión directa al carboxilo terminal de la proteína VI (pVI) en la superficie del fago (29), el carboxilo terminal de esta proteína está orientado hacia la superficie del fago. En el presente trabajo se evaluó una biblioteca de ADNc de *T. crassiceps* con el fin de identificar fagos recombinantes cuyas secuencias recombinantes codifiquen antígenos que puedan tener la capacidad de diagnosticar la NCC en muestras de suero y LCR de pacientes. La biblioteca de ADNc se expresa en el amino terminal de pVIII en la superficie del fago filamentososo M13. El amino terminal de esta proteína queda expuesto en la superficie del fago, facilitando la interacción del antígeno recombinante con la molécula blanco en un 'biopanning'. La ventaja de clonar ADNc en pVIII es que los fragmentos recombinantes serán expresados en mayor número de copias a diferencia de otras proteínas del fago (si se clona en pIII o pVI se obtendrán menos de cinco copias). Para construir la biblioteca se eliminaron las regiones no codificadoras y la cola poli-A del ADNc utilizando una exonucleasa. Después de amplificar los diferentes ADNc por PCR, se clonaron unidireccionalmente en un fagémido. Los fagémidos están formados por un origen de replicación del fago, la señal de empaquetamiento del fago filamentososo, el origen de replicación del plásmido, un gen que codifica para alguna proteína de la superficie del fago (pIII, pVIII, pVI) y algunos genes resistentes a la acción de antibióticos (ampicilina, tetraciclina). En este caso, los diferentes ADNc se clonaron en pG8SAET (30) que tiene el *gen VIII* que codifica para la proteína pVIII de la capsida del fago. Para obtener esta biblioteca de fagos recombinantes se utilizó un fago ayudador que activa el origen de replicación del fago en el plásmido y provee todas las proteínas restantes para formar la capsida del fago, incluyendo pVIII silvestre. Por lo tanto, los fagos recombinantes tendrán una mezcla de proteína pVIII silvestre y recombinante. En este sistema una de nueve clonas puede expresar ADNc en el marco de lectura correcto.

La expresión de antígenos de *T. crassiceps* en la superficie del fago filamentoso M13 ofrece una alternativa viable para identificar antígenos que específicamente puedan diagnosticar la NCC. La estrategia de expresión y bioselección, realizadas en el presente trabajo, constituyen una estrategia con alto potencial en la aplicación de un inmunodiagnóstico para NCC utilizando fagos recombinantes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. OBJETIVO GENERAL

Expresar antígenos de *Taenia crassiceps* en la superficie del fago filamentoso M13 y evaluar los fagos recombinantes seleccionados en las bioselecciones para determinar su potencial diagnóstico en NCC.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Construir una biblioteca de ADNc de *Taenia crassiceps* expresada como fusión al amino terminal de la proteína VIII (pVIII) en la superficie del fago M13.
- b. Realizar bioselecciones con un suero de ratón inmunizado con fluido vesicular de cisticercos de *Taenia solium* y LCR de pacientes con NCC.
- c. Analizar las secuencias obtenidas de las clonas seleccionadas en las diferentes bioselecciones.
- d. Realizar ensayos de ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay) con las clonas escogidas utilizando suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de cisticercos de *T. solium* y LCR de pacientes con NCC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de una biblioteca de ADN complementario de *Taenia crassiceps* (PSK) clonada en el fagémido pBluescript SK (15) se construyó una nueva biblioteca (LPSK) cuyos insertos, teóricamente, no presentan la cola de poli-A y la región no traducida en el extremo 3'. Estas modificaciones se realizaron de la siguiente manera: Aproximadamente 2µg de ADN de la biblioteca PSK, donde originalmente fue clonado el ADNc en los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*, se digirió con las enzimas *KpnI* / *XhoI* (aprox. 1U de cada enzima). Las regiones no deseadas (poli-A y no traducidas en el extremo 3') se eliminaron con Exonucleasa III (GIBCO). Previamente se realizó un ensayo para monitorear la degradación del ADN con ExoIII incubando 0.5 min, 1 min y 1.5 min. Para la construcción de la biblioteca se incubó por 1 min con ExoIII para obtener fragmentos no tan degradados como se observó con 1.5min de incubación. Cabe mencionar que el extremo 3' generado por *KpnI* es resistente a la acción de ExoIII mientras que el extremo 5', en el sitio *XhoI*, es susceptible. Los extremos cohesivos se convirtieron en romos (blunt) con la nucleasa Mung/Bean (GIBCO) y religaron en el sitio *KpnI* en el extremo 3' del plásmido.

La estrategia para expresar los diferentes insertos, en la superficie del fago, consistió en fusionarlos al amino terminal de pVIII en M13 (este extremo se encuentra expuesto en la superficie del fago mientras que el carboxilo esta orientado hacia el interior). Para lograr esto, se amplificaron los insertos de LPSK por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (figura 2) con sitios de restricción internos, *SnaBI* y *NcoI*, para clonarlos en el fagémido. Se realizaron 8 reacciones y los productos de PCR aparecieron como un barrido de muchas bandas con diferentes tamaños. Este ADN se precipitó con etanol absoluto (ver protocolos), se digirió con *SnaBI* y *NcoI* y eluyeron, de un gel de agarosa al 1%, los productos que tuvieron un tamaño de 500 pb - 2.5 kb. Los fragmentos eluidos se clonaron en el vector pG8SAET, digerido previamente con ambas enzimas.

Oligonucleótidos Utilizados para Amplificar los Insertos en LPSK

Oligonucleótido 5'

5' GTTCGTACCATGGAGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTC 3'

Oligonucleótido 3'

5' GTTCCATACGTACACTATAGGGCGAATTGG 3'

Figura 2: Oligonucleótidos utilizados en PCR para amplificar los insertos en LPSK. El oligonucleótido 5' contiene el sitio de restricción *NcoI* (azul) mientras que el oligonucleótido 3' tiene *SnaBI* (rojo). La región verde en ambos indica la secuencia de anclaje en los extremos 5' (oligo 5') y 3' (oligo 3') del vector pBluescript donde esta clonada esta biblioteca.

Cinco reacciones de ligación se purificaron con el kit Concert Rapid PCR Purification System (GIBCO BRL) y se electroporaron en células electrocompetentes *Escherichia coli* cepa TG1 (New England BioLabs): A 45 μ l de células electrocompetentes se agregaron 2 μ l de ligación purificada. Las células se colocaron en una celda (Eppendorf) fría y dejaron en hielo. Se retiraron las burbujas de aire, que se pudieron formar al agregar las células, usando agujas estériles. Las células se electroporaron y, rápidamente, se agregó 1 ml de medio SOC (Invitrogen). Todas las electroporaciones se colocaron en un tubo (Falcon) e incubaron a 37°C durante 1 h sin agitación.

La diversidad de la biblioteca se obtuvo sembrando, en cajas con medio LB y ampicilina [100 µg/ml], 5 µl, 50 µl y 200 µl del cultivo de células mencionado antes (incubación 37°C durante toda la noche). Para obtener las partículas de los fagos recombinantes se agregó, al cultivo de células electroporadas, medio LB con ampicilina [100 µg/ml] (incubación 2 hrs a 37°C a 225 rpm). Parte de este cultivo se infectó con fago ayudador M13KO7 (Invitrogen). El cultivo infectado se amplificó a 37°C durante toda la noche (225 rpm) con medio LB, ampicilina [100 µg/ml] y kanamicina [50 µg/ml]. La biblioteca de fagos recombinantes se purificó y resuspendió en un volumen final de 200µl de TBS. Así mismo, se guardaron gliceroles del cultivo de células electroporadas no infectadas con fago ayudador a -70°C y purificó ADN que se guardó a -20°C.

Con esta biblioteca se realizaron tres bioselecciones utilizando: a) Un suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium* y b) LCR de pacientes diagnosticados con NCC. El formato de dos bioselecciones consistió en sensibilizar 4 o más pozos de una placa de ELISA con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (Goat anti-mouse IgG Zymax). Estos pozos se bloquearon con PBS 1X/ albúmina 2% y la biblioteca se agregó (10^{11} fagos / pozo). Las clonas seleccionadas se eluyeron y neutralizaron. En la última bioselección, 4 pozos de una placa de ELISA fueron sensibilizados con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de humano (mouse anti-human IgG ZyMed), se bloquearon con PBS 1X/ albúmina 1%. En un tubo eppendorf se colocó la biblioteca con el 'pool' de LCR proveniente de pacientes con NCC y PBS 1X/ albúmina 1%, 100µl de esta mezcla se agregaron a los pozos sensibilizados y bloqueados. Los fagos seleccionados se eluyeron y neutralizaron. Finalmente, se seleccionaron clonas al azar de cada bioselección y rescataron los fagos recombinantes para analizarlos en ensayos de ELISA usando el suero de ratón mencionado antes y LCR de pacientes con NCC. Los insertos de estas clonas fueron secuenciados utilizando el estuche de Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing Kit (USB).

5. RESULTADOS

La biblioteca de ADNc de *T. crassiceps*, expresada como fusión en el amino terminal de pVIII en la superficie del fago, se construyó a partir de una biblioteca denominada LPSK. Los insertos (ADNc) en esta biblioteca carecen de las colas poli-A y las regiones no codificadoras en el extremo 3' (figura 3).

