



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Selección de clonas de una biblioteca
combinatoria de despliegue de
bacteriófagos “Phage Display” con
anticuerpos contra una fracción de
productos secretados y excretados
por Fasciola hepatica

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L Ó G O

P R E S E N T A:

ALFONSO REYES LUGO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES



MÉXICO D.F. 2009

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno Reyes Lugo Alfonso 56 37 94 45 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 095080727
2. Datos del tutor Dr Rogelio Alejandro Alonso Morales
3. Datos del sinodal 1 Dr René de Jesus Cárdenas Vázquez
3. Datos del sinodal 2 Dr María Dolores Correa Beltran
3. Datos del sinodal 3 M en C Alfonso José Vilchis Peluyera
3. Datos del sinodal 4 Méd Cir Luis Alfredo Ponce de León Garduño

A la vida,
al amor,
al progreso,
a la familia,
a mi esposa,
al pueblo de México,
por la honestidad
y el honor.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, profesor investigador en la FMVZ de la UNAM, en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística. Los resultados aquí presentados fueron reproducidos por Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, López-Velázquez G, Gazarian K, Gazarian T, Alonso RA. en la revista *Parasitology*. 135(12):1437-45 sin darme el reconocimiento acordado (se anexa publicación en la página 67).

Los resultados generados por mi se compartieron con el alumno de posgrado Abel Villa Mancera de la FMVZ de la UNAM como quedo expresado en el reporte del anexo III, página 61.

Agradezco mucho:

Al Dr. Rogelio Alonso Morales, por las facilidades para lograr los objetivos propuestos y su acertada dirección.

El apoyo técnico incondicional del laboratorio: la Bióloga Amanda Gayoso Vázquez, el T. Q. I. Alejandro Valdez Rosas y el T. L. Q. Pablo Pintor Ríos.

El apoyo técnico de colaboradores a: la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar, la M. en C. Paola Moreno Álvarez, el Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo, la M. en C. Belinda Alegría, la M. en C. Tatiana Gazarian, al M. en C. Alberto Campillo, la Dra. Irene Cruz Mendoza, al M.V.Z. Gerardo Arrellín Rosas, y un reconocimiento especial al M. en C. Fernando Hernández Sánchez por su incansable y asombrosa capacidad educativa.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero, a la Dra. Dolores Correa, al Dr. Gazarian y al Dr. Froilán Ibarra por permitirme hacer uso de su infraestructura.

A Abel Villa Mancera por su actuación deshonesto, e inmoral compañía académica a lo largo de este proceso.

A mi madre Gregoria Lugo García y padre Jaime Reyes por regalarme la vida.

A mí esposa por su apoyo sentimental.

A mis hermanos Jaime y Efraín su apoyo fraternal.

A mis hermanas Adriana y Dulce Iraís.

A mis compañeros y amigos en la Universidad Panamericana: la Sra. María Elena Figueroa, la Sra. Gabriela, la Sra. Araceli Mora, el Dr. Manuel Ramos

Kuri, el Dr. Francisco Javier Estrada Mena, el Dr. Salomón Hernández Gutiérrez, el Biól. Pablo Hernández Franco, el Dr. Guillermo Cantú, el Dr. Gregorio Tomas Obrador, la Dra. Stéphanie Derive, la Dra. Ana Lilia Loredo y un reconocimiento especial al Sr. Javier Canseco, las Stas. María Eugenia Juárez López y Verónica Barrera, las Sras. Adriana Salinas y Araceli Mora.

A mis amigos y vecinos, el Biól. Felipe Delfino Ríos Valdez, la Biól. Alejandra Huitron Baca, la Biól. Pas. Francisca Avelar Leyva, su hija Anali, al Q.F.B. Ernesto Jiménez García, la Q.F.B. Mercedes Baca, el Sr. David Pérez Barajas, su esposa Cirila Vázquez Hernández y sus padres, Sra. María Trinidad y Sr. Alejandro, al Sr. José y su esposa.

Gracias por su ayuda, este es el producto de todos y cada uno de ustedes, además de mencionar el notable atrevimiento que se hace en el país por mantener la investigación y la formación de recursos humanos profesionales.

Espero no agraviar la esperanza puesta en mi y que les cause satisfacción nuestro arroj.

Contenido

Resumen	8
1. Introducción.....	9
2. Hipótesis	15
3. Objetivos.....	15
4. Materiales y Métodos.....	16
5. Resultados	27
6. Discusión	45
7. Conclusiones	47
8. Perspectivas.....	47
9. Anexos	48
10. Bibliografía	76
11. Índice	79

Resumen

La disponibilidad comercial de bibliotecas combinatorias de péptidos aleatorios fusionados a proteínas de superficie están incrementando su uso para el desarrollo de vacunas, de diagnósticos moleculares, la identificación de epítomos y mimótopos, inhibidores de enzimas y ligandos de receptor. El objetivo de este trabajo fue seleccionar clonas a partir de una biblioteca combinatoria de despliegue de bacteriófagos para la obtención de clonas inmunodominantes contra IgG de animales infectados. La tarea fue buscar mimótopos de *Fasciola hepatica*. Al final del trabajo logramos identificar 32 clonas mediante tres bioselecciones (biopanning) y determinamos que sólo 3 posiblemente podrían funcionar en ensayos de diagnóstico y protección.

1. Introducción

1.1. *Fasciola hepatica*

La infección con especies de *Fasciola* que parasitan el hígado es conocido como fasciolosis. Es una enfermedad parasitaria que afecta aproximadamente a 2.4 millones de personas en el mundo y representa un riesgo potencial para otros 180 millones de individuos en el orbe y genera pérdidas económicas del orden de 4 mil 500 millones de pesos al año por los daños causados al ganado bovino y ovino, de acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1995).

Es sabido entre los productores de ganado que la fasciolosis afecta o compromete el crecimiento y productividad de animales de pastoreo; La fasciolosis presenta un serio problema en muchas partes del mundo, afectando a ganado bovino, caprino, porcino, ovino así como muchas especies de vida silvestre. También es conocido que afecta al humano por el consumo de ciertas plantas como berros, quelites, acelgas y espinacas, entre otras. México, en el estado de Tabasco ocasiona importantes pérdidas económicas (Rangel-Ruiz y Martínez-Duran 1994); en el estado de Sonora se encontró una prevalencia de 24.4 +/- 1.2 usando pruebas de ELISA indirecto (Munguía-Xochihua J.A. et. al 2007)

1.2. Biología de *Fasciola hepatica*

La especie *F. hepatica*, pertenece al reino Animal, phylum: Platyhelminthes, clase: Trematoda, subclase: Digenea, Familia: Fasciolidae.

F. hepatica actúa en parénquima y conductos biliares de bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, hombre y otros animales. Produce una enfermedad crónica y con dolencias habituales más comúnmente trastornos digestivos y de la nutrición.

El parásito adulto mide 18 a 50 por 4 a 14 mm, el cuerpo es aplanado dorso ventralmente de forma foliácea y cubierto por pequeñas espinas; posee dos

ventosas, una en el extremo superior y la otra ventral. Debajo de la ventosa ventral se abre el poro genital; es hermafrodita.

Los hospederos infectados por *F. hepatica* eliminan huevos del parasito al ambiente. Al momento de la puesta, los huevos no están segmentados, su desarrollo requiere la separación de la masa fecal, condiciones de humedad y temperatura adecuadas. En el interior del huevo se desarrolla una larva ciliada y con dos manchas oculares oscuras, llamada miracidio. La eclosión del miracidio depende de la luz, a 650 nm, que estimula la producción de una enzima proteolítica que debilita la unión del opérculo con la cáscara del huevo. Los miracidios pierden los cilios cuando penetran en el molusco (caracol del género *Limnaea*) y se transforma en esporoquiste. Del esporoquiste se forman de cinco a diez redias. Estas redias dan origen a más de 50 cercarías. El mecanismo celular por el que se forman las redias y las cercarías es partenogénesis diploide. Las cercarías emitidas por los caracoles se enquistan sobre hierbas y plantas acuáticas. Esta fase se denomina metacercaria.

La infección tiene lugar durante la ingesta de hierbas que crecen alrededor de ríos, depósitos de agua, encharcamientos, forraje y agua contaminada.

En el intestino se disuelve la membrana quística y queda libre el trematodo, penetra a través de la pared del intestino, alcanza la pared peritoneal; luego penetra en el hígado, perfora la cápsula de Glison y después llega al tejido hepático para finalmente asentarse en el conducto biliar.

Las fasciolas jóvenes se nutren con sangre y tejido hepático, las adultas con sangre, bilis y tejido epitelial.

Los antígenos de *F. hepatica* han sido considerados importantes inductores de la respuesta inmune humoral en la fasciolosis y tanto su especificidad como su utilidad diagnóstica han sido demostradas en numerosos estudios de fasciolosis humana y animal (Díaz *et al.* 1998).

1.3. Antígenos en *F. hepatica*

Los antígenos de *F. hepatica* pueden diferenciarse en dos categorías, antígenos somáticos y antígenos metabólicos o de secreción-excreción (SE).

Chemale G, *et al.* (2006), purificaron del citosol glutatión-S-transferasas (GST). Las GST son una familia de enzimas que catalizan la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofílicos, que protege a las proteínas y ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas de reacciones covalentes con carcinógenos y medicamentos, además ellos describieron algunas isoformas y el cADN de GST de la clase omega para *F. hepatica*.

Estudios en productos SE, han demostrado la presencia de cisteín proteasas, leucín proteasas y otras proteínas como: actina, enolasa y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa que a diferencia de las proteasas, se encuentran en menor cantidad en la bilis del hospedero, lo que impide su detección en el diagnóstico (Morphew *et al.* 2007).

La leucina aminopeptidasa de *F. hepatica* (FhLAP) es una metaloenzima que se encontró en las células epiteliales de la periferia en torno a la zona alimenticia del nematodo, de lo que se deduce que participa en la digestión de las proteínas del anfitrión; con esta enzima producida en forma recombinante inmunizaron conejos y consiguieron obtener el 89% de protección (Acosta D. *et al.* 2008).

Las catepsinas L1, L2 y B son cisteín proteasas que participan en la emigración del parásito a través del intestino y el hígado del anfitrión, la adquisición de nutrientes y muy probablemente la evasión inmune, ya que suprime la respuesta inmune Th1 en animales de laboratorio infectados y los hace susceptibles a infecciones bacterianas recurrentes (Beckham S.A. *et al.*, 2006, Dixit A.K. *et al.* 2008).

El tratamiento de la fasciolosis en los animales de ganado ha sido con fármacos como el triclabendazol, el cual ha sido efectivo, pero el costo y la aplicación es alto, además, la utilización indiscriminada de este fármaco ha generado poblaciones resistentes (McConville M. *et al.* 2006).

1.4. Generación de antígeno

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. En biología molecular son importantes por ser utilizados para construir bibliotecas genómicas y ser buenos vectores de clonación, además son una herramienta molecular muy poderosa en la tecnología de despliegue de moléculas de superficie (phage display), que consiste en la incorporación de secuencias de péptidos fusionados a proteínas de superficie. Esto se logra al insertar secuencias de ADN en el genoma del bacteriófago que codifican para péptidos fusionados, al extremo amino terminal de una proteína de superficie para dar como resultado un péptido incorporado a la cubierta del fago, que puede tener actividad biológica. Esto permite que el péptido pueda ser seleccionado con moléculas receptoras (anticuerpos, ligandos, etc.), el cual va a estar asociado al segmento genético en el genoma del bacteriófago. Esta tecnología puede ser útil en el estudio de la inmunoparasitología molecular, debido a la necesidad de generar suficiente cantidad de antígeno para lograr una protección exitosa. Con esto, se espera contrarrestar la falla de los métodos clásicos de control de parásitos, derivada de los altos costos de los medicamentos disponibles. Actualmente se pretenden hacer trabajos para la búsqueda de diagnósticos y vacunas (De Berardinis P, Haigwood N.L. 2004) que puedan prevenir completamente la infección o limitar los efectos patológicos de las enfermedades parasitarias sin tener efectos secundarios.

1.5. Bacteriófago M13

Diferentes tipos de bacteriófagos han sido usados como vehículos de phage display, incluidos los bacteriófagos del orden *Caudovirales* como λ y T7. Sin embargo, el más comúnmente usado en el sistema phage display es M13, bacteriófago filamentoso de la familia *Inoviridae*. Los bacteriófagos filamentosos son buenos vehículos de clonación y expresión de péptidos ya que la inserción de ADN foráneo dentro del genoma está bien caracterizada. Puede utilizarse

como vector de expresión, la superficie del bacteriófago no es compleja debido a que no tiene componentes lipídicos y pueden liberarse de la célula sin lizarla, produciendo fagos continuamente.

El bacteriófago M13 no es lítico, es una partícula cilíndrica de aproximadamente 880 nm de longitud y 6.6 nm de ancho. Este bacteriófago filamentoso infecta bacterias *Escherichia coli* vía pili F. El genoma del bacteriófago silvestre es una molécula circular de una sola hebra de 6407 nucleótidos de longitud; el virión (unidad estructural morfológicamente completa e infecciosa) de M13 consiste en un cromosoma que está cubierto por una membrana que contiene aproximadamente cinco copias de la proteína III, tres copias de la proteína IV, cuatro copias de la proteína VII, dos copias de la proteína VI, cinco copias de la proteína IX y dos mil setecientas copias de la proteína VIII codificada por el gen VIII lo que da una apariencia de filamento esta es la razón de que a M13 se le conozca como fago filamentoso. Todas las proteínas mencionadas pueden ser usadas para fusionar péptidos (Smith, 1985; Sidhu *et al.*, 2000; Brichta J., Hnilova M. y Viscovic T. 2005 Mullen *et al.*, 2006). Generalmente se clonan hasta 10^{11} diferentes secuencias de péptidos fusionados a las proteínas de superficie de los bacteriófagos o también cADN, producto de la extracción de RNA de *Taenia crassiceps* (Robles Y., *et al.* 2005) o el genoma de *Anaplasma marginale* digerido parcialmente (Ocampo, V. 2004). Una de las aplicaciones que esta herramienta permite, es que una vez obtenidas las construcciones con los insertos de interés en los bacteriófagos, se haga una selección de epítomos (regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno), mimótopos (moléculas que imitan a los epítomos inmunogénicos) o parátomos (moléculas complementarias a los epítomos).

1.6. Phage Display

Bibliotecas de péptidos aleatorios (RPL por sus siglas en inglés: Random Peptide Libraries).

Las bibliotecas RPL pueden usarse para el mapeo de epítomos por diferentes anticuerpos, para el aislamiento de mimótopos de proteínas, carbohidratos y estudios de diversa índole. Se construyen por la inserción de oligonucleótidos sintéticos al ADN del fago, con cada residuo de aminoácido codificado por un codón degenerado (ya sea NNK o NNS en donde N=A, C, T o G; K=G o T y S=G o C) e incluye codones para los 20 aminoácidos naturales, más un codón de paro. Las primeras bibliotecas presentaron péptidos lineales propiedad que confiere flexibilidad y configuraciones no estabilizadas. Un dato particular para las bibliotecas producidas por la compañía New England BioLabs USA, es que el contenido de cisteínas en los péptidos es bajo, ello para reducir posibles interacciones con las ocho cisteínas constitutivas de la pIII. Estas bibliotecas RPL también han sido denominadas primarias (Palacios-Rodríguez Y. 2007). El "Ph.D.-12™ Phage Display Library Kit" se basa en una biblioteca combinatoria que despliega 12 aminoácidos alineados de manera aleatoria (12-mers) fusionados a la proteína de superficie (pIII) del bacteriófago M13.

1.7. Bioselección

La selección de bacteriófagos por afinidad (biopanning), es un proceso de discriminación tan preciso como la selección inmune (Smith y Patrenko, 1997), y se lleva a cabo en tres pasos en donde se incluye al ligando para obtener variadas interacciones:

1. Incubación de la biblioteca combinatoria con la molécula blanco.
2. Rondas de lavados de los bacteriófagos no afines a la molécula blanco.
3. Recuperación de las clonas inmunoreactivas para su amplificación.

El empleo de una posible vacuna contra el helminto puede ser una opción eficaz y costeable para su aplicación al ganado, por lo que es significativo contar con una batería de anticuerpos que pueda ser empleada en la búsqueda de epítomos importantes y la caracterización de mimótopos aplicados a diagnóstico y protección.

2. Hipótesis

El uso de una biblioteca combinatoria de despliegue en bacteriófagos permitirá identificar epítomos de productos secreción-excreción de *Fasciola hepatica* mediante la selección por afinidad de péptidos miméticos con IgG obtenidas de un conejo inmunizado con estos productos.

3. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue seleccionar clonas que expresen mimótopos reconocidos por anticuerpos generados en conejos inmunizados con una fracción de productos secretados y excretados por *F. hepatica*, a partir de una biblioteca combinatoria de despliegue en bacteriófagos.

3.1. Objetivos Particulares

1. Obtención y evaluación de antígeno somático y productos de secreción excreción de *F. hepatica*.
2. Obtención de anticuerpos en conejo dirigidos contra antígeno somático y productos de secreción excreción para ser usados en el tamizaje de la biblioteca combinatoria.
3. Caracterizar anticuerpos dirigidos contra antígeno somático y una fracción de productos secretados y excretados por *F. hepatica*.
4. Caracterizar inmunológicamente sueros de borregos infectados con *F. hepatica* y sueros de borregos negativos a *F. hepatica*.
5. Seleccionar y caracterizar clonas inmunodominantes a partir de una biblioteca combinatoria Ph.D.-12TM empleando anticuerpos dirigidos contra una fracción de productos de secreción-excreción.

4. Materiales y Métodos

4.1. Obtención de fasciolas para la preparación de antígeno somático y productos SE

Las fasciolas adultas se extrajeron de los conductos biliares de hígados de vaca decomisados en el rastro municipal de Toluca, Estado de México. Los parásitos que se extrajeron se dividieron en dos grupos, el primero para obtener antígeno somático y el segundo para obtener productos de excreción-secreción (SE). Para la preparación del antígeno somático, las fasciolas se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogenizaron en mortero con amortiguador salino de fosfatos (PBS) adicionado con inhibidores de proteasas (Cat. Sigma P2714-1BTL), se centrifugó y colectó el sobrenadante. El antígeno se fraccionó y se mantuvo a -70°C hasta su uso (Hoyle D.V. *et al.* 2003). Para la obtención de productos de SE, a las fasciolas se les enjuagó con PBS y se les incubó en RPMI 1640 adicionado con antibióticos (penicilina y estreptomicina, 500 mg/ml) a 37°C durante una noche, se centrifugó y recuperó el sobrenadante, se le agregaron inhibidores de proteasas (Roche; Cat. 11873580001) y se guardó a -20°C , para su posterior uso (Smith A.M. *et al.* 1993).

Para la inmunización de los conejos se utilizó un antígeno somático obtenido a partir de fasciolas congeladas (-20°C), se les pulverizó con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana, y se les homogeneizó con RIPA (150 mM de NaCl, 1% de NP40, 0.5% de DOC, 0.1 % de SDS y 50 mM de Tris base. Harlow, E. and Lane, D. 1988), adicionado con inhibidores de proteasas (Roche; Cat. 11873580001), se centrifugó a 3200 RCF durante 15 min. a 4°C , el sobrenadante se fraccionó en dos partes. Una de las fracciones fue centrifugada a 14 000 rpm, durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La otra muestra de antígeno se guardó directamente. Los antígenos se fraccionaron y guardaron a -20°C .

4.2. Inmunización de conejos con productos SE de *F. hepatica*

Con 9.6 mg de antígeno somático (Correa D. com. pers.), se inmunizaron dos conejos hembra, (conejo 1 [C1] y conejo 2 [C2]), de 2.5 Kg, siguiendo el programa de inmunización descrito en el anexo I (página 56). Los sueros de los conejos inmunizados se evaluaron en ensayos de ELISA y se guardaron a -20°C para su conservación y posterior uso.

Las IgG de un conejo dirigidas contra una fracción de productos de SE de *F. hepatica* fueron obtenidas de la inmunización con una fracción de productos SE purificada por HPLC de intercambio iónico empleando una columna de sefarosa Q, las fracciones colectadas se concentraron valiéndose de una columna de filtración sobre gel (Superdex 75), de esto se obtuvieron dos fracciones de 27 y 29 KDa, con las cuales se inmunizó a un conejo New Zealand. Las IgG se purificaron usando una columna de proteína A-sefarosa (ICOPA 2006). Estas IgG fueron proporcionadas por el Dr. Héctor Quiroz Romero del Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.3. Cromatografía de afinidad

En la purificación de IgG a partir de sueros inmunes, se emplearon dos métodos, uno automatizado que consistió en hacer uso de un equipo ÄKTAprime plus (GE Healthcare) y uno manual. El principio y el procedimiento es el mismo. Se utilizaron las mismas soluciones en ambos casos. En el proceso de la purificación de IgG se empleó una columna de proteína A (proteína de pared celular de *Staphylococcus aureus*) acoplada a sefarosa y otra de proteína G (proteína de pared celular de *Streptococci*) acoplada a sefarosa, productos comerciales HipTrap™ de 5 ml. Se siguieron los pasos establecidos en el manual de instrucciones del equipo.

Para la obtención de IgG específicas contra productos SE de *F. hepatica*, se prepararon dos columnas en unos cartuchos para empaquetar sefarosa NHS (NHS-activated sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare). Primero, se lavó 1 ml de sefarosa con 15 volúmenes de HCl 1mM, inmediatamente se agregó: a la primera columna 10 mg de antígeno somático y a la segunda 10 mg de productos SE disueltos en amortiguador de acoplamiento (NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3), se incubó a 4°C toda la noche. Al siguiente día se lavó con 15 volúmenes de PBS y se bloqueó con una solución de etanolamina 0.5 M, NaCl 0.5 M a pH 8.3 durante 2 hrs a 4°C. Se lavó con 15 volúmenes de PBS, se agregó un ml de suero de conejo 2 a cada una de las columnas y se incubó a 4°C durante 2 horas. Se lavó con PBS hasta que la densidad óptica fuese cero. Se eluyó con 14 a 19 ml de glicina 100 mM pH 2.5 y se colectaron las fracciones de 1 ml, se estabilizó el pH con 100 µl de Tris-HCl 1M. Después se concentraron las fracciones seleccionadas (muestras con mayor densidad óptica), en unos tubos para dializar y concentrar por filtración (Amicon Ultra 15 Cat. UFC910024), en estos tubos se centrifugó a 4000 x g durante 10 minutos, tres veces con 5 ml de PBS, al final se resuspendió el producto en 200 µl de PBS con azida de sodio al 0.1 %, se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bollag D. M. 1996) en placas de 96 pozos, utilizando 40 µl del reactivo de Bradford (Biorad Cat. 500-0001); la curva patrón se realizó con diferentes concentraciones de BSA (5, 10, 15, 20 y 25 µg), las muestras se diluyeron 1:10, 1:50 y 1:100 en un volumen final de 200 µl. La lectura se hizo a 595 nm y se comprobó la integridad de las IgG en un gel de poliacrimida.

4.4. Obtención de sueros positivos de borrego

El muestreo se realizó en el municipio Chapa de Mota, estado de Hidalgo. Se obtuvieron muestras de heces y sangre de 7 borregos pelibuey. Las heces se trataron con el método de sedimentación, descrito en el anexo I (página 48), que permite ver de manera cualitativa la presencia o ausencia de huevos de *Fasciola* en heces. La sangre se obtuvo con una punción en la yugular, utilizando el

sistema vacutainer. El suero se fraccionó y fue mantenido en congelación a -20°C hasta su uso.

4.5. Obtención de sueros negativos de borrego

Los 42 sueros negativos se obtuvieron de borregos pelibuey que en ningún momento de su historia de monitoreo encontraron que hubiesen tenido contacto con *F. hepatica*; éstos fueron proporcionados por el Dr. Antonio Figueroa del Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

4.6. Evaluación de las IgG y sueros contra antígeno somático y productos de SE por ELISA indirecto

Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc-Immuno Plate F96, Cert, Maxisorp), utilizando 100 µl/pozo con 5 y 10 µg/ml del antígeno, en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 y se incubó toda la noche a 4°C; al día siguiente, las placas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con 200 µl de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS), Tween-20 al 0.05%. Se bloqueó por 30 minutos a 37°C con 200 µl por pozo de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5%, Tween 20 al 0.05% en PBS. Se quitó esta solución de bloqueo y se repitieron los lavados. Se adicionaron los anticuerpos primarios, 5 a 10 µg/ml de IgG o las diluciones de sueros establecidas (1/100, 1/200..., 1/1000, 1/2000..., 1/12000) previamente preparadas en solución diluyente de muestras (125 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl, 0.1% de Tween 20 y 1% de leche descremada svelty), se incubó 1.5 h a 37°C; pasado el tiempo se lavó 4 veces con 200 µl, una vez con PBS-Tween al 0.05% y las siguientes tres con PBS, cada lavado fue de 5 minutos. La incubación con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), diluidos 1:2000 en PBS Tween-20 al 0.05% fue 1.5 h a 37°C. Se lavó 3 veces por 5 minutos con 200 µl de una solución de Tween 20 al 0.05% en PBS. Se adicionaron 100 µl/pozo de substrato, solución que contenía 4 µl de

peróxido de hidrógeno (30%, w/v), 4 mg de ortho-phenylendiaminehydrochloride (OPD), en 10 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 5, y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente hasta que los controles negativos viraran de color. La reacción fue parada adicionando 50 μ l por pozo de ácido sulfúrico 1M. La absorbancia fue medida a 492 nm en un lector de placas de ELISA (Beckman Coulter DTX 880).

4.7. Ensayo de Western Blot (inmuno blot).

La cuantificación de proteínas se hizo con el método de Bradford. Los productos SE y antígeno somático fueron separados en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) al 12%, por el método de Laemli (1970), descrito en el anexo I (página 43). Se utilizaron 5 μ g para cada carril. Se transfirió a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Biorad), usando una cámara semiseca (Trans-Blot[®]SD, Biorad) durante 45 min. a 100 V. El bloqueó se hizo con Blotto B (leche descremada al 1%, BSA 1%, Tween-20 al 0.05% en amortiguador TBS (Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8) toda la noche a 4°C. Se lavó la membrana en 3 ocasiones por 5 minutos con Tween-20 al 0.05% en TBS. Posteriormente la membrana fue incubada por 1.5 horas con el anticuerpo primario (5 μ g/ml de IgG y en el caso de los sueros se utilizó una dilución 1:100) en Blotto B. Después de lavar, se incubó con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución de 1:3000 en Blotto B durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. La unión de la inmunoglobulina fue revelada utilizando 3, 3'-Diaminobenzidina (DAB). Se utiliza una tableta de DAB y una de urea con peróxido de hidrógeno (Sigma fast D4418) disueltas en 15 ml de agua destilada.

4.8. Sistema phage display

La biblioteca Ph. D.-12 (Phage Display Peptide Library kit Cat. E8110S; Biolabs, New England, USA.) es de tipo pIII: el péptido artificial de 12 aminoácidos se

encuentra unido a la región N-terminal de la proteína III de la cápside del bacteriófago, hay de 1 a 5 copias por fago y no requiere de un bacteriófago ayudador para ser infectiva. La biblioteca contiene aproximadamente 2.7×10^9 clonas del fago, cada una de las cuales presenta un péptido de 12 aminoácidos diferentes fusionados a una secuencia que codifica para tres glicinas y una serina. La biblioteca fue amplificada por el fabricante para obtener 55 copias de cada secuencia en 10 μ l. Los experimentos de panning se hicieron según el fabricante (Biolabs).

4.9. Biopanning

Para los experimentos de biopanning se utilizó IgG de conejo dirigida contra una fracción de productos de SE de *F. hepatica*.

Para desarrollar esta estrategia se empleó una matriz de afinidad de anticuerpos inmovilizados, a la que es expuesta la biblioteca Ph. D.-12, con la cual son capturados los fagos reactivos. Este método no discrimina entre una afinidad moderada y alta (Cwirla *et al*, 1990).