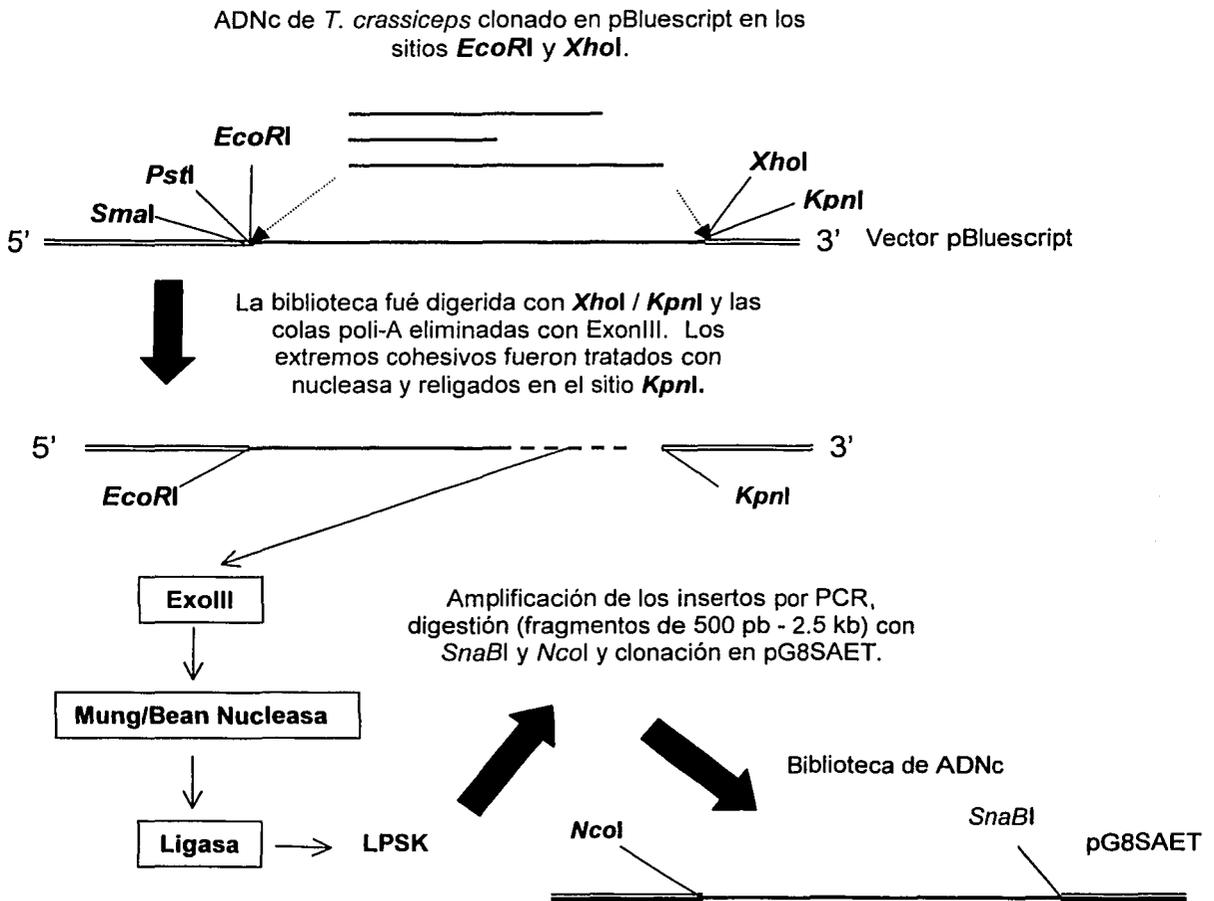


Figura 3: Representación esquemática de la construcción de la biblioteca de ADNc de *T.*

Los insertos en LPSK fueron amplificados por PCR y presentaron un tamaño de 200 pb – 2.5 kb. Aquellos de 500 pb – 2.5 kb fueron clonados en el fagémido p8GSAET en los sitios *SnaBI* y *NcoI* (figura 4). Las reacciones de ligación fueron electroporadas en *E. coli* TG1 y la biblioteca rescatada tuvo una diversidad de 1×10^6 clonas recombinantes.

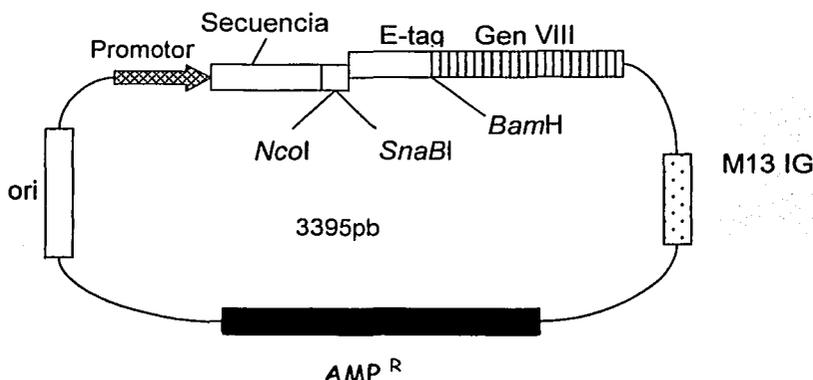


Figura 4: Mapa del fagémido p8GSAET. Este vector contiene el promotor y la secuencia señal de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, una secuencia que codifica para un péptido de 13 aminoácidos (E-tag) y el gen de la proteína VIII de superficie del fago. El péptido se encuentra fuera de fase con respecto a la secuencia señal y en fase con el gen VIII, de esta manera el péptido solo se expresará en clonas que tengan un inserto que reestablezca el marco de lectura correcto. De acuerdo con un estudio realizado por Frykberg y cols., este vector es capaz de disminuir la selección de clonas con insertos fuera de fase en una bioselección (30).

Se realizaron tres bioselecciones empleando un suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium* o un 'pool' de LCR de pacientes con NCC. Las características de las bioselecciones realizadas se resumen en la Tabla 1.

| Bioselección | Antígeno | Preabsorción | Amortiguador de elución | Amortiguador de neutralización | Número de rondas |
|--------------|--|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|------------------|
| 1 | Suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de <i>T. solium</i> | | Glicina/HCl PH 2.2 | TRIS Base | 1 |
| 2 | Suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de <i>T. solium</i> | Suero de ratón inmunizado con TBS | Glicina/HCl PH 2.2 | TRIS Base | 2 |
| 3 | Pool de LCRs de pacientes con neurocisticercosis | | Trietilamina | TRIS HCl | 2 |

Tabla 1: Resumen de las diferentes bioselecciones realizadas con la biblioteca de ADNc de *T. crassiceps*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las tres bioselecciones se obtuvieron los siguientes títulos de fagos eluidos (Tabla 2).

| <u>Bioselección</u> | <u>Input</u> | <u>Output</u> | <u>Ronda</u> | <u>No. clonas analizadas</u> |
|---------------------|----------------------|---------------------|--------------|------------------------------|
| 1 | 4.3×10^{11} | 2.8×10^5 | 1 | 8 |
| 2 | 4.3×10^{11} | 4.9×10^6 | 1 | |
| | 1×10^{11} | 5.28×10^7 | 2 | 8 |
| 3 | 4.3×10^{11} | 1.13×10^5 | 1 | |
| | 1×10^{11} | 5.035×10^7 | 2 | 8 |

Tabla 2: Títulos de los fagos eluidos en las diferentes bioselecciones utilizando la biblioteca de ADNc de *T. crassiceps*

En la segunda bioselección se observa un enriquecimiento de 10 veces entre el título obtenido de la primera ronda y la segunda. En la bioselección 3, el enriquecimiento fue de 100 veces entre la primera y segunda rondas. De cada bioselección se picaron 8 clonas al azar y se analizó el tamaño de sus insertos por restricción enzimática con *Bam*HI y *Nco*I. En la figura 5 se muestran los diferentes insertos de las ocho clonas correspondientes a la bioselección 1, como se puede observar el tamaño de estos varía de 150 - 450 pb.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

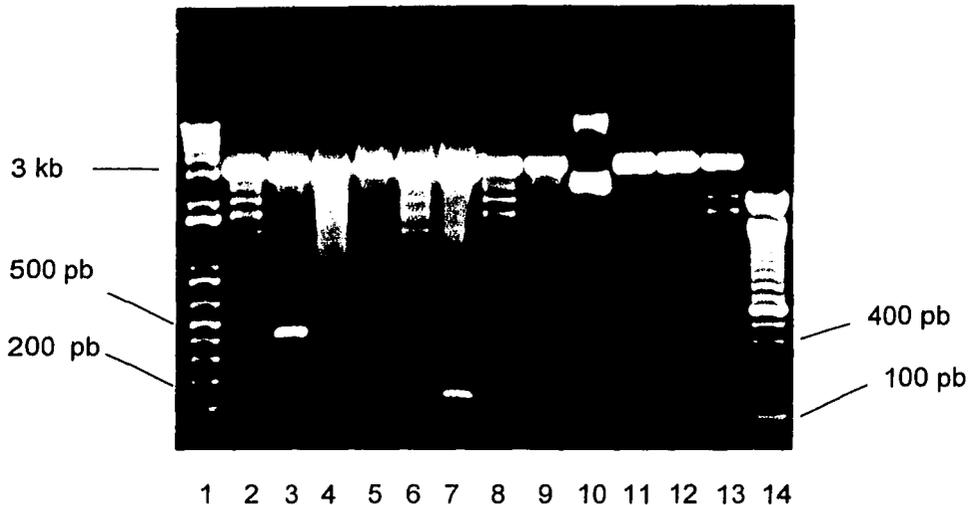


Figura 5: Gel de agarosa al 1% con las ocho clonas de la bioselección 1. Líneas: 1, marcador de peso molecular de 1 Kb (GIBCO); 2-9, ocho clonas digeridas con *Bam*HI y *Nco*I; 10, fagémido pG8SAET sin inserto no digerido; 11, pG8SAET digerido con *Nco*I; 12, pG8SAET digerido con *Bam*HI; 13, pG8SAET digerido con *Bam*HI y *Nco*I; 14, marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Las clonas seleccionadas en las bioselecciones 2 y 3 tuvieron tamaños muy similares a los mostrados en la figura 5. Las 24 clonas escogidas de las tres bioselecciones se rescataron y, en la mayoría, se obtuvieron títulos de 1×10^{13} , se realizaron ensayos de ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay) con el suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium* y un 'pool' de LCR de pacientes diagnosticados con NCC, ambos utilizados en las bioselecciones. En cada ensayo de ELISA, las clonas recombinantes y el fago no relacionado se evaluaron por duplicado a una absorbancia de 405nm (A_{405nm}).

El valor final para cada fago se obtuvo promediando el duplicado correspondiente y el valor de corte, para considerar a una clona positiva, se calculó obteniendo el promedio de los valores finales de cada clona (incluyendo al fago control y el control positivo, extracto vesicular de *T. solium*) con un suero de ratón inmunizado con TBS o un 'pool' de LCR de pacientes con otras enfermedades neurológicas y, sumando a este valor, tres veces la desviación estándar de los mismos valores.

En los ensayos realizados con las clonas pertenecientes a las bioselecciones 1 y 2 se utilizaron el suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium*, mencionado antes, y un suero de ratón inmunizado con TBS. Los valores obtenidos, con ambos sueros, para el fago no relacionado (control) fueron inconsistentes en cada ensayo efectuado, a pesar, de que se apreciaban diferencias entre las reactividades de los fagos recombinantes con estos sueros. Por la inconsistencia observada en los valores del fago control, no se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas para los fagos recombinantes.

Con las clonas pertenecientes a la bioselección 3 se utilizaron el 'pool' de LCR positivo para NCC, y un 'pool' de LCR de pacientes con otras enfermedades neurológicas. En estos ensayos se obtuvieron reactividades muy bajas, probablemente, como resultado de la concentración utilizada, 1:160. De las ocho clonas analizadas, siete (87.5%) fueron consideradas positivas estadísticamente (Tabla 3). La diferencia entre los valores obtenidos por las clonas y el fago no relacionado con los LCR positivo para NCC y LCR con otras enfermedades neurológicas, indican que los fagos recombinantes positivos reconocen anticuerpos específicos en el LCR positivo para NCC que no están presentes en el LCR con otras enfermedades neurológicas y, que esta diferencia de reactividades, se debe al producto génico que expresan en la superficie y no a la secuencia no relacionada expresada en la superficie del fago control.

| Clona | LCR positivo para NCC Dilución 1:160 | LCR con otras enfermedades neurológicas Dilución 1:160 |
|------------------|--|--|
| 31 | 0.176 | 0.024 |
| 32 | 0.151 | 0.021 |
| 33 | 0.181 | 0.021 |
| 34 | 0.179 | 0.018 |
| 35 | 0.199 | 0.020 |
| 36 | 0.167 | 0.021 |
| 37 | 0.166 | 0.020 |
| 38 | 0.081 | 0.024 |
| Fago control L16 | 0.084 | 0.022 |
| Control Positivo | 1.532 | 0.034 |

Tabla 3: Valores de las ocho clonas seleccionadas (31-38) en la bioselección 3. El control positivo utilizado para este ensayo fue extracto total de *T. solium*. Los valores positivos están marcados en negritas.

Los resultados obtenidos en ELISA para las 24 clonas no eran esperados, ya que teóricamente, las clonas deberían reconocer los anticuerpos, presentes en el suero de ratón inmune o LCR positivo para NCC, con los que fueron originalmente seleccionadas. Por esto, se realizaron más ensayos de ELISA para probar la reactividad de los fagos eluidos de cada ronda, y entonces, descartar la posibilidad de una bioselección mal realizada. Por otro lado, se probaron 'pools' de cada grupo de 8 clonas seleccionadas para analizar el comportamiento de los fagos recombinantes en conjunto, ya que en forma individual, todos reaccionaban poco con el LCR positivo para NCC (figura 6).

El único grupo de fagos recombinantes que no resultó positivo fue el 'pool' 2, correspondiente a las ocho clonas escogidas en la bioselección 2. De los grupos de fagos recombinantes considerados positivos, el pool 1 presentó la reactividad más alta. El valor obtenido para el fago control se mantuvo por debajo de los positivos. La dilución ocupada en este ensayo (1:200) es realmente baja, ya que, en LCR se encuentra un bajo nivel de anticuerpos. Por esta razón, el ensayo se repitió ocupando una dilución 1:100 para observar el comportamiento del 'pool' 1 y los grupos restantes de fagos recombinantes considerados positivos, en este ensayo se incluyeron los fagos recombinantes de forma individual obtenidos en las bioselecciones 1 y 3 (figura 7). Para los grupos de clonas recombinantes se utilizaron 10^{10} fagos de cada clona. Como se aprecia en la gráfica, las clonas individuales de las bioselecciones 1 y 3 y los grupos de los fagos de las bioselecciones 2 y 3 presentaron una reactividad baja pese al aumento en la concentración de LCR. El 'pool' 1 aumentó su reactividad dos veces en comparación con el ensayo anterior (figura 6) y representó el 43% de la reactividad obtenida por el control positivo en este ensayo. Este aumento corresponde al incremento en la concentración de LCR utilizada para este ensayo. A nivel estadístico, los fagos 1, 2, 3, 4, 5, 7 (bioselección 1), 35 (bioselección 3) y 'pool' 1 (ocho clonas de la bioselección 1) fueron considerados positivos, el fago no relacionado GM45 se mantuvo por debajo de estos valores. Para probar que tan eficiente es el 'pool' 1 en identificar muestras positivas para NCC de aquellas negativas, se realizaron ensayos de ELISA utilizando LCR de pacientes candidatos a tener un diagnóstico positivo para NCC y LCR de pacientes candidatos a presentar un diagnóstico negativo (figura 8). A diferencia de los LCR utilizados anteriormente, estos no tienen un diagnóstico definitivo para NCC, por esto, son pacientes candidatos. En este ensayo se utilizaron ocho LCR de posibles pacientes con NCC, y tres (no. 2, 5, 6) resultaron positivos estadísticamente. Los LCR de pacientes, candidatos a presentar un diagnóstico negativo, no reaccionaron con el 'pool' 1. El fago no relacionado M13 no reaccionó con ningún LCR.