Debido a la poca cantidad de IgG donada (6 μ l con una concentración de 5.81 mg/ml), se optó por la siguiente estrategia: a los 34.88 μ g de IgG se les diluyó en 200 μ l de PBS, este volumen se repartió en tres pozos de una placa de poliestireno de 96 pozos marca Immulon (4 flat bottom plates). A un pozo se le agregó 100 μ l (17.44 μ g) de la dilución de IgG para la primera ronda de biopanning, para la segunda ronda, otro pozo recibió 8.72 μ g y para el tercer y cuarto pozo destinados a la última ronda, se les administró, 7.5 y 3.7 μ g de IgG. El volumen se completó a 100 μ l con PBS. Los microlitros restantes se guardaron a -20°C para su posterior uso.

Esta placa se incubó toda la noche con agitación suave a 4°C. Al día siguiente se lavó con Tween-20 al 0.1% en PBS por 4 ocasiones con un volumen de 200 μ l por 2 minutos en una campana de flujo laminar, inmediatamente después, se bloquearon los pozos con 300 μ l de BSA al 1% en PBS por 1 hora a 4°C sin

agitación. Se retiró la solución de bloqueo y se lavó con Tween-20 al 0.1% en PBS 6 veces con un volumen de 200 µl por 2 minutos en la campana de flujo laminar. Se cubrió con parafilm y se hizo una pequeña ventana en el pozo para la primer ronda, a éste se añadió la biblioteca Ph.D.-12: 2×10^{10} bacteriófagos en 190 µl de PBS Tween-20 al 0.1% e incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se lavó 10 veces con 200 µl de Tween-20 al 0.1% en PBS por 2 minutos en la campana de flujo laminar. Se añadieron 100 µl de glicina HCl 0.2 M pH 2.2 y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el eluído y se neutralizó añadiendo 15 % de Tris base 1M pH 9.1, se tituló; para la segunda ronda se manipulo el 30 % del eluído de la primera ronda, se diluyo en 70 % de PBS y para la tercera ronda se utilizo el 25 % del eluído de la ronda anterior, se diluyo en 75 % de PBS.

4.10. Amplificación de clonas seleccionadas

Se tomó una colonia de células E. coli ER 2738 de una caja LB-tetraciclina y se sembró en un matraz con 100 ml medio de cultivo 2xYT, se cultivo durante la noche a 260 rpm y se mantuvo a 37°C. Se tomaron 20 ml para cada matraz de 150 ml, a los que se les adicionó 15 µl de los eluídos virales de la primera y segunda ronda, se incubaron durante 4.5 horas, a 37°C en agitación constante (260 rpm). Las células se eliminaron por centrifugación (11000 rpm). Al sobrenadante se le agregó $\frac{1}{4}$ del volumen de PEG/NaCl (20% de polietilenglicol 8000 en cloruro de sodio 2.5 M, esterilizado en autoclave), se homogeneizó e incubó en hielo, transcurrida 1 h se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10000 rpm. A la pastilla se le resuspendió en 100 µl de PBS con 0.1% de azida de sodio. Por último se centrifugó a 10000 rpm 2 minutos y el sobrenadante se guardó a 4°C para hacer futuros tamizajes.

De la tercera ronda de biopanning, los bacteriófagos se crecieron sobre un césped de bacterias en placa de LB-Xgal. Se amplificaron 18 clonas seleccionadas al azar de cada caja (las que se veían azules a contraluz). Se

picaron con una punta de micropipeta y se sembraron en tubos de 15 ml que contenía 3 ml medio 2xYT y 10% de un cultivo de toda la noche de *E. coli* ER 2738. Se incubó a 37°C a 270 rpm. Pasadas 4.5 h se tomó un ml para obtener ADN y el resto se centrifugó a 4°C, durante 8 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se colectó y centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se repitió la colecta del sobrenadante y el centrifugado. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 ml que contenía 50 µl de PEG/NaCl, se homogeneizó e incubó en hielo; transcurrida 1 h se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10000 rpm. A la pastilla se le resuspendió en 100 µl de azida de sodio al 0.4% disuelta en PBS. Por último se centrifugó a 10000 rpm 2 minutos para retirar impurezas y el sobrenadante se guardó a 4°C para hacer los ensayos de titulación y ELISA.

4.11. Titulación de clonas recuperadas

Para la titulación del primero, segundo y tercer panning, se hicieron 3 diluciones (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9}) de los fagos eluidos en 1 ml de medio de cultivo LB, se tomaron 10 µl de cada dilución y 200 µl de un cultivo de *E. coli* (cepa ER 2738) crecido previamente durante la noche; esta mezcla se incubó 5 minutos y se agregó a un tubo de 15 ml que contenía 4 ml de medio agarosa Top (1% de bacto triptona, 0.5% de extracto de levadura, 5 g de cloruro de sodio, 1 g cloruro de magnesio, 7 g agarosa por litro de agua destilada) mantenido a 45°C, se mezcló por inversión y se transfirió a una caja de petri con LB/agar (1.5% de agar en medio LB). Para determinar las placas líticas, se forma un césped de bacterias, se cuentan los puntos en donde no hay bacterias a simple vista (placas de lisis) y se determinan las unidades formadoras de placa (UFP).

Para determinar el número de bacteriófagos recuperados, después del proceso del segundo y tercer biopanning se hicieron 3 diluciones (10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9}) de los fagos eluidos en un mililitro de medio de cultivo Luria (LB), se tomaron 10µl de cada dilución y 200 µl de un cultivo de *E. coli* (cepa ER 2738) crecido

previamente durante la noche, esta mezcla se incubó 5 minutos y se agregó a un tubo de 15 ml que contenía 4 ml de medio agarosa Top mantenido a 45°C, se mezcló por inversión y se transfirió a una caja de petri con 10 ml de LB/agar adicionado con 0.1% de IPTG/Xgal (1.25 g de isopropil β -D-tiogalactosido y 1 g de 5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D-galactosido en 25 ml de dimetil formamida), se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 37°C. Al siguiente día se contaron las placas y se multiplicaron por el factor de dilución, lo obtenido fueron unidades formadoras de placa (UFP) en 10 μ l, se multiplica por 100 para determinar el título por mililitro.

4.12. Evaluación de la antigenicidad de las clonas inmunodominantes por ensayo de ELISA indirecto

Se sensibilizaron placas de 96 pozos, utilizando 1×10^{11} ufp de cada clona amplificada en PBS. Se incubó toda la noche a 4°C, al día siguiente las placas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con 200 μ l de PBS, Tween-20 al 0.05%. Se bloqueó por 30 minutos a 37°C con 200 μ l por pozo de una solución de BSA al 5%, Tween 20 al 0.05% diluidos en PBS. Se quitó esta solución de bloqueo y se repitieron los lavados. La incubación con los anticuerpos primarios (suero) fue durante 2.30 h a 37°C o a 4°C toda la noche. Se procedió a lavar las placas, 3 veces por 5 minutos con 200 μ l de una solución de Tween-20 al 0.05% en PBS. Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a HRP (peroxidasa de rábano), diluidos 1:2000 en PBS/Tween-20 al 0.05%, se incubaron 1.5 h a 37°C. Se lavó 3 veces por 5 minutos con 200 μ l de una solución de Tween 20 al 0.05% en PBS. Se adicionaron 100 μ l/pozo de substrato, solución que contenía 4 μ l de peróxido de hidrógeno, 4 mg OPD en 10 ml de amortiguador de citratos 0.1 M, y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente hasta que los controles negativos viraran de color. La reacción fue interrumpida adicionando 50 μ l por pozo de ácido sulfúrico 1M. La absorbancia fue medida a 492 nm en el lector de placas ELISA.

4.13. Evaluación de la reactividad antigénica de las clonas seleccionadas por ensayo de ELISA directo

Se sensibilizaron placas de 96 pozos, utilizando 100 μ l por pozo con 5 μ g de IgG como anticuerpo primario, 0.2% de BSA y Tween-20 al 0.2% en PBS. Se incubó toda la noche a 4°C o 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 4 veces por 5 minutos con 200 μ l de PBS/Tween-20 al 0.01%. El bloqueo se hizo con 200 μ l de BSA al 1% en PBS durante 1 h a 37°C. Se lavó 4 veces por 5 minutos con 200 μ l de PBS Tween-20 al 0.01%. Se adiciono la clona (10^{10} fagos por pozo) diluida en 100 μ l de una solución de Tween-20 al 0.02%, BSA al 0.02% en PBS y se incubó 2.5 h a 4°C con agitación constante a 4°C durante la noche. Se lavó 6 veces con Tween-20 al 0.01% en PBS. El anticuerpo secundario, dirigido contra pIII de M13 acoplado a peroxidasa se diluyó 1:5000 en solución de bloqueo y se agregaron 200 μ l por pozo, se dejó 1.5 h a temperatura ambiente. Se lavó 6 veces por 3 minutos con 200 μ l de PBS Tween-20 al 0.01%. El revelado fue realizado agregando 100 μ l del substrato (5 μ l de peróxido de hidrógeno y una pastilla de ácido 2,2'-Azino di-etilbenzotiazolin-sulfónico (ABTS-sigma Cat. P-6782) que se disolvió en 10 ml de amortiguador de citratos 0.1 M pH 4.5), se hicieron lecturas a 405 nm entre los 20 y 60 minutos siguientes.

4.14. Evaluación de clonas inmunodominantes por ensayo de ELISA competitivo

La placa se sensibilizó con IgG (5 μ g/ml) y sueros de: borrego 1 (positivo), borrego 4114 (negativo), conejo 1 (conejo inmunizado con antígeno somático) y conejo 2 (suero preinmune), en una proporción 1/400 en solución de dilución de muestras. Se incubó durante la noche a 4°C, para después lavar con solución de lavado (PBS/Tween-20 al 0.05%) 5 veces. Enseguida se le agregaron 200 μ l de solución de bloqueo a cada pozo y se incubó en agitación constante a temperatura ambiente 2.5 h. Mientras tanto se tomaron 10^{10} fagos de las clonas 1, 3 y 5 para ser pre-incubadas con el competidor (antígeno somático 5 μ g/0.1 ml)

en PBS con 2% de BSA y 0.2% de Tween-20, durante 10 min a temperatura ambiente para posteriormente la mezcla adicionarla a los pozos sensibilizados. Se incubó 2.5 h en agitación constante a 37°C. Se lavó 7 veces con solución de lavado. El anticuerpo secundario empleado fue α -M13 en dilución 1/5000. Se reveló con 200 μ l de ABTS disuelto en amortiguador de citratos. Se tomó lectura a 405 nm, aproximadamente 40 minutos después de agregado el ABTS.

4.15. Secuenciación de clonas seleccionadas de la biblioteca

A 1 ml de la suspensión de fagos, se le adicionaron 400 μ l de PEG al 20% en NaCl 2.5 M y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C, al botón se le resuspendió en 100 μ l de solución de yoduro (10 mM de Tris HCl pH 8, 1 mM de EDTA y 4 M de yoduro de sodio en 1 ml de agua destilada) y se adicionaron 250 μ l de etanol al 95%; se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm, se decantó el sobrenadante y al botón se le resuspendió en etanol al 70%, se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm y se resuspendió en 30 μ l de amortiguador TE (10Mm de Tris HCl pH 8, 1 mM de EDTA).

Se procedió a hacer la cuantificación del ADN por fluorometría, se incubó con 10 μ l del reactivo Hoesch 33258 1mg/ml, para tomar las lecturas se usó un fluorómetro Hoefer (Quant DQ200). Enseguida se hizo una reacción de PCR de secuencia (150 ng de ADN, 3.2 pmol de primer -96 gIII y del kit BigDye v.3.1 (Applied Biosystems) se agregaron 4 μ l del buffer 2.5x y 2 μ l del buffer 5x, finalmente se agregó H₂O cuanto bastara para 20 μ l.

El producto de reacción de PCR se filtró con una columna de 1 ml Sefadex G50 previamente empaquetada y equilibrada. El producto recuperado se seco en un Speed-Vac® y se procedió a resuspender con 15 μ l de formamida, se agitó 30 seg. a máxima velocidad en vortex, se incubó 3 min a 95°C y después 5 min en hielo. Los productos de secuenciación se leyeron en un equipo automatizado (ABI PRISM® 310, de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana) con un tiempo de inyección de 20 a 60 seg.

5. Resultados

Para hacer los experimentos de bioanálisis, determinación de inmunoreactividad y secuenciación de clonas, hubo que hacer algunos experimentos preliminares para asegurar la disponibilidad de material biológico, así como el correcto manejo de las técnicas. Lo primero fue obtener antígeno somático y productos de secreción-excreción (SE) de *F. hepatica*, para con ellos diagnosticar a los animales muestreados en campo, caracterizar los sueros obtenidos y purificar IgG.

5.1. Aislamiento de parásitos adultos de *F. hepatica* de hígados de bovinos y obtención de antígeno somático y productos SE

Se obtuvo antígeno somático y productos SE a partir de fasciolas adultas aisladas de los conductos biliares de hígados de bovinos conforme al método descrito. Se dializaron utilizando una membrana con límite de exclusión de 3500 Daltones (Spectrapor 3), durante 24 horas, después se cuantificó por el método de Bradford, para enseguida ser evaluado junto con los productos SE en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie G250 (Fig. 1). Los antígenos somáticos muestran un patrón complejo de proteínas que van desde <7 KDa hasta 194 KDa. En cambio los productos SE muestran unas bandas principales alrededor de los 29 KDa.

5.2. Evaluación de la inmunización de conejos con antígeno somático y productos SE por ensayo de ELISA

A dos conejos hembra, Nueva Zelanda, de 2.5 Kg de peso, se les inmunizó con antígeno somático. En la Fig. 2 se muestran los resultados de las inmunizaciones con antígeno somático. En la Fig. 2A se pueden apreciar los resultados de la sensibilización de placa para ensayos de ELISA con 5 µg de los antígenos somático y 5 µg de productos SE. En la Fig. 2B, se sensibilizó con 10

μg de antígeno somático y 10 μg de productos SE. Se hicieron diluciones seriadas de los sueros de 1:1000 a 1:12800, para conocer la óptima concentración a la que se podía detectar inmunoreactividad, en esta figura se muestra que con el suero C1 y C2 contra 5 μg y 10 μg de antígeno somático, se obtuvo la misma reactividad. Podemos observar que el suero C1 resulto negativo contra productos de SE.

5.3. Purificación y evaluación de IgG de conejo inmunizado con antígeno somático contra productos SE y antígeno somático de *F. hepatica*

Se purificaron las IgG del suero de C2 (Fig. 3) por medio de inmunocromatografía de afinidad empleando dos columnas con NHS acoplado a sefarosa, a una se le unieron productos SE (Fig. 3A) y a la otra proteínas del antígeno somático (Fig. 3B), esto con el fin de obtener IgG altamente inmunoreactivas y buscar la oportunidad de seleccionar clonas inmunodominantes. Los picos colectados están marcados con un asterisco. Se hizo una mezcla de las fracciones colectadas, para ser concentradas por centrifugación. Se evaluó su integridad en un gel de poliacrilamida (Fig. 4), en donde se aprecian las IgG sin hervir (carril 1 y 2) y las IgG hervidas (carril 4 y 5). Se obtuvieron IgG purificadas de suero de conejo inmunizado con antígeno somático potencialmente reactivas a productos SE y antígeno somático.

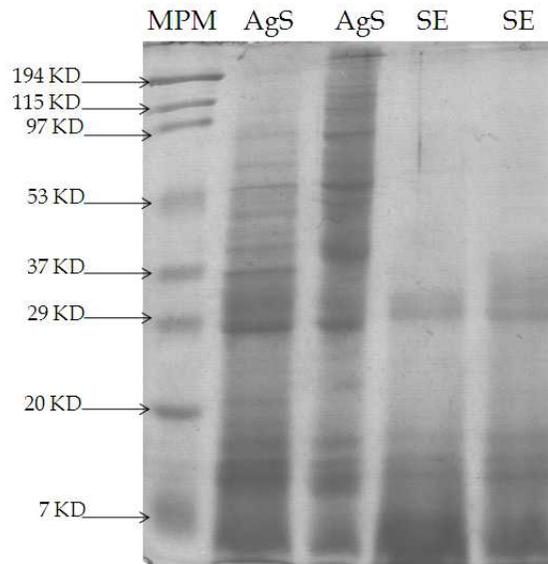


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de antígeno somático y productos de secreción-excreción de *F. hepatica*. El carril MPM, corresponde al marcador de peso molecular, el carril AgS₁, corresponde a 10 µg de antígeno somático y en el carril AgS₂ se cargaron 15 µg. En los carriles SE1 y SE2 se cargaron 10 y 15 µg de productos SE, respectivamente.

ELISA de Titulación de los sueros de conejos inmunizados con antígeno somático

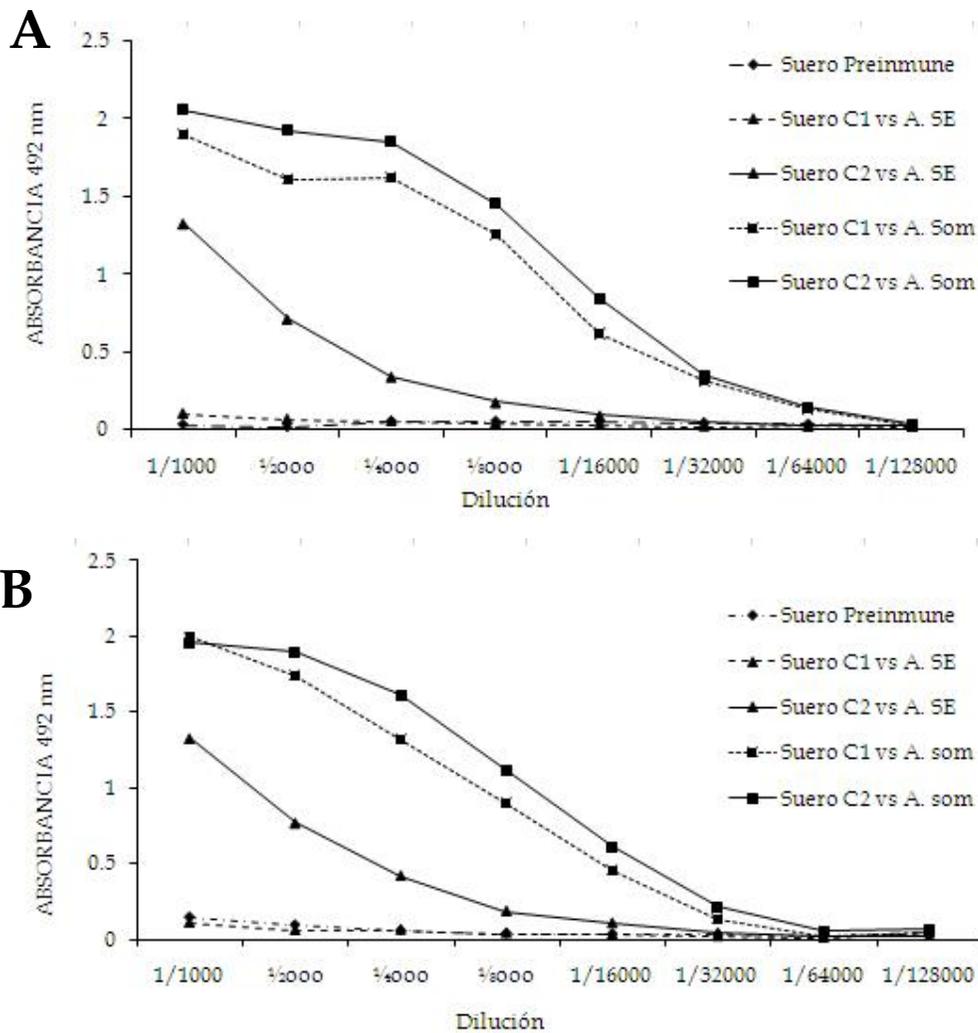


Figura 2. ELISA de titulación de los sueros de conejos inmunizados con antígeno somático. Las placas fueron sensibilizadas con antígeno somático y productos SE, con 5µg/pozo para A y 10 µg/pozo para B. Como control negativo se utilizó el suero de los conejos preinmunizados. Se presentan los promedios de los valores de ensayos duplicados.

Cromatograma de la purificación de IgG

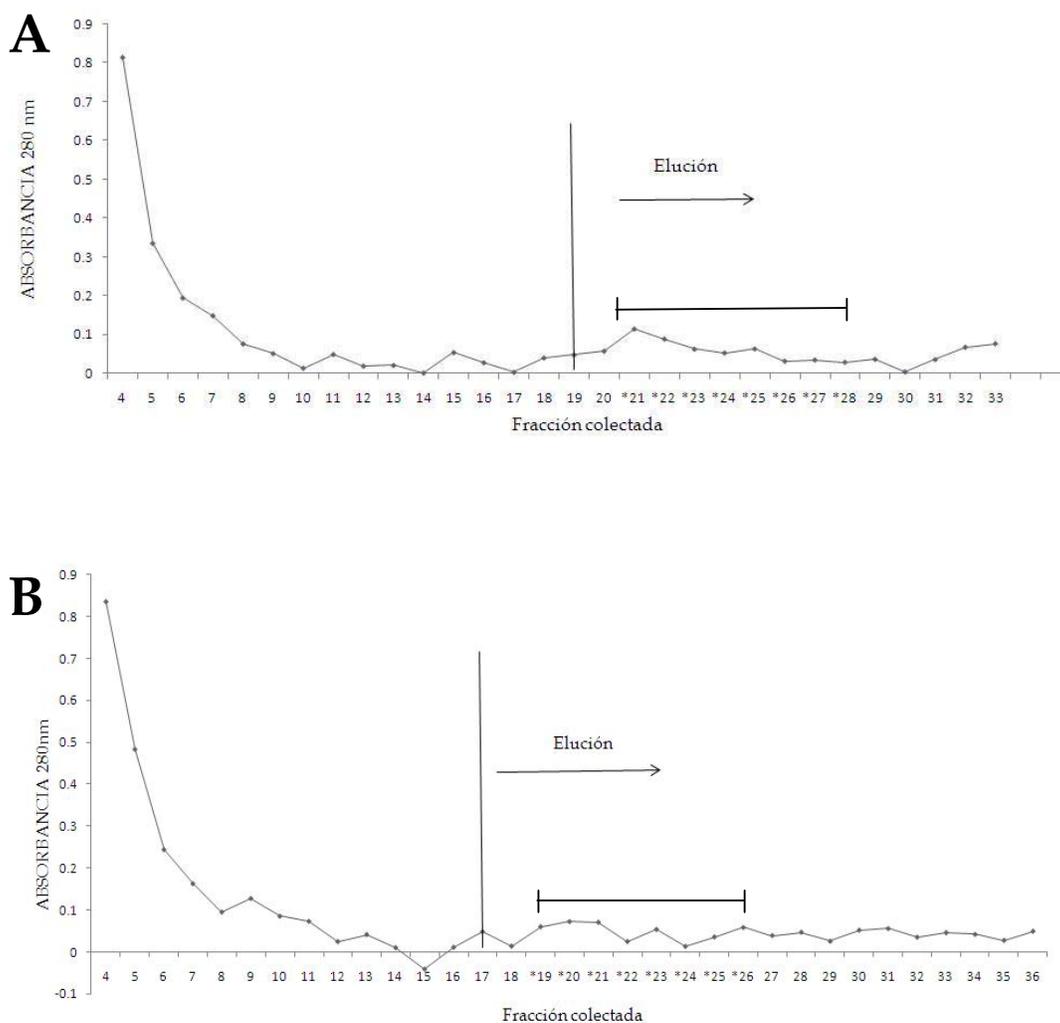


Figura 3. Cromatograma de la purificación de IgG de conejo. Se acoplo a sefarosa activada NHS productos SE (A) y antígeno somático (B), se hizo pasar suero del conejo 2 (C2). Los números de fracción eluídas de 1 ml que se indican con asterisco, presentaron la mayor cantidad de IgG.

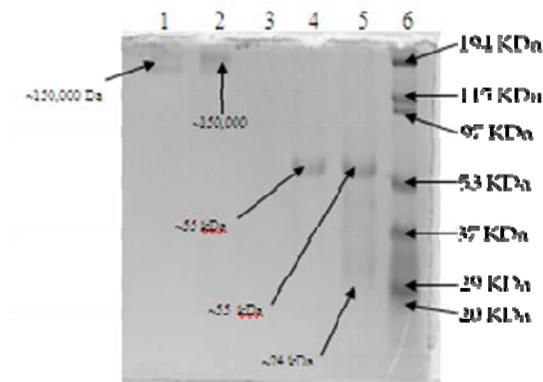


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de anticuerpos contra *Fasciola hepatica*. En cada uno de los carriles se cargaron 10 μ g de IgG. En los carriles 1 y 4 las IgG purificadas con la columna de antígeno somático acoplado a NHS-sefarosa. En los carriles 2 y 5 las IgG obtenidas empleando la columna de productos SE acoplados a NHS-sefarosa. En el carril 1 y 2 se cargaron las proteínas sin hervir, para cargar los carriles 4 y 5 las IgG se hirvieron. El marcador de peso molecular se colocó en el carril 6.

5.4. Evaluación de la especificidad de reconocimiento de sueros de borregos positivos y negativos a *F. hepatica* por ensayo de ELISA

Para establecer los controles positivos y negativos de las IgG, fue necesario hacer un muestreo que se realizó en el municipio Chapa de Mota, estado de Hidalgo. Se obtuvieron muestras de heces y sangre de 7 borregos pelibuey. Las heces se evaluaron con el método de sedimentación (se describe en el anexo I, página 38), que permite ver de manera cualitativa la presencia o ausencia de huevos de *Fasciola* en las heces. Los siete animales muestreados resultaron positivos a *Fasciola*, presentaban incontables huevos, los borregos 1 y 6 presentaron el mayor número, los borregos 5 y 7 presentaron el menor número de huevecillos. Se obtuvo el suero y se evaluó en ELISA contra antígeno somático (Fig. 5A) y productos SE (Fig. 5B), en donde se ve una diferencia de aproximadamente 0.15 y 0.3 de absorbancia entre el suero positivo y el suero negativo de los borrego, contra el antígeno somático y los productos SE, respectivamente. Los resultados de la mezcla de los sueros negativos no muestran reacción contra los antígenos.

Debido al gran interés por conseguir un método diagnóstico o una vacuna, contra la fasciolosis, se logró obtener IgG de la mezcla de los sueros de borregos colectados en Chapa de Mota, por medio de inmunocromatografía de afinidad empleando un equipo AKTA prime y haciendo uso de dos columnas HiTrap, una de proteína A (Fig. 6) y otra de G (resultado no presentado) acopladas a sefarosa. Las fracciones seleccionadas de IgG obtenidas se dializaron y se evaluaron en electroforesis (Fig. 7).