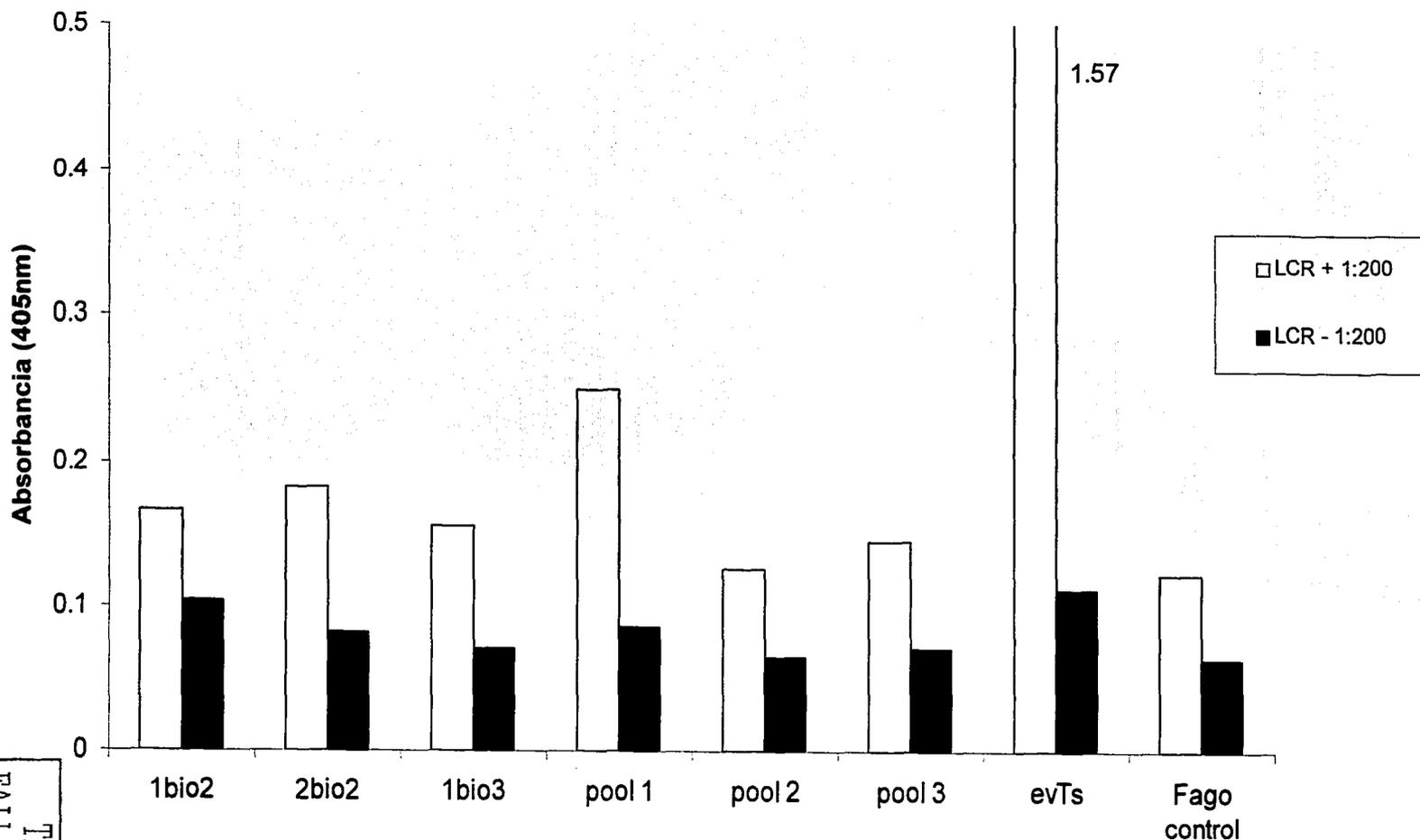


Figura 6: Ensayo de ELISA utilizando LCR positivo para NCC y LCR con otras enfermedades neurológicas en una dilución 1:200 con los fagos eluidos (amplificados) y 'pools' de las clonas seleccionadas: 1bio2, primera ronda de la bioselección 2; 2bio2, segunda ronda de la bioselección 2; 1bio3, primera ronda de la bioselección 3; pool 1, ocho clonas de la bioselección 1; pool 2, ocho clonas de la bioselección 2; pool3, ocho clonas de la bioselección 3; evTs, extracto vesicular de *T. solium* como control positivo y fago control (expresa una secuencia no relacionada en el amino terminal de pVIII de M13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

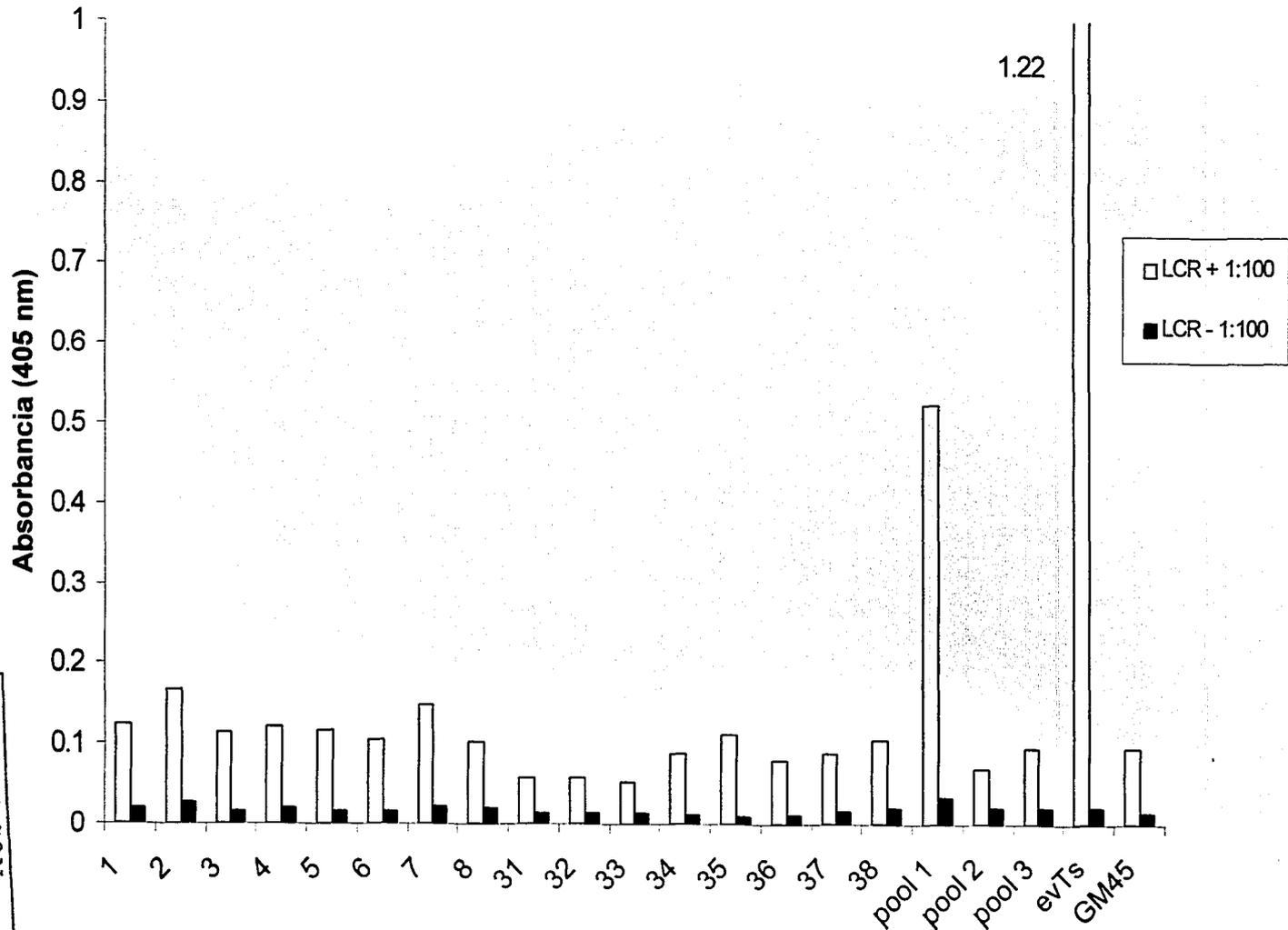
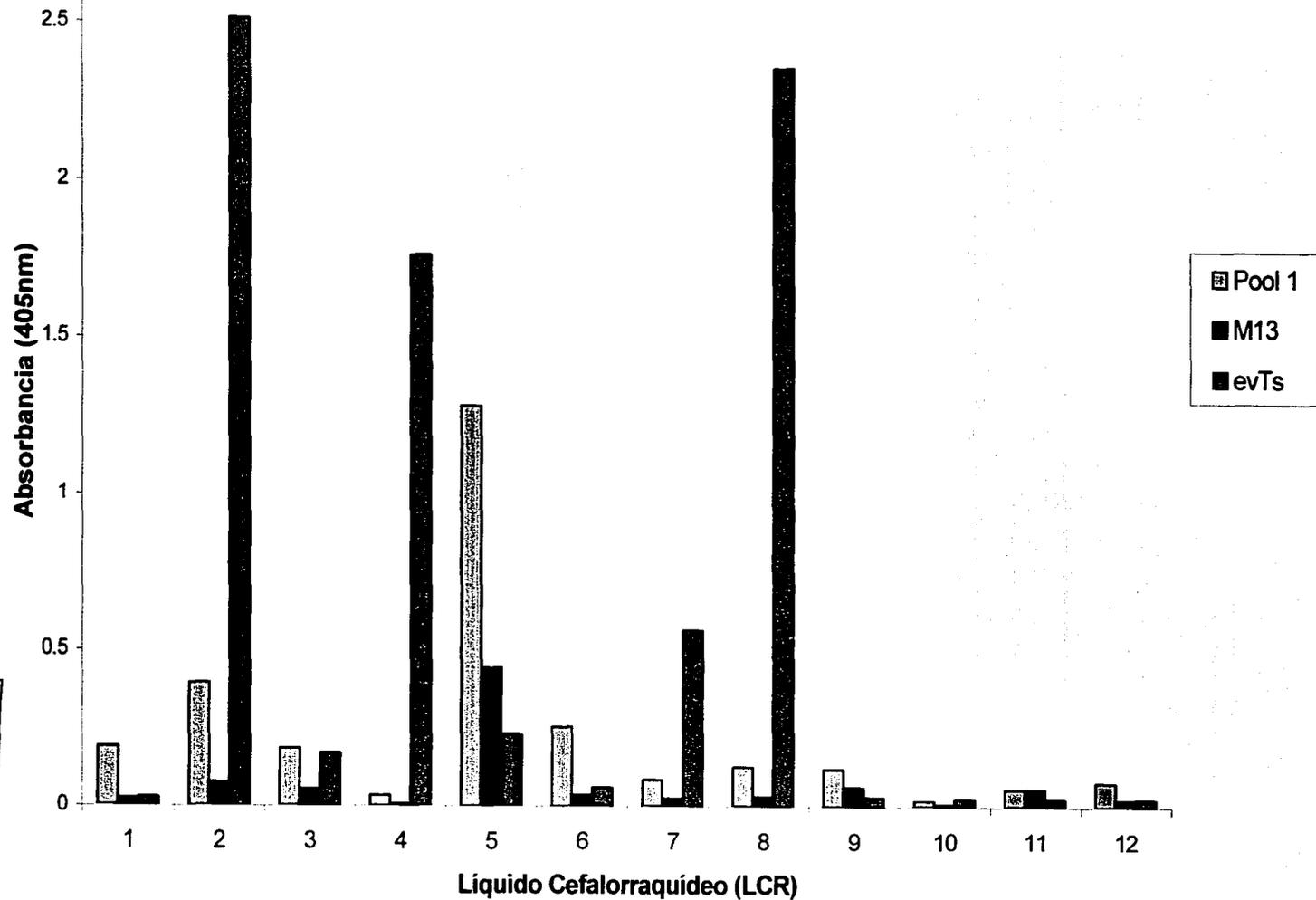


Figura 7: Ensayo de ELISA empleando el 'pool' de LCR positivo y 'pool' de LCR con otras enfermedades neurológicas con fagos recombinantes individuales y en grupos: 1-8, representan ocho clonas de la bioselección 1; 31-38, clonas correspondientes a la bioselección 3; pool 1, grupo de las clonas de la bioselección 1; pool 2, grupo de clonas de la bioselección 2; pool 3, grupo de clonas de la bioselección 3; evTs, extracto vesicular de *T. solium*; GM45, fago no relacionado que expresa una secuencia no relacionada en el amino terminal de pVIII en M13.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 8: Ensayo de ELISA con el 'pool 1' formado por seis clonas. LCR 1 – 8 representan muestras de pacientes candidatos a tener NCC y LCR 9 – 12 son muestras de pacientes candidatos a no tener NCC. La dilución utilizada para los LCR fue 1:40. El control positivo fue extracto total de *T. solium* (evTs) y el fago no relacionada fue M13 silvestre.

Simultáneamente a los ensayos de ELISA, se secuenciaron los insertos de todas las clonas escogidas. Al analizarlas, se encontró un artefacto de clonación, proveniente del vector pBluescript. Las secuencias se analizaron a nivel nucleótido y aminoácido para encontrar alguna homología, así mismo, se determinó si estos péptidos se expresan en el marco de lectura correcto en el vector donde fueron clonados. En total, se han completado 11 secuenciaciones de insertos de fagos recombinantes (siete clonas de la bioselección 1, una de la bioselección 2 y cuatro de la bioselección 3) y 7 (64%) se expresan en la superficie del fago filamentoso.

A continuación se presentan las homologías a nivel nucleótido encontradas para algunas clonas que se expresan en la superficie del fago (figura 9). Se encontraron homologías con *Solanum tuberosum*, *Schistosoma japonicum*, *Cavia porcellus* y *Echinococcus granulosus*. El porcentaje de homología encontrado para las secuencias en estudio fue de 89 – 100%. Con respecto el análisis de estas secuencias a nivel aminoácido, no se encontraron resultados significativos en blastp (NCBI) utilizando la búsqueda estándar. Sin embargo, los péptidos en la figura 9 fueron sometidos a otro análisis en blastp utilizando la búsqueda para encontrar homologías cortas y exactas. En la figura 10 se resumen los resultados de esta búsqueda. El porcentaje de homología para las secuencias analizadas fue de 62 – 80%. Así mismo, dos secuencias obtenidas de fagos recombinantes, escogidos en la bioselección 1, presentaron una secuencia de ocho aminoácidos (PNSARAAR). Esta secuencia fue analizada en blastp para encontrar posibles homologías (figura 11). El porcentaje de homología encontrado para esta secuencia fue de 75 – 85% y los péptidos homólogos encontrados provienen de proteínas como: canales de Na⁺ presentes en los cerebros de ratón y rata, así como también proteínas notch 4 presentes en los cerebros de humano y ratón.

Péptido Expresado en pVIII del Fago M13

(No. de clonas con la misma secuencia)

Homología a Nivel Nucleótido

(No. de Acceso, % de Homología)

AADAPNSARAAR (1)

GCAGCGGATGTGCCGAATTCGGCACGAGCGGCA
240 GTGCCGAATTCGGCACGAGCGGCA 263Región codificadora de la proteína oxidasa ACC de *Solanum tuberosum*
(AY098939.1, 100%)

GTELVPSARAAR (1)

GGCACGGAGCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGCGGCA
54 GCTCGTGCCGAATTCGGCACGAGC 77Región no codificadora del gen de la trifosfato isomerasa de *Schistosoma japonicum*
(U50847.1, 100%)

GTSEMHSIALALLAVVAEENN (2)

GGCACGAGCGAGATGCATTCCTC A TCGCCCTCTCGCCCTCCTTGCTGTCGTCGCCGTCTCTGCTGAAGAGAACAAC
1001 CCTC C TCGCCCTCTCGCCCTCCT 1024Región codificadora de la proacrosina de *Cavia porcellus*
(Z12153.1, 95%)

GTRDVGGGGCQEGRWCSRVV (1)

GGCACGAGGGATGTCGG CG GAGG T GGTTGTCAAG A AGGT C GATGGCGATGCTCTCGAGTTGGGGT
9 ATGTCGG TA GAGG C GGTTGTCAAG C AGGT G GATGGCGATGCTCTCGAG 56Región codificadora del gen de la tioredoxina de *Echinococcus granulosus*
(AF034637, 89%)

Figura 9: Péptidos que se expresan como fusiones en el amino terminal de pVIII en M13. Las secuencias de nucleótidos se analizaron en BLASTN (NCBI). En la figura se muestra el alineamiento de las secuencias en estudio (rojo) con las secuencias homólogas encontradas (azul).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Alineación entre los péptidos expresados en pVIII del fago M13 y los posibles péptidos homólogos

Homología a nivel aminoácido

(No. de acceso NCBI, % de homología)

AADA P N SARAAR

256 **ADA L N AARAA** 265

Proteína queA de la biosíntesis de tRNA
ribosiltransferasa de *Caulobacter crescentus* (Q9A7Y2, 80%)

GT E L VPNS AR AAR

1267 **GT GLI E V VPNS ET AAR** 1282

Fosfatidilinositol 3 cinasa de
Dictyostelium discoideum (P54675, 62%)

GTSEMHS LI A LLAL L AV V AVSAEENN

109 **LI V LLAL I AV I AVS** 122

Serinproteasa periplásmica de *Methanosarcina mazei* (AAM30562.1, 78%)

Figura 10: Péptidos homólogos encontrados para los péptidos que se expresan en pVIII del fago M13. En negritas se muestran los péptidos en estudio mientras que las regiones homólogas están en azul.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**Alineación entre la secuencia consenso
y los posibles péptidos homólogos**

Homología a nivel aminoácido
(No. de acceso NCBI, % de homología)

PNSARAAR

| | |
|--------------------|--|
| 1740 NNARAAR 1746 | Proteína homóloga Notch 4 de ratón (P31695, 85%) |
| 1745 NNARAAR 1751 | Proteína homóloga Notch 4 de humano (hNotch4) (Q99466, 85%) |
| 224 PNPARSAR 231 | Subunidad α del canal de Na^+ independiente de voltaje de ratón (Q61180, 75%) |
| 1059 PNSAKTAR 1066 | Canal de Na^+ del cerebro de ratón (P97445, 75%) |
| 1107 PNSAKTAR 1114 | Canal de Na^+ del cerebro de rata (P54282, 75%) |

Figura 11: Alineación entre la secuencia consenso y los péptidos homólogos encontrados. El péptido consenso está en negritas mientras que las regiones homólogas en los otros péptidos se muestran en azul.

6. DISCUSIÓN / CONCLUSIÓN

La biblioteca de ADNc de *T. crassiceps*, construida en este trabajo, es la primera en ser expresada directamente como fusión al amino terminal de pVIII en el fago M13. En las tres bioselecciones realizadas, los insertos de las clonas escogidas resultaron pequeños, un análisis previo mostró que el tamaño de los insertos de la biblioteca sin seleccionar estaban entre 100 – 600 pb aproximadamente. En un trabajo por Hoogenboom y cols., utilizando una biblioteca de ADNc de una línea celular de cancer colorectal, expresada en la superficie del fago (29), ocurrió lo mismo a lo reportado en este trabajo. Los insertos de los fagos seleccionados resultaron más pequeños que los insertos analizados en la biblioteca antes de la bioselección. Lo que se observa en ambos trabajos puede ser el resultado de la selección negativa que hubo contra fagos, que expresan proteínas grandes de *T. crassiceps*, en un 'biopanning'. Otra posibilidad es que algunas secuencias recombinantes generaron productos tóxicos para la bacteria.

El criterio para evaluar los insertos de los fagos recombinantes, elegidos en cualquier bioselección, consistió en analizar el marco de lectura en el vector donde están clonados y buscar homologías a nivel nucleótido y aminoácido. El 64% de las clonas analizadas se expresan en la superficie del fago filamentososo y el 36% restante requiere de un cambio en el marco de lectura, +1 o -1, para expresarse. Cabe mencionar, que algunos fagos recombinantes, que fueron clonados en el marco de lectura incorrecto, obtuvieron valores positivos en los ensayos de ELISA. La reactividad que muestran estos fagos indica que algunos pueden expresar los insertos clonados fuera del marco de lectura correcto. Este fenómeno ha sido descrito por Jacobsson y Frykberg quienes reportaron que las clonas seleccionadas de una biblioteca genómica de *Staphylococcus aureus* contra fibronectina, fibrinógeno o IgG presentaban saltos (frameshift) en el marco de lectura en los extremos 5' y 3' del inserto en el vector donde fueron clonados (31).

De acuerdo con estos autores, los hallazgos en este estudio indican que el mecanismo traduccional necesario para la expresión de polipéptidos, fusionados a pIII o pVIII en la superficie del fago, involucra 'ribosomal slippage'. En otro reporte, Mandecki et al describen el mismo fenómeno en clonas seleccionadas de un 'biopanning' utilizando una biblioteca de péptidos (32), además, reportan que las clonas seleccionadas con cambios en el marco de lectura dependen del blanco (proteína, anticuerpos, etc.) con que fueron seleccionadas.