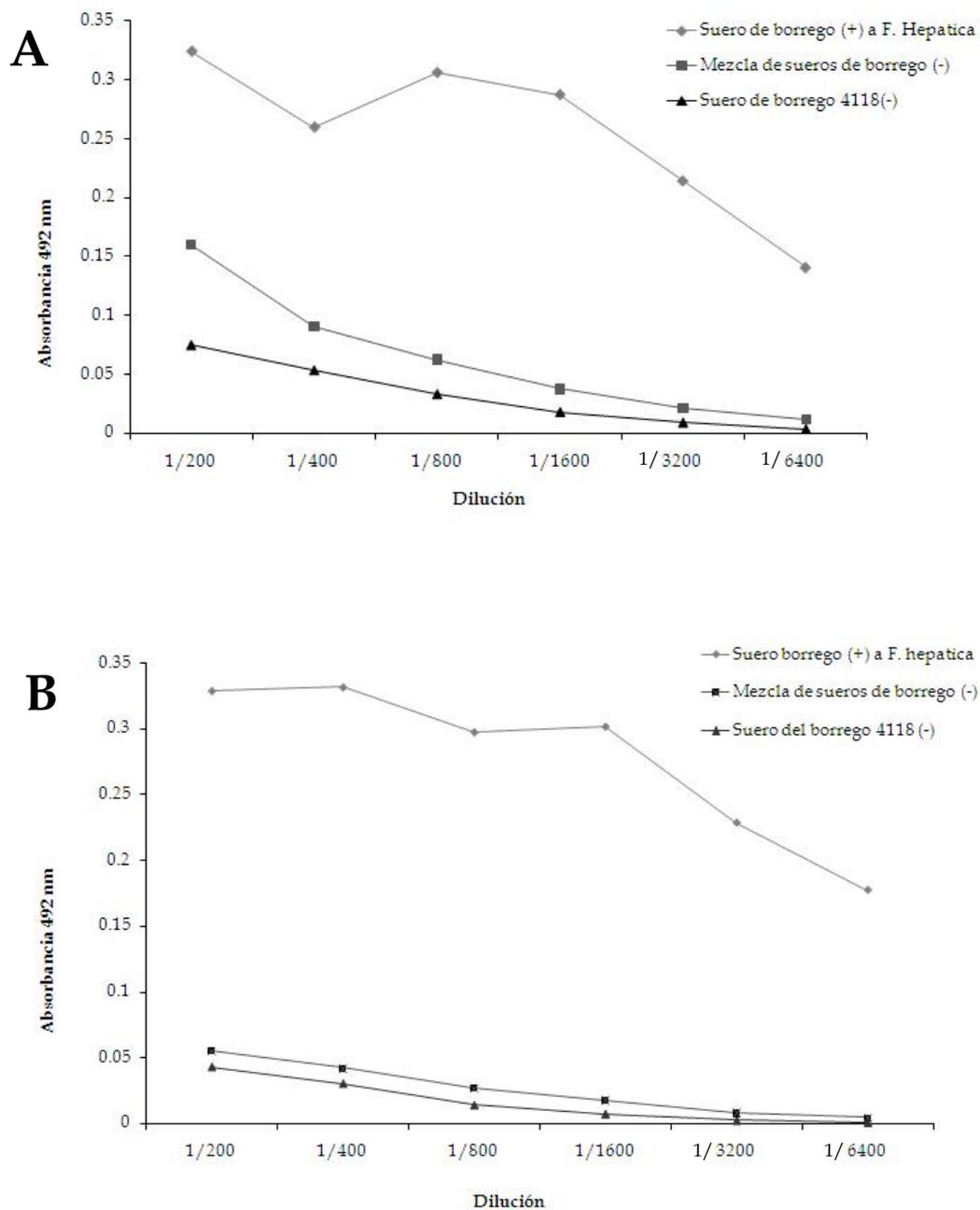


Figura 5. ELISA indirecto de borregos negativos y positivos a *F. hepatica*. En A se utilizó antígeno somático para sensibilizar la placa (10 µg/pozo), y en B los productos de SE fueron utilizados como antígeno (10 µg/pozo).

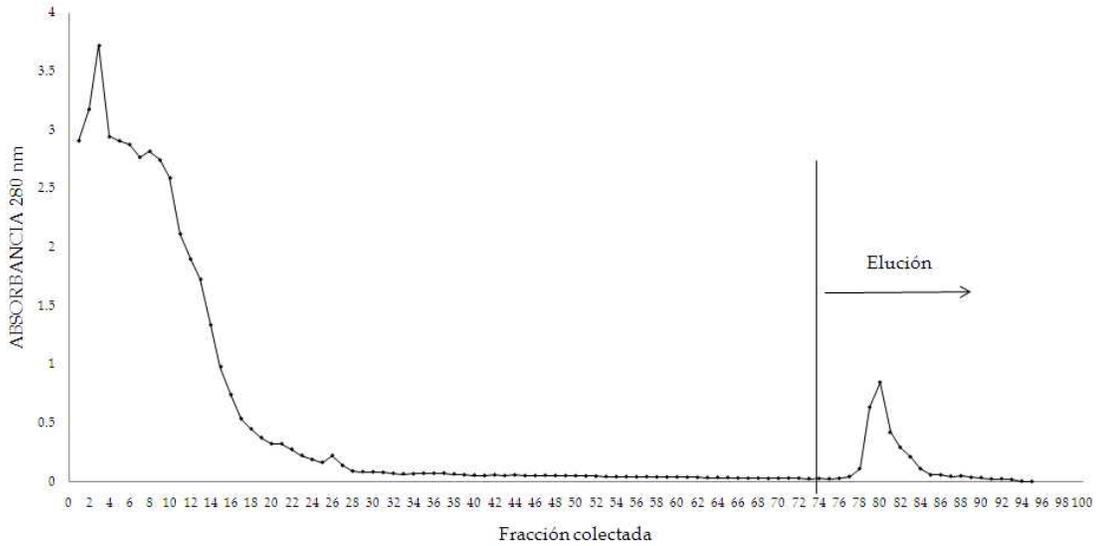


Figura 6. Cromatograma de la purificación de IgG de borrego. A través de una columna de proteína A acoplada a sefarosa, se hizo pasar una mezcla de sueros de borregos positivos. Las fracciones eluidas colectadas fueron de la 78 a la 84 ya que presentaron la mayor cantidad de IgG.

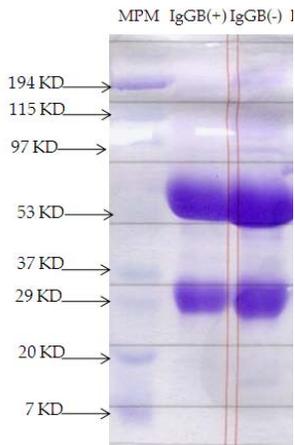


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida para la evaluación de las IgG purificadas con proteína G acopladas a sefarosa, el carril IgGB (+), corresponde a 40 μ g de IgG obtenidas de una mezcla de sueros de borrego infectados naturalmente con *F. hepatica*, en el carril IgGB (-), se cargaron 40 μ g de IgG producto de la mezcla de sueros negativos de borrego para *F. hepatica*.

5.5. Evaluación de IgG dirigida contra productos SE de *F. hepatica* por Western blot y ELISA

Las IgG dirigidas contra una fracción de productos SE (proporcionadas por el Dr. Quiroz), se evaluaron por Western blot (Fig. 8). Se hizo una electroforesis por duplicado en un gel de poliacrilamida al 12%, con los productos SE (15 µg) y antígeno somático (15µg), un gel se tiñó y el otro se transfirió a una membrana de PVDF. Después de la transferencia, la membrana se cortó en tiras, una tira con antígeno somático y a otra con productos SE, se incubaron con una dilución 1:50 de una mezcla de sueros de borregos positivos a *F.hepatica*, colectados en Chapa de Mota .Otras dos tiras, una con antígeno somático y otra con productos SE, se incubaron con IgG dirigida contra una fracción de productos SE. Después, se incubaron con α -borrego y α -conejo en dilución 1:5000, como correspondían. Se reveló con DAB. Lo que se aprecia en la Fig. 8, es que los sueros de borregos reconocen en general las mismas bandas detectadas por tinción con Coomasie (Fig. 8A), mientras que las IgG contra una fracción de productos SE identifican varias proteínas presentes tanto en los productos SE como en el soma de *F. hepatica*. Varias de las proteínas identificadas en los productos SE no son visibles con tinción con Coomassie (Fig. 8B).

En la figura 9 se muestra la reactividad de los anticuerpos contra productos SE y los anticuerpos contra el antígeno somático del conejo 2, purificados con una columna de productos SE acoplados a NHS-sefarosa. Se encontró que los anticuerpos purificados reaccionan tanto a los productos SE como a el antígeno somático.

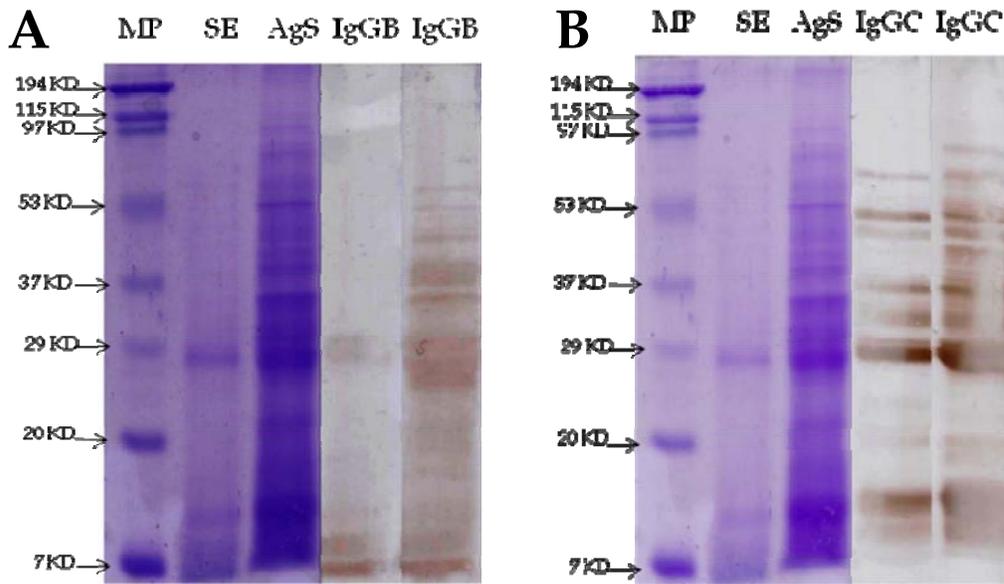


Figura 8. Electroforesis de los productos SE y antígeno somático evaluado en un gel de poliacrilamida al 12% (A y B: carril MP, marcador de peso molecular, carril SE, 15 µg de productos SE, carril AgS, 15µg de antígeno somático). **A**, carriles IgGB, **análisis Western Blot** de carriles SE y AgS con los sueros (dilución 1:50) obtenidos de borregos positivos a *F. hepatica*. **B**, carriles IgGC, análisis Western Blot de carriles SE y AgS con las IgG (0.5µg/ml) obtenidas del conejo inmunizado con una fracción de productos SE.

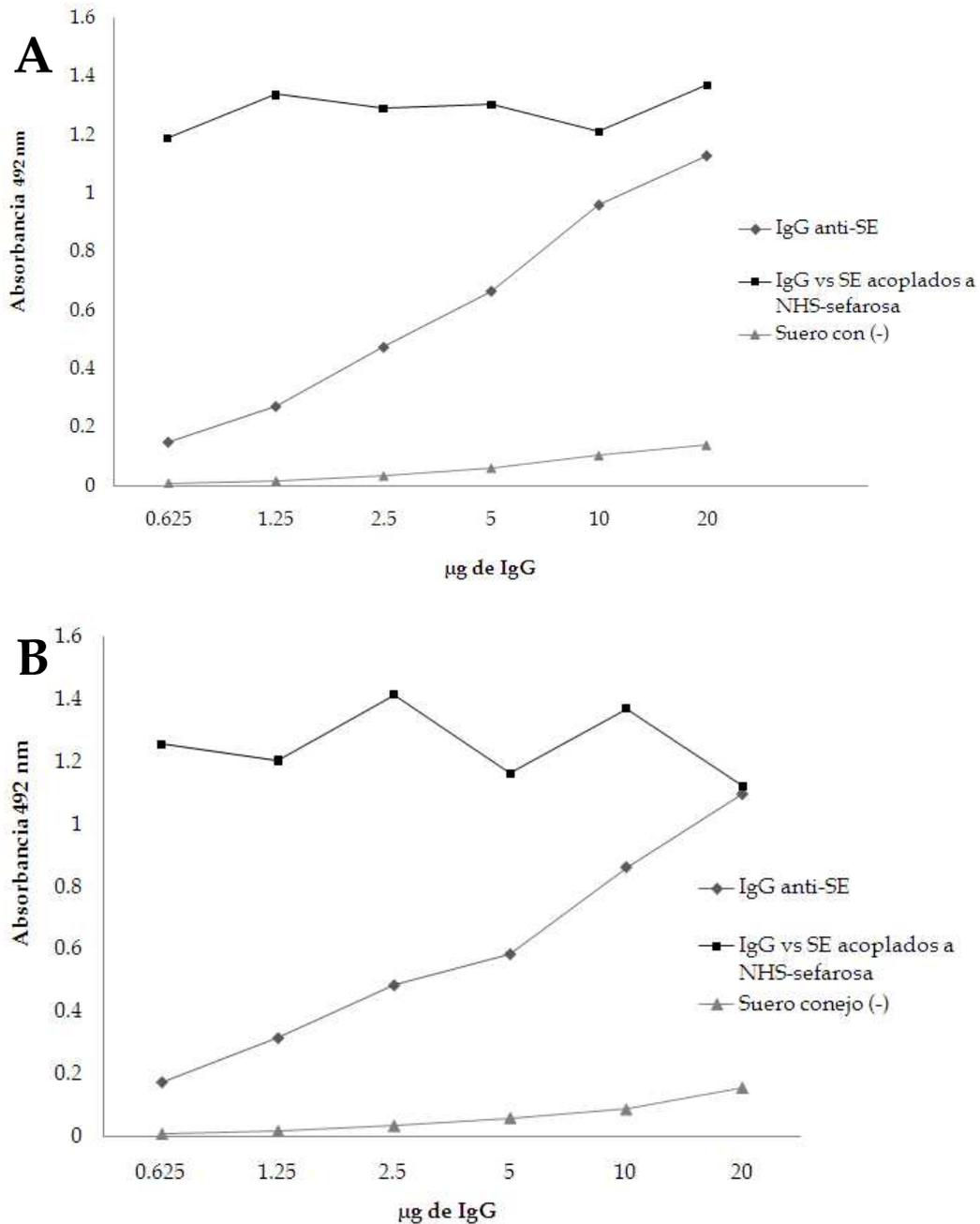


Figura 9. ELISA indirecto con las IgG del conejo inmunizado con una fracción de productos SE y anticuerpos purificados del conejo 2 inmunizado con antígeno somático purificados con productos SE acoplados a NHS-sefarosa. Para sensibilizar la placa, en A se utilizaron 100 µg/ml de productos SE y en B se manejaron 100 µg/ml de antígeno somático.

5.6. Selección clonas inmunodominantes de una biblioteca combinatoria de Phage Display, empleando anticuerpos dirigidos contra productos SE.

Una vez caracterizadas las IgG dirigidas contra una fracción de productos SE, se procedió a seleccionar clonas de la biblioteca Ph.D-12, comenzando con el biopanning. Las tres rondas de biopanning se hicieron en matriz de afinidad de anticuerpos inmovilizados. Para la primera ronda se utilizaron 2×10^{11} fagos de la biblioteca original Ph.D-12 y 17.44 μg de IgG en PBS. Para las rondas subsecuentes se tomaron los microlitros eluidos amplificados de la ronda anterior y se cambió la concentración de las IgG. En la segunda ronda se emplearon 8.72 μg ; para la tercera ronda se hicieron dos selecciones del segundo eluido, una con 3.7 μg y otra con 7.5 μg . El resultado del enriquecimiento para cada uno de los eluidos de las rondas de tamizaje se presenta en la Tabla 1. De la ronda tres se eligieron 18 clonas al azar de las seleccionadas con 3.7 μg y 18 clonas individuales de las seleccionadas con 7.5 μg . Se amplificaron para realizar un ensayo de ELISA, obtener su secuencia y guardar para su futuro uso.

5.7. Evaluación de la antigenicidad de las clonas inmunodominantes seleccionadas por ELISA

Se realizaron dos procedimientos por el método de ELISA (indirecto y directo), con las 36 clonas seleccionadas. Cada clona se probó por duplicado. Para el ELISA indirecto (Fig. 10A), se agregaron de 10^9 a 10^{10} fagos de cada clona por pozo. La concentración de las IgG fue de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El anticuerpo secundario α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano se diluyó 1:5000. El sustrato peroxidasa de rábano (HRP), fue una pastilla FAST™ 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) en 10 ml de agua des-ionizada y 1% de peróxido de hidrógeno, la absorbancia se leyó a 405 nm. Para el ELISA directo (Fig. 10B), se sensibilizó con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la IgG. Se usaron de 10^9 a 10^{10} fagos por pozo como anticuerpo

primario. El anticuerpo secundario monoclonal empleado fue anti pIII de M13 acoplado a HRP en una dilución 1:5000. Para el sustrato de peroxidasa de rábano (HRP) se pusieron 2 pastillas de FAST™ 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) en 10 ml de agua des-ionizada y 1% de peróxido de hidrógeno, la absorbancia se leyó a 405 nm.

Se llevó a cabo un ensayo de competencia (Fig. 11), utilizando tres de las clonas mas inmunoreactivas que resultaron del ensayo de ELISA directo: la uno, la tres y la cinco. Se evaluaron contra la IgG dirigida contra una fracción de productos SE, al igual que contra sueros positivos y negativos a *F. hepatica* de borrego y conejo. La fig. 11A explica este ensayo. La clona 1 en presencia de los productos SE disminuyó en un 61.7% la reactividad, con lo que se verifica el reconocimiento específico por las IgG dirigidas contra una fracción SE.

5.8. Obtención de secuencias de ADN de las clonas seleccionadas de la biblioteca

De los resultados de ELISA (Fig. 10) se seleccionaron las clonas más inmunoreactivas, (marcadas con asterisco en el número de clona). Para determinar la secuencia de las clonas se procedió a hacer un amplificado de bacteriófagos (Tabla 2), extracción de ADN y una reacción de PCR de secuencia, que se hizo de 10 clonas seleccionadas por discriminación, de forma directa, ya que no se requiere una amplificación previa por que el genoma es de cadena sencilla, resultados que se muestran en la tabla 3.

Tabla 1. Enriquecimiento de las clonas seleccionadas durante el panning

Numero de ronda	Titulo de eluido (ml)	Titulo de eluido amplificado (ml)
I	2×10^5	6.7×10^{12}
II	4.6×10^5	6×10^{11}
III	5×10^6	

Nota: el titulo del amplificado para la tercera ronda se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Amplificación de clonas seleccionadas con IgG de un conejo inmunizado con una fracción de Ag SE

Clonas seleccionadas con 3.75 μ g

Clonas seleccionadas con 7.5 μ g

Nro. de clona	Titulo	Nro. de clona	Titulo
1	6×10^{11}	19	2.7×10^{12}
2	1.4×10^{12}	20	1.1×10^{12}
3	2.2×10^{12}	24	1.7×10^{12}
4	1.3×10^{12}	26	-----
5	1×10^{12}	27	-----
6	8×10^{11}	28	1.2×10^{12}
9	3×10^{11}	29	3×10^{11}
10	5×10^{11}	30	2×10^{11}
16	3×10^{11}	31	4×10^{11}
17	3×10^{11}	32	2×10^{11}

Reactividad de clonas seleccionadas

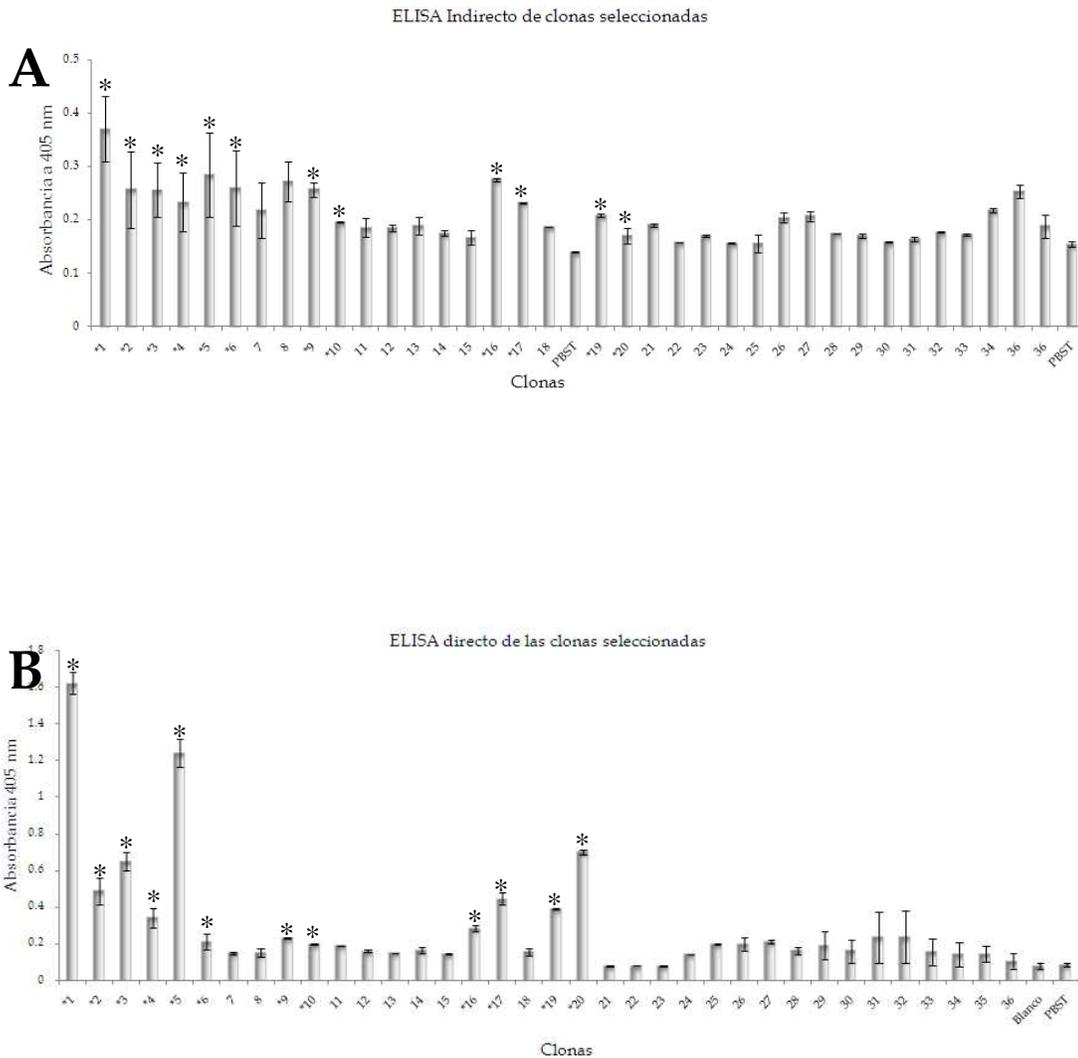


Figura 10. Identificación de clonas positivas. Para cada ELISA se probaron las 36 clonas seleccionadas al azar de la tercera ronda del panning. Del ELISA indirecto (**A**), se marcaron con asterisco las clonas seleccionadas. Del ELISA directo (**B**), se marcaron con asterisco las clonas que se seleccionaron por presentar la mayor reactividad. Se empleo PBST (PBS-Tween 20 0.5%) como control negativo.

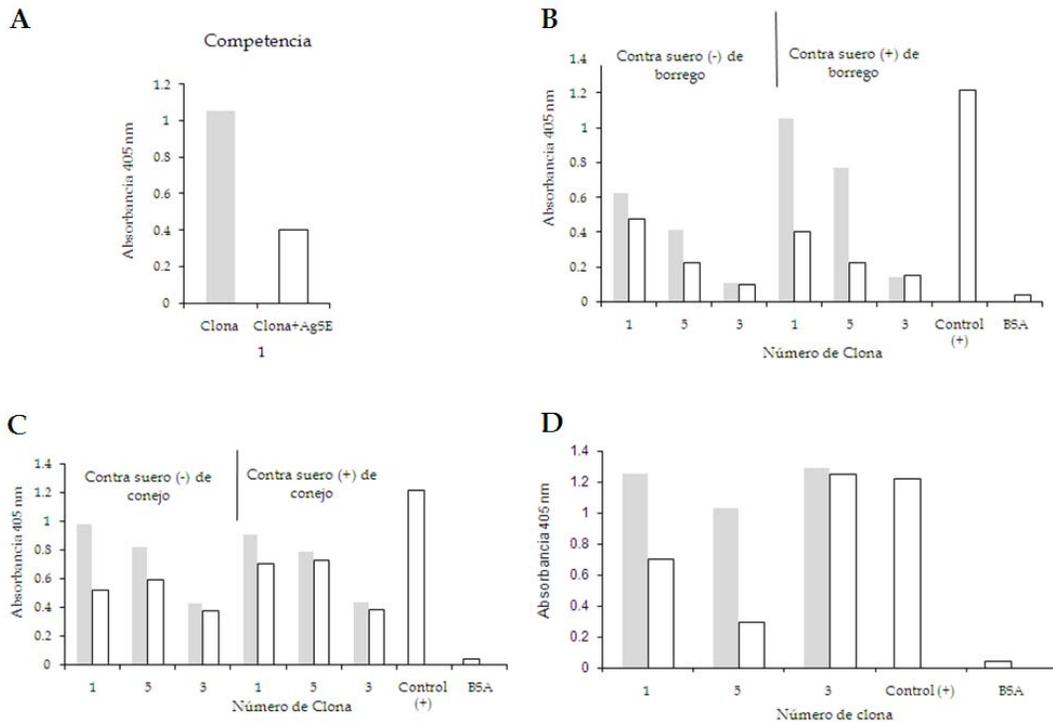


Figura 11. ELISA competitivo de las clonas 1, 3 y 5 seleccionadas del ensayo de ELISA directo contra los productos SE. Se presenta la reactividad de la clona 1, 5 y 3 (barras grises) frente a los sueros de borrego (B) y conejo (C), también, la reactividad con los sueros positivos (barras blancas) de borrego (B), conejo (C) y las IgG dirigidas contra una fracción de productos SE (D). Se emplearon 10^{10} bacteriófagos de la clona 1 como control positivo y $10 \mu\text{g/ml}$ de BSA como control negativo.

Secuencia de clonas

Clona	Secuencia
1	YVYRWVEAECVA
2	REPIYHKLHRLT
3	MRRSTRLLPLDT
5	WHVPRTWWVLPP
9	NMSPSYWRDYS
16	NTLSGQYFWRMP
17	YIDHIVLTIYLE
20	FSPAYLRDAALK

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de las clonas seleccionadas

6. Discusión

En el presente trabajo se inmunizaron conejos, los cuales han demostrado ser efectivos para la obtención de IgG (Rodell A.K. *et al.* 1976, Heatley N.G. 1977).

Se inmunizaron dos conejos con antígeno somático, el conejo 2 generó anticuerpos inmunoreactivos en el ensayo de ELISA al antígeno somático y productos de secreción-excreción (SE); en cambio el conejo 1, no resultó inmunoreactivo a productos SE, esto posiblemente se deba a que de la alícuota de antígeno somático empleada para inmunizar al conejo 1, fue descartada la fase acuosa después de centrifugar. Esto es interesante, ya que el tener IgG dirigidas específicamente contra el soma de *F. hepatica*, permitirá estudiar más detallados de interacción epítopo-parátopo, así como generar colecciones de mimótopos somáticos para evaluar su potencial como métodos de diagnóstico y la generación de una posible vacuna.

Para la obtención de IgG se utilizó la cromatografía de afinidad; esta técnica es empleada para la obtención de antígeno-anticuerpo (Wetsel R. A., 1995) y proteína-proteína (Söderström M. *et al.* 1995). En este trabajo se obtuvieron las IgG de conejo como se ve en la Fig. 3 A y B (fracciones 21 a 28 y 19 a 26 respectivamente), las cuales mostraron, en un gel de poliacrilamida, la cadena pesada y ligera (Fig. 4). La cadena ligera no se aprecia debido a la sensibilidad de la tinción con azul de Coomassie (Bollag Daniel M. *et al.* 1996). Las columnas acopladas con antígeno somático y productos SE son una herramienta poderosa para la purificación de IgG de las diferentes especies de interés comercial infectadas por *F. hepatica*, lo que permitirá en el futuro el estudio y caracterización de mimótopos seleccionados de bibliotecas combinatorias, así como la selección específica de proteínas de fusión para ser utilizados en la búsqueda de estimulantes eficaces de la respuesta inmune. Por esta razón se purificaron IgG de borregos infectados naturalmente (Fig. 7) que presentan similitud con las IgG del conejo infectado en el laboratorio (Fig. 4) con la única diferencia de que se aprecian las cadenas ligeras. Con esto se inicia la conformación de una colección de IgG contra *F. hepatica* que se pudiera emplear en futuras aplicaciones.

Las IgG dirigidas contra una fracción de productos SE, empleadas en los ensayos de selección de péptidos a partir de una biblioteca de fagos dodecapéptidicos, resultaron efectivas, ya que las clonas seleccionadas mostraron títulos significativos de reconocimiento contra sueros de animales infectados naturalmente (Fig. 11, A y B), y que al ser amplificadas por Villamancera A. *et al.* 2008, para inmunizar borregos, que desafiaron con 300 metacercarias, obtuvieron una disminución significativa en la carga de fasciolas, en el número de huevos, y una importante reducción en el tamaño del parásito.