Es probable que las secuencias seleccionadas de la biblioteca de ADNc de *T. crassiceps*, incorrectamente clonadas en el fagémido pG8SAET, se expresen en la superficie del fago por un cambio en el marco de lectura 'frameshift'. Esto posiblemente ocurra con un fago recombinante escogido en la bioselección 1 que tuvo un valor positivo en los ensayos de ELISA realizados y que posee homologías a nivel nucleótido del 89% y a nivel aminoácido del 81% con la región codificadora del gen de la tioredoxina de *E. granulosus*. Probablemente, la reactividad observada en ELISA se deba a que una porción del amino terminal de la tioredoxina (18 aa) se exprese por saltos en el marco de lectura del inserto en el vector donde esta clonado. De ocho clonas analizadas, correspondientes a la bioselección 1, dos presentan una secuencia consenso de ocho aminoácidos (PNSARAAR). Al analizar esta secuencia, se encontraron posibles homologías correspondientes a un sitio de glicosilación en la subunidad α del canal de Na^+ independiente de voltaje del ratón, regiones repetitivas ANK 4, 'ankyrin repeats', en las proteínas homólogas Notch 4 en el ratón y humano así como también, posibles dominios citoplásmicos en los canales de Na^+ en los cerebros de rata y ratón. Hasta el momento, no hay reporte alguno que describa la caracterización molecular y bioquímica de algún canal iónico en *T. crassiceps* o *T. solium*. Sin embargo, hay estudios que han caracterizado las propiedades de conductividad de canales iónicos presentes en *E. granulosus* (33, 34).

A pesar de que no se cuenta con las secuencias de estos canales, la secuencia de nucleótidos del consenso encontrado puede servir como sonda para encontrar las secuencias relacionadas a canales iónicos presentes en *T. crassiceps* o *T. solium*.

Por otro lado, para probar que tan eficiente es el 'pool' 1 en identificar muestras positivas para NCC de aquellas negativas, se realizaron ensayos de ELISA utilizando LCR de pacientes candidatos a ser diagnosticados con NCC y LCR de pacientes candidatos a tener otras enfermedades neurológicas, cabe mencionar que en dos muestras se cuenta con diagnósticos definitivos. En estos ensayos solo se utilizaron seis de las ocho clonas que originalmente forman este 'pool'. Las secuencias de las clonas eliminadas no se expresan en la superficie del fago: una clona presenta un codón de terminación a la mitad del inserto mientras que otra se encuentra fuera del marco de lectura en el fagémido donde está clonada. En la figura 8 se presentan los resultados preliminares de este ensayo, tres LCR de pacientes (no. 2, 5, 6), candidatos a tener NCC, resultaron positivos estadísticamente con el 'pool' 1. El LCR no. 2 proviene de un paciente con cisticercosis activa y fue reconocido por el control positivo, extracto total de *T. solium*, y el 'pool' 1. En el resto de las muestras de pacientes, con probable diagnóstico de NCC, el control positivo reaccionó con algunas. Esto se debe a que en estas muestras se encuentran pacientes que probablemente no tienen NCC. Es importante señalar, que cada paciente manifiesta diferente la NCC y la diferencia en las reactividades con el control positivo refleja la heterogeneidad de la infección. Por otro lado, el LCR no. 10, proveniente de un paciente sin NCC con diagnóstico confirmado, no reaccionó con el control positivo ni con el 'pool' 1. Es probable que en este grupo de fagos se presente un fenómeno de sinergia o cooperatividad, ya que los fagos recombinantes individuales no mostraron una reactividad similar a la obtenida por el grupo de éstos. Para evaluar con más precisión si este grupo de fagos es capaz de identificar una infección activa de una pasiva se requieren más muestras bien catalogadas.

En conclusión, es posible expresar una biblioteca de ADNc como fusión en el amino terminal de pVIII en la superficie del fago M13. Las bioselecciones permitieron identificar fagos que expresan péptidos derivados de *T. crassiceps*, dos secuencias de fagos seleccionados presentaron homologías a nivel nucleótido con dos parásitos: *E. granulosus* y *S. japonicum*. Es importante mencionar que hay pocas secuencias de genes reportados y caracterizados de *T. solium* y *T. crassiceps* (35), y que las secuencias obtenidas en este trabajo pueden utilizarse para caracterizar los genes a los que pertenecen. El potencial que representa esta biblioteca de ADNc en el inmunodiagnóstico de NCC es grande, en este trabajo se logró identificar un grupo de fagos recombinantes que reaccionaron específicamente con un pool de LCR de pacientes con NCC. Además, como lo muestran los resultados preliminares, probablemente, este grupo de fagos pueda identificar muestras de pacientes que se encuentran en una etapa activa de la infección. Sin embargo, hay que realizar más experimentos para evaluar la especificidad y sensibilidad de estos fagos. Así mismo, esta estrategia puede aplicarse con otras enfermedades. Finalmente, se planea: a) buscar más clonas usando la técnica de 'screening' en forma masiva utilizando placas de cultivo y b) analizar y caracterizar las nuevas clonas como se ha descrito en este trabajo (ELISA, secuenciación, etc).

7. REFERENCIAS

1. Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C. (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*. 1875 – 1890.
2. Román, G., et al. (2000). A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bulletin of the World Health Organization*. **78**: 399-406.
3. Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Chavarria, A., Vega, R., Yáñez, O., de Aluja, A., Larralde, C. (2003). *Taenia solium* cysticercosis of humans and pigs: A review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. In press.
4. García, H.H., Del Brutto, O.H. (2000). Emerging and Re-emerging Diseases in Latin America. *Infectious Disease Clinics of North America*. **14**: 97-116.
5. Piédrola-Angulo, G. (1992). Microbiología y Parasitología Médica, 2a edición, pp 866-872. Masson-SALVAT Medicina, España.
6. Dunsworth, G.A. (1999). Neurocysticercosis: A review. *Pediatric Nursing*. **25**: 301-303.
7. Gekeler, F., Eichenlaub, S., Mendoza, E.G., Sotelo, J., Hoelscher, M., Löscher, T. (2002). Sensitivity and Specificity of ELISA and Immunoblot for Diagnosing Neurocysticercosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 227-229.
8. Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz, M., Sciutto, E. (1990). Immunodiagnosis of Human Cysticercosis in Cerebrospinal Fluid. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **114**: 926-928.
9. Greene, R.M., Wilkins, P.P., Tsang, V. (1999). Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. *Mol. Biochem. Parasitol.* **99**: 257-261.

10. Proaño-Narvaez, J.V., Meza-Lucas, A., Mata-Ruiz, O., García-Jerónimo, R.C., Correa, D. (2002). Laboratory Diagnosis of Human Neurocysticercosis: Double-Blind Comparison of Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay and Electroimmunotransfer Blot Assay. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2115-2118.
11. García, E., Ordoñez, G., Sotelo, J. (1995). Antigens from *Taenia crassiceps* Cysticerci Used in Complement Fixation, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay, and Western Blot (Immunoblot) for Diagnosis of Neurocysticercosis. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3324-3325.
12. Pardini, A.X., Peralta, R.H., Vaz, A.J., Machado, L.D.R., Peralta, J.M. (2002). Use of *Taenia crassiceps* Cysticercus Antigen Preparations for Detection of Antibodies in Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin. Diagnostic Lab. Immunol.* **9**: 190-193.
13. Bueno, E.C., Vaz, A.J., Machado, L.D.R., Livramento, J.A., Mielle, S.R. (2000). Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Antigenic Peptides for Neurocysticercosis Immunodiagnostic Using Serum Samples. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 146-151.
14. Peralta, R.H.S., Vaz, A.J., Pardini, A., Macebo, H.W., Machado, L.R., De Simone, S.G., Peralta, J.M. (2002). Evaluation of an Antigen from *Taenia crassiceps* Cysticercus for the Serodiagnosis of Neurocysticercosis. *Acta Tropica.* **83**: 159-168.
15. 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.
16. Hubert, K., Adriantsimahavandy, A., Michault, A., Frosch, M., Mühlshlegel, F.A. (1999). Serological Diagnosis of Human Cysticercosis by Use of Recombinant Antigens from *Taenia solium* Cysticerci. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **6**: 479-482.
17. Greene, R.M., Hancock, K., Wilkins, P.P., Tsang, C.W.V. (2000). *Taenia solium*: Molecular Cloning and Serologic Evaluation of 14- and 18-Kda Related, Diagnostic Antigens. *J. Parasitol.* **86**: 1001-1007.

18. Shinohara, N., Fukuda, H. (2002). Isolation of monoclonal antibodies recognizing rare and dominant epitopes in plant vascular cell walls by phage display subtraction. *J. Immunol. Methods*. **264**: 187-194.
19. Janda, K.D., Lo, C.L., Li, T., Barbas, C.F., Wirsching, P., Lerner, R.A. (1994). Direct selection for a catalytic mechanism from combinatorial antibody libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 2532-2536.
20. Bentley, L., Fehrsen, J., Jordaan, F., Huismans, H., Plessis, D. (2000). Identification of antigenic regions on VP2 of African horsesickness virus serotype 3 by using phage-displayed epitope libraries. *J. Gen. Virol.* **81**: 993-1000.
21. O'Connell, D., Becerril, B., Roy-Burman, A., Daws, M., Marks, J.D. (2002). Phage versus Phagemid Libraries for Generation of Human Monoclonal Antibodies. *J. Mol. Biol.* **321**: 49-56.
22. Scott, J.K., Smith, G.P. (1990). Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science*. **249**: 386-390.
23. Wang, L.F., Plesis, D.H., White, J.R., Hyatt, A.D., Eaton, B.T. (1995). Use of a Gene-targeted Phage Display Random Epitope Library to Map an Antigenic Determinant on the Bluetongue Virus Outer Capsid Protein VP5. *J. Immunol. Methods*. **178**: 1-12.
24. Palzkill, T., Huang, W., Weinstock, G.M. (1998). Mapping Protein-ligand Interactions Using Whole Genome Phage Display Libraries. *Gene*. **221**: 79-83.
25. Holzem, A., Nähring, J.M., Fischer, R. (2001). Rapid Identification of a Tobacco Mosaic Virus Epitope by Using a Coat Protein Gene-fragment-pVIII Fusion Library. *J. Gen. Virol.* **82**: 9-15.
26. Fack, F., Hügler-Dörr, B., Song, D., Queitsch, I., Petersen, G., Bautz, K.F.E. (1997). Epitope Mapping by Phage Display: Random Versus Gene-fragment Libraries. *J. Immunol. Methods*. **206**: 43-52.
27. Cramer, R., Suter, M. (1993). Display of Biologically Active Proteins on the Surface of Filamentous Phages: A cDNA Cloning System for Selection of Functional Gene Products Linked to the Genetic Information Responsible for their Production. *Gene*. **137**: 69-75.