7. Conclusiones

- Se generó antígenos somáticos y de productos de secreción-excreción de *F. hepatica* de bovinos.
- Se generaron y caracterizaron sueros de conejo inmunizado con antígeno somático, uno que no reacciona a productos de secreción-excreción y el otro que presenta inmunoreactividad contra antígenos somáticos y productos de secreción-excreción.
- Se purificaron IgG del conejo 1 por cromatografía de afinidad con antígeno somático y con una fracción de productos de secreción excreción.
- Se conformó un banco de sueros de borregos positivos y negativos a *F. hepatica*.
- Se aislaron 9 clonas de la biblioteca combinatoria con anticuerpos contra una fracción de productos secretados y excretados.
- Se caracterizó la reactividad antigénica de las clonas seleccionadas y se determinó la secuencia nucleotídica de los péptidos aleatorios de 8 clonas.

8. Perspectivas

Los anticuerpos generados en conejos contra antígeno somático, emplearlos en caracterizar la antigenicidad de *F. hepatica*, con el sistema phage display.

Con los anticuerpos seleccionados con las columnas acopladas con antígeno somático y productos SE, hacer ensayos de biopanning y evaluar las clonas seleccionadas en ensayos de diagnóstico y protección.

Los péptidos identificados en los ELISA directo e indirecto en este trabajo y como protectores por Villa-Mancera A. *et al.* 2008, fusionarlos y caracterizar la respuesta inmune en animales infectados con *F. hepatica*. Propuesta de la Dra. Dolores Correa.

9. Anexos

9.1. Anexo I

Método de sedimentación de heces

1. Macerar heces
2. Tomar una cucharada (cuchara sopera) y colocarla en un vaso de plástico
3. Agregar 50 ml de agua y homogeneizar con la cuchara hasta casi disolver la muestra.
4. Depositar la mezcla en un vaso de precipitados de 200 ml, haciendo pasar la muestra por una coladera que tenga el poro pequeño
5. Dejar sedimentar 5 min.
6. Decantar el sobrenadante de manera lenta y continua para que el sedimento no se resuspenda.
7. Agregar nuevamente agua hasta 200 ml.
8. Repetir del paso 5 al 7 tres veces.
9. Ya no agregar agua y dejar los sedimentos resuspendidos en 50 ml. Del mismo sobrenadante.
10. Pasar este contenido a una caja petri y agregar tres gotas de azul de metileno en solución, observar al microscopio estereoscópico.
11. Los huevos tienen una forma ovalada y un color amarillo brillante.

Albúmina sérica bovina para hacer curva patrón (BSA):

1mg/ml en agua, diluir 1:10 y congela alícuotas. En este caso, queda a una concentración de 100 µg/ml, que diluida 1:20, o sea 10 µl de BSA + 150 µl de agua + 40 µL de reactivo de Bradford, es igual a 5 µg/ml, 1:10, o sea 20 µl + 140 µl de agua + 40 µL de reactivo de Bradford, es igual a 10 µg/ml, 1:6.6, o sea 30 µl + 130 µl de agua + 40 µL de reactivo de Bradford, es igual a 15 µg/ml, 1: 5, o sea 40 µl + 120 µl de agua + 40 µL de reactivo de Bradford, es igual a 20 µg/ml,

1: 4, o sea 50 μl + 110 μl de agua + 40 μL de reactivo de Bradford, es igual a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford biorad en microplaca:

Para un volumen de 200 μl , se siguen las siguientes diluciones:

- blanco: 160 μl agua + 0 μl de alícuota de BSA + 40 μl de Bradford
- 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 150 μl agua + 10 μl de alícuota de BSA + 40 μl de Bradford
- 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 140 μl agua + 20 μl de alícuota de BSA + 40 μl de Bradford
- 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 130 μl agua + 30 μl de alícuota de BSA + 40 μl de Bradford
- 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 120 μl agua + 40 μl de alícuota de BSA + 40 μl de Bradford
- 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 110 μl agua + 50 μl de alícuota de BSA + 40 μl de Bradford.

Muestra de concentración desconocida (MCD), esta muestra, considerada muestra problema, se hacen diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 y se procede de a hacer las diluciones de la siguiente manera:

- blanco: 160 μl agua + 0 μl de MCD + 40 μl de Bradford
- 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 150 μl agua + 10 μl de MCD + 40 μl de Bradford
- 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 140 μl agua + 20 μl de MCD + 40 μl de Bradford
- 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 130 μl agua + 30 μl de MCD + 40 μl de Bradford
- 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 120 μl agua + 40 μl de MCD + 40 μl de Bradford
- 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 110 μl agua + 50 μl de MCD + 40 μl de Bradford.

Se incuba al menos 10 minutos para que se sature la reacción, se lee a 595 nm. Nota: después de una hora se pierde el viraje de color. Se grafican los datos de la curva patrón y se toma la lectura que caiga dentro de la curva, aunque se puede "extrapolar" cuando se sale, lo mejor para tener precisión es "interpolar". Para ahorrar puntas se pueden usar las mismas siempre que sea en concentraciones de menor a mayor. El cálculo final se hace sacando la pendiente

y aplicando la ecuación de la recta, la concentración de MCD se multiplica por el factor de dilución y el resultado está en $\mu\text{g/ml}$.

Buffer de lisis RIPA: PBS, NP40 1%, Sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%,

Sample Buffer (para 100 ml):

1x: trizma base 0.75g, glicerol 10ml, SDS 2g, β -mercaptoetanol 2ml, azul de bromofenol 0.05g, pH 6.8.

2x: trizma base 1.52g, glicerol 20ml, SDS 4g, β -mercaptoetanol 5ml, azul de bromofenol 0.1 g, pH 6.8.

4x: trizma base 3g, glicerol 40 ml, SDS 8g, β -mercaptoetanol 10ml, azul de bromofenol 0.2g, pH 6.8.

Acrilamida-Bis-acrilamida: 29.2g, bis-acrilamida 0.8g, aforar con H_2O 100ml.

Amortiguador pH 8.8 (gel separador): Trizma base 1.5M, SDS 0.4%, pH 8.8.

Amortiguador pH 6.8 (gel concentrador): Trizma base 0.5M, SDS 0.4% pH 6.8%.

Amortiguador para guardar el gel separador: se diluye el amortiguador pH 8.8 1:4.

Amortiguador de corrida (para 1 litro): glicina 14.48g, trizma base 3g, SDS 1g, no ajustar el pH.

Colorante azul de Coomassie: H_2O 40%, metanol 50%, ácido acético 10% y azul de Coomassie 0.05%.

Desteñidor: etanol 5%, ácido acético 7% y H_2O 88%.

Nota: todas las soluciones deben ser filtradas.

Para dos geles:

	Gel inferior al 7.5%	Gel inferior al 10%	Gel inferior al 12%	Gel superior al 4%
H2O destilada	4.85 ml	4 ml	3.35 ml	6.1 ml
Acrilamida- bis	2.5 ml	3.33 ml	4 ml	1.33 ml
Amortiguador pH 8.8	2.6 ml	2.6 ml	2.6 ml	Amortiguador pH 6.8: 2.6 ml
Persulfato de amonio 10%	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	30 µl	10 µl

Para un gel:

	Gel inferior al 7.5%	Gel inferior al 10%	Gel inferior al 12%	Gel superior al 4%
H2O destilada	1.616 ml	1.33 ml	1.116 ml	2.03 ml
Acrilamida- bis	0.833 ml	1.11 ml	1.33 ml	0.443 ml
Amortiguador pH 8.8	0.866 ml	0.866 ml	0.866 ml	Amortiguador pH 6.8: 0.866 ml
Persulfato de amonio 10%	16.6 µl	16.6 µl	16.6 µl	16.6 µl
TEMED	3.33 µl	3.33 µl	3.33 µl	3.33 µl

Amortiguador de transferencia: fresco para cada experimento. Para 1 litro.-
trisma base 3g, glicina 14.48g, metanol 200 ml, aforar para 1 litro con H2O, no
ajustar pH.

Papel filtro

Membrana de PVDF biorad

Cámara de Electroforesis

Cámara de electrotransferencia semiseca biorad

Fuente de poder

TBS: Tris-base 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8. (1.21g Trisma base, 8.76g NaCl, ajustar pH a 8 y aforar a un litro con H₂O)

Sol. TBS-Tween 20 al 0.05%

Blotto B: TBS-Tween 20 al 0.05%, leche 1%, BSA 1%.

El conjugado correspondiente: anti-conejo, anti-sheep o anti-vaca, unido a peroxidasa alcalina, 1:2000 en Blotto B.

Sustrato soluble para peroxidasa DAB Sigma (diaminobenzidina) en PBS + H₂O₂: preparar al momento, en 20 ml de H₂O, agregar 10 mg de DAB + 12 µl H₂O₂.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

- a) Se ensambla la unidad para preparar los geles. Los vidrios deben haber sido lavados con detergente, secados y limpiados con etanol.
- b) Se prepara el gel separador en un matraz de 25 o 50 ml.
- c) Se agita constantemente durante 10 minutos. Se agrega el Persulfato de Amonio y el TEMED.

- d) Se vacía la solución en la unidad para preparar los geles hasta una altura de dos veces el peine, se hace con cuidado de no producir burbujas.
- e) Se agrega lenta y cuidadosamente H₂O destilada con una pipeta Pasteur y se deja polimerizar. Cuando el gel ha polimerizado, a contra luz se ve la interface agua-gel.
- f) Se escurre el agua y se enjuaga 2 veces la superficie con agua destilada, se escurre y se absorbe el líquido restante con papel filtro por una esquina y con cuidado de no tocar el gel.
- g) Se prepara el gel concentrador a 4% y se agita constantemente, se agrega el persulfato de amonio y el TEMED.
- h) Se coloca el peine en la cámara y se vacía el gel superior por una orilla con la ayuda de una pipeta Pasteur, con cuidado de no dejar burbujas.
- i) El gel superior se deja polimerizando durante 30 minutos aproximadamente.
- j) Se retira el peine lentamente de manera vertical.
- k) Se quita el exceso de líquido de los carriles con un papel filtro.
- l) Se prepara la muestra agregándole Sample buffer (volumen final 25 µl para minigel).
- m) Se hierve la solución anterior durante 5 minutos en baño María (es conveniente hacer un agujero en la tapa del tubo para que al hervir no se destape con la presión). O puede utilizarse el termociclador.
- n) Se monta la cámara y la parte entre los geles e inferior se llenan de amortiguador de corrida.
- o) Se carga la muestra con una micropipeta. Los pozos que no llevan muestra deben llenarse con sample buffer.
- p) Se quitan las burbujas de la parte inferior del pozo con una inyectando aire con la micropipeta o sacándola con una jeringa para insulina.
- q) Se conecta la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se corre a 200 volts (voltaje constante), cuando es minigel.

- r) Cuando el colorante del frente de corrida está unos mm. antes del fin del gel (aproximadamente 45 minutos para minigel), se apaga la fuente de poder y se saca el gel.
- s) Se hace por duplicado y un gel puede utilizarse para hacer una electrotransferencia y el otro para teñirse con azul de Coomassie.

Electrotransferencia:

- a) Inmediatamente concluida la corrida del PAGE, se desmonta el gel y se le corta el gel superior, el cual se desecha.
- b) El gel inferior se pone a equilibrar en amortiguador de transferencia durante 10 minutos.
- c) Se mide el gel y se corta un pedazo de hoja de PVDF del mismo tamaño. Se mete el papel en amortiguador de transferencia, este debe entrar en el agua con ángulo de 45°, de manera que quede flotando en la superficie y que la cara superior no tenga contacto con el líquido. Una vez que todo el papel se ha hidratado se sumerge todo, comenzando por una esquina.
- d) Se cortan 2 rectángulos de papel filtro del tamaño de las fibras. Se mojan con amortiguador de corrida los rectángulos de papel filtro al igual que las fibras.
- e) Se ensambla la cámara de transferencia:

Nota: es importante que no queden burbujas sobre todo entre el gel y el papel de nitrocelulosa.

- f) Se conectan los electrodos a la fuente de poder y se deja a 130 volts durante 45 minutos.
- g) Se desconecta la cámara y se saca el papel para revelarlo. El gel se pone a teñir con azul de Coomassie.

Nota: Es importante no tocar en ningún momento el papel de nitrocelulosa con las manos por lo que es conveniente usar siempre guantes.

Revelado del blot:

- a) Después de la electrotransferencia, se saca el papel de nitrocelulosa de la cámara y se deja bloqueando con 25 ml de Blotto B (sin Tween 20), toda la noche a 4°C.
- b) Lavar 2 veces por 7 minutos con 20 ml de TBS-Tween 0.05%, cada lavada en agitación constante.
- c) Revelado con anticuerpos específicos. Se incuba por 1.5 h a 37°C con el anticuerpo correspondiente (sueros, IgG vs catepsina, IgG de conejo inmunizado con Ag somático) en Blotto B. La cantidad de los anticuerpos a usar es de 1 a 30 µg.
- d) Se lava 2 veces por 7 minutos con 20 ml de TBS-Tween 0.05% en agitación constante.
- e) Se incuba con 20 ml del conjugado (anti cow, anti sheep, anti rabbit) diluído 1:2000 en Blotto B durante 1 hora a temperatura ambiente, en la oscuridad y con agitación constante.
- f) Se lava 3 veces por 7 minutos con 20 ml de TBS-Tween 0.05% y una vez con 15 ml de TBS, 5 minutos cada lavada en agitación constante.
- g) Revelar la membrana, se lava la membrana 3 veces con TBS.
- h) Se incuba con el sustrato insoluble para peroxidasa a temperatura ambiente y con agitación constante, hasta que se observe la aparición de bandas.
- i) Se lava con varios cambios de agua y se seca el papel poniéndolo entre dos papeles filtro.

Procedimiento para la inmunización de conejo con antígeno de *Fasciola hepatica*

Material:

- a) Conejo hembra New Zealand de 2.0 Kg de peso o más
- b) Adyuvante de Freund's completo
- c) Adyuvante de Freund's incompleto
- d) Jeringas de 1 ml (para insulina)
- e) Tubos pequeños para la colecta de muestra
- f) Tubos de 50 ml
- g) Jeringas de 50 ml
- h) Jeringas de 3 ml
- i) Torundas con alcohol

La inmunización se hace cada 15 días y se administran 0.8 mg de antígeno a cada conejo hembra.

La obtención del suero se hace centrifugando a 3000 rpm, durante 10 minutos.

La emulsión del Ag y Adyuvantes se prepara mezclando enérgicamente (vertiendo y tomando), con una jeringa de 3 ml, sin aguja, en un recipiente pequeño (del volumen apropiado) hasta que se forme una mezcla de color blanco lechoso, una vez que se tiene la mezcla se le coloca la aguja a la jeringa y se administra la dosis como se indique.