28. Cramer, R., Jaussi, R., Menz, G., Blaser, K. (1994). Display of expression products of cDNA libraries on phage surfaces. *Eur. J. Biochem.* **226**: 53-56.
29. Somers, V.A., Brandwijk, R.J., Joosten, B., Moerkerk, P.T., Arends, J.W., Menheere, P., Pieterse, W.O., Claessen, A., Scheper, R.J., Hoogenboom, H.R., Hufton, S.E. (2002). A Panel of Candidate Tumor Antigens in Colorectal Cancer Revealed by the Serological Selection of a Phage Displayed cDNA Expression Library. *J. Immunol.* **169**: 2772-2780.
30. Frykberg, L., Jacobsson, K. (2001). Shotgun Phage Display Cloning. *Comb. Chem. & H. Throu. Screen.* **4**: 135-143.
31. Jacobsson K., Frykberg, L. (1996). Phage Display Shot-Gun Cloning of Ligand-Binding Domains of Prokaryotic Receptors Approaches 100% Correct Clones. *BioTechniques.* **20**: 1070-1081.
32. Cárcamo, J., Ravera, M.W., Brissette, R., Dedova, O., Beasley, J.R., Mogh , A., Wan, C., Blume, A., Mandrecki, W. (1998). Unexpected Frameshifts from Gene to Expressed Protein in a Phage-Displayed Peptide Library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 11146-11151.
33. Grosman, C., Reisin, I.L. (1995). Echinococcus granulosus: partial characterization of the conductive properties of two cation channels from protoscolecoces of the ovine strain, reconstituted on planar lipid bilayers. *Exp. Parasitol.* **81**: 546-555.
34. Grosman, C., Reisin, I.L. (1997). Interconverting Gating Modes of a Nonselective Cation Channel from the Tapeworm Echinococcus granulosus Reconstituted on Planar Lipid Bilayers. *J. Membrane Biol.* **158**: 87-94.
35. Zarlenga, D.S., Rhoads, M.L., al – Yaman, F.M. (1994). A Taenia crassiceps cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**: 215-223

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

8. PROTOCOLOS

8.1 PCR: Se realizó utilizando el Kit Ready-to-go PCR beads (Amersham) con las siguientes cantidades:

| | |
|----------------------------|----------------------------|
| Templado (LPSK) | 1 μ l [20 ng/ μ l] |
| Primer 5' 5SKNCO (30 pmol) | 5 μ l |
| Primer 3' 3SKSNA (30 pmol) | 5 μ l |
| Agua destilada | 14 μ l |
| | <hr/> |
| | 25 μ l |

El programa de PCR comprendió los siguientes ciclos y temperaturas: 1 ciclo a 94°C durante 1 min, 30 ciclos a 94°C durante 30 seg y 1 ciclo a 72°C durante 3min.

8.1.1 PRECIPITACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR:

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Producto de 8 reacciones de PCR | 164 μ l |
| Acetato de Sodio 5 M (1/25) | 17 μ l |
| Etanol absoluto (2.5 vol) | 300 μ l |
| | <hr/> |
| | 481 μ l |

Incubación 2 hrs a -20°C. Centrifugación durante 15 min a 13.000 rpm. Se lavó dos veces con etanol 70 % frío y resuspendió en 20 μ l de agua bidestilada.

8.1.2 DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS *Sna*BI/*Nco*I (New England Biolabs -NEB) :

| | |
|-----------------------------|------------------------|
| Producto de PCR precipitado | 20 μ l |
| Enzima <i>Sna</i> BI | 2 μ l (\geq 1U) |
| Enzima <i>Nco</i> I | 2 μ l (\geq 1U) |
| Buffer NEB 4 10X | 5 μ l |
| BSA 100X | 0.5 μ l |
| Agua | 20.5 μ l |
| | <hr/> |
| | 50 μ l |

Incubación a 37°C durante toda la noche.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.1.3 ELUCIÓN DE ADN:

Se preparó un gel de agarosa al 1% y cargaron 50 μ l de la digestión *SnaBI/NcoI*. El gel se corrió a 100 V durante 43 min. Las bandas correspondientes se purificaron con el Kit CONCERT Rapid Gel Extraction System (GIBCO). Se resuspendieron en un volumen final de 80 μ l de buffer TE. Las bandas purificadas se verificaron en un gel de agarosa al 1 % (100 V durante 30 min) y se calculó aprox una cantidad de 40 ng en 8 μ l.

8.2 LIGACIÓN: fagémido pG8SAET + ADNc *T. crassiceps* digeridos con *SnaBI/NcoI*

| | | |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| Ligación | Vector digerido | 0.6 μ l [40 ng] |
| | ADNc | 10.8 μ l [54 ng] |
| | T4 Ligasa (NEB) | 1 μ l (0.5 U) |
| | Buffer de la ligasa T4 10X | 2 μ l |
| | Agua | 5.6 μ l |
| | | <hr/> |
| | | 20 μ l |
| Control Ligación | Vector digerido | 0.6 μ l |
| | T4 ligasa | 1 μ l (0.5 U) |
| | Buffer de la ligasa T4 10X | 2 μ l |
| | Agua | 16.4 μ l |
| | | |
| | | 20 μ l |
| Control del vector digerido | | |
| | Vector digerido | 0.6 μ l |
| | Agua | 19.4 μ l |
| | | <hr/> |
| | | 20 μ l |

Incubación durante 3.5 hrs a temperatura ambiente. Esta ligación se verificó con una transformación química que se realizó de la siguiente forma:

1. A cinco alícuotas con 100 μl de células químicamente competentes preparadas con RbCl_2 se agregó:
 - a. Ligación aprox 3 ng
 - b. Control ligación aprox 3 ng
 - c. Vector digerido aprox 3 ng
 - d. Vector sin digerir aprox 3 ng

2. Incubación por 30 min a 4°C. Choque térmico a 42°C durante 2 min. Incubar 1 min a 4°C, agregar 900 μl de SOC e incubar 1 hr a 37°C. Platear 250 μl en cajas con medio LB y amp [100 $\mu\text{g/ml}$] (incubación toda la noche a 37°C). Se contaron las colonias obtenidas de esta transformación:
 - a. Ligación: 260
 - b. Control ligación: 9
 - c. Vector digerido: 1
 - d. Vector sin digerido: Se cubrió toda la caja y no se pudieron contar.

Se realizaron 4 ligaciones más siguiendo la misma proporción de vector:inserto y juntaron con la primera ligación hecha. Se realizó una transformación química para monitorear el número de clonas totales. Los números de las colonias obtenidas no cambiaron con respecto a la transformación descrita antes.

8.2.1 PRECIPITACIÓN DE LAS LIGACIONES:

| | |
|-----------------------------|--------------------|
| Ligación total | 57 μl |
| Agua | 343 μl |
| Acetato de sodio 5 M (1/25) | 16 μl |
| Etanol absoluto (2.5 vol) | 1040 μl |
| | 1456 μl |

Se incubó toda la noche a -20°C y centrifugó por 15 min a 13000 rpm. Se lavó dos veces con etanol 80% frío e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se resuspendió en un volumen final de 50 μl de agua.



8.3 PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

1. Diluir 1:1000 un cultivo de células *E. coli* cepa TG1 crecido durante toda la noche en 0.5 L de medio LB o 2YT. Incubar durante 4.5 hrs a 37°C a 225 rpm. Las bacterias necesitan una densidad óptica (OD 600) de 0.6-0.8 para poder ser procesadas.
2. Distribuir el 0.5 L de medio en cuatro tubos fríos y centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C.
3. Decantar el medio excepto aprox 2 ml de este y resuspender en hielo suavemente el botón de bacterias.
4. Agregar un volumen de glicerol 10% frío. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min y decantar el glicerol excepto aprox. 2 ml, resuspender el botón de células con el glicerol no decantado. Vaciar las células en dos tubos y llenar con un volumen de glicerol 10% frío.
5. Centrifugar a 5000 rpm por 10 min a 4°C. Decantar el glicerol y con 2 ml restantes resuspender el botón. Vaciar las células en un solo tubo y llenar con un volumen de glicerol 10%. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Decantar el glicerol y resuspender el botón en 1.5 ml de glicerol 10% frío, alicuotar las células y congelar con hielo seco con alcohol industrial. Guardar a -70°C.

8.4 CÉLULAS COMPETENTES PREPARADAS CON RbCl₂

1. Inocular una colonia de *E. coli* cepa TG1 en 10 ml de medio LB. Incubar a 37°C durante toda la noche.
2. Diluir el cultivo (1:100) en 100 ml de medio LB.
3. Incubar a 37°C hasta alcanzar una absorbancia (OD 600) de 0.5.
4. Incubar en hielo por 10 min y centrifugar a 4000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Resuspender las células suavemente en 30 ml de solución TFB-I fría. Incubar en hielo durante 30 min y centrifugar a 4000 rpm por 10 min a 4°C.
6. Resuspender el botón en 4 ml de solución TFB-II. Hacer alícuotas de 100-200 µl y congelar en hielo seco con etanol. Guardar a -70°C.

8.5 PURIFICACIÓN DE LA BIBLIOTECA

1. Centrifugar el cultivo con fago durante 10 min a 10000 rpm a 4°C. Añadir ¼ parte del volumen de PEG 40%/NaCl 5 M al sobrenadante e incubar por 1-2 hrs a 4°C.
2. Centrifugar 15 min a 10000 rpm a la misma temperatura. Decantar el medio y resuspender el botón en 1 ml de TBS estéril. Centrifugar a 4°C durante 5 min a 13000 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf y añadir 1/6 del volumen de PEG 40%/NaCl 5 M e incubar a 4°C por 1 hr.
3. Centrifugar 1 min a 4°C a 13000 rpm. Quitar el sobrenadante y guardar en un tubo nuevo a 4°C.

8.6 BIOSELECCIÓN 1: Para este 'panning' se utilizó un suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium*

1. En una placa de 96 pozos para ELISA, se sensibilizaron cuatro pozos con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (Goat anti-mouse IgG ZyMax). El anticuerpo (1 µg/pozo) se diluyó en un amortiguador de carbonatos e incubó 1 hr a 37°C. Los pozos se lavaron cinco veces con PBS 1X/Tween 0.05% (PBST) y bloquearon con PBS 1X/albúmina 2% (200 µl/pozo) durante 1 hr a 37°C.
2. Al término de la incubación se lavaron cinco veces con PBST y se agregó el suero de ratón diluido 1:200 en PBS 1X/albúmina 1%. Se incubó 1 hr a 37°C y lavó cinco veces con PBST. Se agregó la biblioteca de ADNc expresada en fago (aprox 10^{11} fagos/pozo) diluida en PBS 1X/ albúmina 0.01%. Se lavó 10 veces con PBS 1X frío rápidamente.
3. Para eluir las clonas seleccionadas se agregaron 100 µl de Glicina/HCl pH 2.2 a cada pozo. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y después 10 min a 37°C. Se recuperaron 400 µl y neutralizaron con 25 µl de TRIS Base. El eluido se guardó a 4°C.

8.7 BIOSELECCIÓN 2: Se realizó utilizando un suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium*

1. Se sensibilizaron ocho pozos utilizando el mismo anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón (0.5 µg/pozo) y amortiguador que en la bioselección 1. Se incubó 1 hr a 37°C y lavó 4X con PBST. Se agregaron 200 µl a cada pozo de PBS 1X/albúmina 2% e incubaron 1 hr a 37°C. Se lavó nuevamente cuatro veces con PBST y se agregó, a cuatro pozos, suero de ratón inmunizado con TBS (suero control) en una dilución 1:100 en PBS 1X/albúmina 1%. A los cuatro restantes se les colocó suero de ratón inmunizado con extracto vesicular de *T. solium* en una dilución 1:200 con PBS 1X/albúmina 1%. Se incubaron 1 hr a 37°C y lavaron cuatro veces con PBST.
2. La biblioteca se diluyó en PBS 1X/ albúmina 0.01% y a cada pozo se agregaron aprox 10^{11} fagos recombinantes. La biblioteca diluida se incubó 2 hrs a 4°C en los pozos sensibilizados con el suero control y se recolectó en un tubo. Se agregó un poco de PBS 1X/ albúmina 0.01% para completar 400 µl y se agregaron 100 µl a cada pozo incubado con suero de ratón inmunizado con extracto vesicular incubándose durante toda la noche a 4°C. Se lavaron diez veces con PBS 1X frío y eluyeron con 100 µl/pozo de glicina/HCl pH 2.2 incubando 5 min a temperatura ambiente y 10 min a 37°C. Se recolectaron los fagos seleccionados y neutralizaron con 25 µl de TRIS Base.

8.8 BIOSELECCIÓN 3: En este 'panning' se empleo un 'pool' de líquidos cefalorraquídeos de pacientes con NCC. Los líquidos fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), México.

1. Se sensibilizaron cuatro pozos con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de humano (mouse anti-human IgG ZyMed) diluido en un amortiguador de carbonatos (0.5 µg/pozo). Se incubó por 1 hr a 37°C y se lavaron tres veces con PBS 1X frío y dos veces con PBST. Para bloquear estos pozos se agregaron 100µl de PBS 1X / albúmina 1% e incubaron 1 hr a 37°C. Los pozos se lavaron cuatro veces con PBST.
2. En un tubo eppendorf se colocó lo siguiente:

394 µl PBS 1X / albúmina 1%
45 µl biblioteca recombinante expresada en fago
11.25 µl 'pool' LCR en una dilución 1:40

Se incubó 1.5 hrs a 4°C y 1.5 hrs a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl a cada pozo e incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Los pozos se lavaron 10 veces con PBS 1X frío y se agregaron 100 µl de trietilamina a cada pozo, se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se colectó y agregaron 200 µl de Tris/HCl se mezcló bien y guardó a 4°C.

8.9 ENSAYOS DE ELISA (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay)

1. Placas de 96 pozos (Nunc- Immuno plate Maxisorp surface) para ELISA se sensibilizaron con fago (10^{10} en 100 μ l por pozo) e incubaron toda la noche a 4°C. Los fagos se diluyeron en PBS 1X. Se lavó de 3-4 veces con PBS 1X frío a mano y después 4 veces con PBS 1X/ Tween 20 al 0.1% (Sigma) en un lavador automático.
2. La placa se bloqueó con PBS 1X con albúmina sérica bovina (Fluka) al 2%, se colocaron 200 μ l por pozo e incubó 1-2 hrs a 37°C. Se lavó 4 veces con PBS 1X/ Tween 20 en un lavador automático.
3. Se usaron dos 'pool' de LCR, uno de pacientes candidatos a confirmar NCC y otro con LCR de pacientes con diferentes enfermedades neurológicas, también se utilizaron muestras individuales de LCR obtenido de pacientes con NCC y pacientes control. Para estos ensayos, se emplearon diluciones de 1:200, 1:160, 1:100 y 1:40 usando PBS 1X con albúmina sérica bovina al 1% e incubó 1.5 hrs a temperatura ambiente. La placa se lavó de 4-8 veces en el lavador automático.
4. El anticuerpo secundario, anti-IgG humano acoplado a peroxidasa (ZyMED), se diluyó 1:5000 en PBS 1X con albúmina sérica bovina al 1% y colocaron 100 μ l a cada pozo e incubó 1 hr a 37°C. La placa se lavó 4 veces con PBS 1X / Tween 0.1%.
5. Se colocaron 100 μ l de sustrato, ABTS (ZyMED) o TMB (ZyMED) e incubó a 37°C durante 30 min. Para leer la placa se utilizó una longitud de onda de 405 nm.

9. SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

❖ SOLUCIÓN TFB-I: 500 ml

| | |
|----------------------------|--------|
| 30 mM Acetato de Potasio | 1.74 g |
| 50 mM Cloruro de Manganeso | 4.94 g |
| 100 mM Cloruro de Rubidio | 6.04 g |
| 10 mM Cloruro de Calcio | 0.74 g |
| Glicerol 15% | 75 g |

Ajustar el pH a 5.8 usando ácido acético, filtrar en esterilidad.

❖ SOLUCIÓN TFB-II: 500 ml

| | |
|--------------------------|--------|
| 10 mM MOPS | 1.04 g |
| 75 mM Cloruro de Calcio | 5.50 g |
| 10 mM Cloruro de Rubidio | 0.6 g |
| Glicerol 15% | 75 g |

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH, filtrar en esterilidad.

❖ PEG/NaCl (8000) 40%

| | |
|------------------------|---------|
| NaCl | 5 M |
| Polietilenglicol (PEG) | 400 g/L |

❖ TBE

| | |
|--------------|----------|
| Tris | 54 g/L |
| Ácido bórico | 27.5 g/L |
| EDTA | 20 ml |

❖ TBS

| |
|-------------------------|
| 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) |
| 150 mM NaCl |

❖ Buffer de Yodo

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
1 mM EDTA
4 M NaCl

❖ PBS

0.01 M KH_2PO_4
1 M Na_2HPO_4
1.37 M NaCl
0.027 M KCl

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

❖ Medio LB (Luria Bertani): 1 L

| | |
|----------------------|------|
| Bacto-Tryptone | 10 g |
| Extracto de Levadura | 5 g |
| NaCl | 5 g |

❖ Medio 2xYT: 1 L

| | |
|----------------------|------|
| Bacto-Tryptone | 16 g |
| Extracto de Levadura | 10 g |
| NaCl | 5 g |

❖ Medio mínimo para sembrar *Escherichia coli* cepa TG1.

| | |
|---------------------------|-------|
| Na_2HPO_4 | 0.6% |
| KH_2PO_4 | 0.3% |
| NH_4Cl | 0.1% |
| NaCl | 0.05% |
| Agarosa | 1.5% |
| Glucosa | 20% |
| Tiamina | 1% |
| MgSO_4 | 1 M |

❖ Top agar: 1 L

| | |
|---|------|
| Bacto-Tryptone | 10 g |
| Extracto de Levadura | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1 g |
| Agarosa | 7 g |