Día 1

- a) Hacer una toma de muestra de sangre del animal de una de las orejas, (obtención de suero preinmunizado (control negativo)), después, se administra la primera dosis de Ag (0.8 mg de Ag y se mezcla con un volumen de Adyuvante de Freund's completo), esta inyección es subcutánea y de manera tal que haya irrigación en forma de abanico en un costado del conejo.

Día 15 y 30

- b) Hacer una toma de sangre de cada animal y obtener el suero, administrar 0.8 mg de Ag y mezclar con un volumen de Adyuvante de Freund's incompleto. Esta inyección es subcutánea.

Día 45 y 60

- c) Administrar 0.8 mg de antígeno sin adyuvante, la inyección tiene que ser intramuscular.

Nota: el día 60 se puede duplicar la dosis de antígeno y sin adyuvante.

Día 55y 63

- d) Evaluar por ELISA el título de anticuerpos, y si es mayor i igual a 102,400, sacrificar a los animales y obtener la mayor cantidad de sangre por el método que se prefiera. Después de obtener la sangre se refrigera una noche y al otro día se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos, y finalmente se guardan los sueros en congelación.

9.2. Anexo II. Análisis de insertos clonados en las bibliotecas de expresión construidas en p3.2 a partir de ADNc de *Fasciola hepatica* y DNA genómico de *Anaplasma marginale*

El presente trabajo se realizó debido a que se secuenciaron 20 clonas que contenían insertos seleccionados con anticuerpos contra *Fasciola hepatica* a partir de una tercera ronda de Biopanning. Al comparar las secuencias obtenidas con el banco de genes del NCBI por medio del software BLAST, se encontró que correspondían a secuencias del genoma de *Anaplasma marginale*. Los resultados se encuentran resumidos en el siguiente recuadro.

Clona	% de Identidad	comparación	Bases alineadas
B1	94	Anaplasma marginale	281
B2	100	Anaplasma marginale	52
B3	97	Anaplasma marginale	325
B4	94	Anaplasma marginale	131
B5	98	Anaplasma marginale	269
B6	96	Anaplasma marginale	213
B7	96	Anaplasma marginale	278
B8	98	Anaplasma marginale	313
B9	98	Anaplasma marginale	252
B10	100	Anaplasma marginale	181
C1	98	Anaplasma marginale	207
C2	99	Anaplasma marginale	217
C3	96	Anaplasma marginale	229
C4	100	Anaplasma marginale	88
C5	96	Anaplasma marginale	93
C6	97	Anaplasma marginale	280
C7	98	Anaplasma marginale	288
C8	99	Anaplasma marginale	263
C9	98	Anaplasma marginale	271
C10	96	Anaplasma marginale	230

Por lo anterior se sospecho que los viales de las bibliotecas estaban mal etiquetados o que se pudiera haber tenido alguna confusión al manejarlas.

Objetivo

Identificar a que biblioteca corresponden los viales rotulados como *Fasciola hepatica* 1, 2 y 3.

Metodología

En el laboratorio de Genética Molecular se efectuó un inventario de las bibliotecas en forma de ADN en el vector p3.2 encontrándose 3 viales correspondientes a *Fasciola hepatica* y un vial de la genoteca de *Anaplasma marginale*. De cada vial se hizo una transformación en células TG1 y se plaquearon 50 µl en placas de LB con ampicilina, de las colonias crecidas se seleccionaron 20 clonas provenientes de cada tubo, se les extrajo ADN y se hizo una PCR empleando los iniciadores que flanquean la región del sitio múltiple de clonación del p3.2. Se seleccionaron cuatro clonas por tubo para hacer la confirmación de fragmentos insertados por secuenciación de nucleótidos, utilizando el iniciador "forward". En total 16 clonas fueron secuenciadas.

Resultados

En el cuadro 2 se muestran los resultados de la búsqueda por BLAST de las secuencias obtenidas en cada clona.

Conclusión

Los viales rotulados como "Biblioteca de *Fasciola hepatica*", corresponden a la genoteca de *Anaplasma marginale*.

Perspectivas

Para avanzar en la solución del problema, se procederá a trabajar con una biblioteca que expresa 12 aminoácidos al azar.

Tubo marcado como	Clona	% de identidad	Identidad con	Bases alineadas
Anaplasma	T15	89	Proteína principal de superficie como la proteína 22 de <i>Anaplasma marginale</i>	77
Anaplasma	T14	95	quelatasa de <i>Anaplasma marginale</i>	241
Anaplasma	T13	100	proteína hipotética de <i>Methanosarcina barkeri</i>	22
Anaplasma	T11	98	hypothetical protein <i>Anaplasma marginale</i>	179
Tubo 3	C36	97	transketolase de <i>Anaplasma marginale</i>	168
Tubo 3	C27	94	Proteína hipotética de <i>Anaplasma marginale</i>	106
Tubo 3	C23	93	AND satélite de una estructura primaria de bovino	172
Tubo 3	C21	100	<i>Homo sapiens</i> , cromosoma 16	22
Tubo 2	B32	86	Gen de resistencia de phage M13 helper	79
Tubo 2	B26	100	clone VMRC6-24O12 de <i>Monodelphis domestica</i>	20
Tubo 2	B21	94	proteína rec A de <i>Anaplasma marginale</i>	152
Tubo 2	B15	96	guanilato cinasa de <i>Anaplasma marginale</i>	171
Tubo 1	A25	95	<i>Homo sapiens</i> , cromosoma 5	23
Tubo 1	A17	96	Subunidad larga de la carbamil-fosfato sintasa , de <i>Anaplasma marginale</i>	169
Tubo 1	A15	100	Proteína hipotética de <i>Ustilago maydis</i>	20
Tubo 1	A35	93	60 kD proteína de membrana interior de <i>Anaplasma marginale</i>	29

Cuadro 2. resultados de la búsqueda por BLAST de las secuencias obtenidas en cada clona.

9.3. Anexo III

México D.F. a 27 de Octubre del 2008

Coordinación de enseñanza de la Facultad de Ciencias
UNAM
PRESENTE

Reporte de acontecimientos de Noviembre 2004 a Octubre 2008, del pasante de la carrera de Biología Alfonso Reyes Lugo, con número de cuenta 095080727 de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

El alumno Abel Villa Mancera se incorporo a mediados de Febrero o Marzo del 2006 como observador y aprendiz de las técnicas empleadas, trabajando bajo mi supervisión directa ya que el Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales (mi director de tesis) me pidió que le enseñara todo lo que había yo aprendido de la tecnología Phage Display. Derivado esto de un compromiso de colaboración con el Dr. Héctor Quiroz Romero (Tutor de Doctorado de Abel Villa Mancera) y la Dra. María Dolores Correa Beltrán (parte del jurado), que son colaboradores en el proyecto: PAPIIT-IN208703-03 DGAPA-UNAM, titulado:

“Aplicación de técnicas de biología molecular e inmunología en el diagnóstico y profilaxis de la fasciolosis”

A partir de esta colaboración académica se hizo un acuerdo verbal con el Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales y el candidato a Dr. Abel Villa Mancera que consistía en que el pasante Alfonso Reyes Lugo (yo), sería coautor de los eventuales y futuros artículos (nacionales e internacionales) publicados que surgiesen con estos interesantes datos, resultados que se generaron de dicha colaboración.

En Marzo y Abril de este año en repetidas ocasiones se tuvo contacto con el alumno Abel Villa Mancera reiterándole la coautoría en el artículo citado en la página 6, debido a mi dinámica participación constructiva, a lo cual verbalmente afirmaba él, estar totalmente de acuerdo. Sin embargo, en la publicación citada, solo se agradece mi asistencia técnica.

Cabe mencionar que de este acuerdo el Dr. Rogelio Alonso estaba enterado y que en repetidas ocasiones en presencia mía, se dejó muy clara mi participación y coautoría en el proyecto y publicaciones derivadas.

Los hechos son:

En el mes de Noviembre del año 2004, ingrese a desempeñarme académicamente como alumno de tesis de licenciatura al Laboratorio de Genética Molecular en el Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, bajo la tutoría del Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, "Profesor Titular B de Tiempo Completo", a desarrollar el proyecto de tesis:

Desarrollo de un sistema de diagnóstico (ELISA) de fasciolosis a partir de una biblioteca de expresión génica en bacteriófagos filamentosos

Con el objetivo de que a partir de una biblioteca de expresión génica en bacteriófagos filamentosos se seleccionaran clonas que expresaran epitopos para emplearse en ensayos de ELISA en el diagnóstico de fasciolosis.

Este objetivo comprendía los siguientes Objetivos Particulares:

1. Caracterizar inmunológicamente sueros de animales infectados con fasciola hepática.
2. Seleccionar y caracterizar clonas inmunodominantes de la biblioteca de expresión por medio de sueros animales infectados.
3. Las clonas de inmunodominantes seleccionadas se evalúan en el diagnóstico serológico con ensayos de ELISA de fasciolosis.

De los cuales se desprendían las siguientes metas:

1. Determinar el título de los sueros de animales infectados por ensayos de ELISA.
2. Evaluar la especificidad de reconocimiento de los sueros por ensayos de Western Blott. Preparación de antígeno somático y de secreción de fasciola hepática.

3. Por medio de inmovilización con anticuerpos (panning) seleccionar por las clonas inmunodominantes para después identificarlas por secuenciación. Las clonas se purificarán en tres ciclos de selección.
4. Con las clonas inmunodominantes seleccionadas se evaluará su antigenicidad en un sistema de diagnóstico ELISA, empleando un panel de sueros positivos y negativos a fasciolosis de bovinos. Se determinarán los niveles de sensibilidad y especificidad.

A partir del trabajo experimental que desarrolle en dicho laboratorio, el 17 de Abril del 2006 se entregó al Dr. Rogelio Alonso Morales el reporte titulado:

Análisis de insertos clonados en las bibliotecas de expresión construidas en p3.2 a partir de ADNc de *Fasciola hepatica* y DNA genómico de *Anaplasma marginale* (el cual se presenta en el anexo II, página 48)

Dicho reporte se guardo en una computadora del laboratorio, en un disco duro de mi pertenencia, y en mi cuenta de correo hotmail, se entrego una copia al candidato a Dr. Abel Villa del posgrado de la FMVZ el día 27 de Junio del 2006, en días posteriores en un seminario, se le dio copia al Dr. Héctor Quiroz (profesor emérito de la FMVZ) y se le informo a la Dra. Dolores Correa (jefa del laboratorio de Inmunoparasitología del Instituto Nacional de Pediatría) en el reporte se genero la siguiente conclusión:

Los viales rotulados como "Biblioteca de *Fasciola hepatica*", corresponden a la genoteca de *Anaplasma marginale*.

Por lo cual se redirecciono el proyecto de tesis con la siguiente perspectiva:

Para avanzar en la solución del problema, se procederá a trabajar con una biblioteca que expresa 12 aminoácidos al azar.

De esto se genero un nuevo proyecto de tesis, titulado:

Selección de clonas de una biblioteca combinatoria de despliegue de bacteriófagos "Phage Display" con anticuerpos contra una fracción de productos secretados y excretados por *Fasciola hepatica*

De este nuevo proyecto se concluyo la fase experimental en Noviembre del 2006. Cabe mencionar que todos los datos generados dentro del laboratorio,

están reportados en una bitácora que está bajo resguardo del Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales, de la cual tengo una copia.

Este proyecto fue aprobado en la Facultad de Ciencias el 10 de Agosto del 2007.

Hago énfasis en que en este nuevo proyecto se generó:

La hipótesis

El uso de una biblioteca combinatoria con secuencias de péptidos al azar permitirá caracterizar epítomos de productos secretados excretados por *Fasciola hepatica* mediante la selección por afinidad de péptidos miméticos con IgG obtenidas de un conejo inmunizado con estos productos.

Los objetivos

El objetivo general de este trabajo es seleccionar clonas que expresen mimótopos reconocidos por anticuerpos generados en conejos inmunizados con una fracción de productos secretados y excretados por *F. hepatica* a partir de una biblioteca combinatoria de despliegue de bacteriófagos.

Los objetivos particulares:

6. Obtención y evaluación de antígeno somático y productos de secreción excreción de *F. hepatica*.
7. Obtención de anticuerpos en conejo dirigidos contra antígeno somático y productos de secreción excreción para ser usados en el tamizada de la biblioteca combinatoria.
8. Caracterizar anticuerpos dirigidos contra antígeno somático y una fracción de productos secretados y excretados por *F. hepatica*.
9. Seleccionar y caracterizar clonas inmunodominantes a partir de una biblioteca combinatoria Ph.D.-12TM empleando anticuerpos contra una fracción de productos de secreción excreción.
10. Caracterizar inmunológicamente sueros de borregos infectados con *Fasciola hepatica* y sueros de borregos negativos a *F. hepatica*.

Y las metas:

- A. Aislar parásitos adultos de *F. hepatica* de hígados de bovinos.

- B. Obtener antígeno somático y productos de secreción excreción de los parásitos.
- C. Inmunizar conejos con antígeno somático.
- D. Evaluar las IgG contra Ag somático y productos de secreción de los parásitos por ELISA y Western Blot.
- E. Por medio de inmovilización con anticuerpos (biopanning) seleccionar clonas inmunodominantes de una biblioteca combinatoria de Phage Display.
- F. Obtener las secuencias de ADN de las clonas seleccionadas de la biblioteca.
- G. Evaluar la especificidad de reconocimiento de los sueros de borregos positivos y negativos a *F. hepatica* por ensayo de ELISA.
- H. Evaluar la antigenicidad de las clonas inmunodominantes seleccionadas por ELISA.

De este proyecto tenía conocimiento el candidato a Dr. Abel Villa Mancera ya que el nos proporciono los anticuerpos contra una fracción de productos secretados y excretados por *F. hepatica*, con los cuales Tatiana Gazarian, por petición de su esposo (Dr. Karlen Gazarian) hizo el biopanning y nos permitió observar el desarrollo de la técnica, al candidato a Dr. Abel Villa Mancera y a mí por petición del Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales y de esto, se obtuvieron los resultados concluyentes generados por mi y documentados en las páginas 133 y 135 de la bitácora a mi cargo, que se reportan en la figura 10 de esta tesis (página 41, este resultado se reprodujo en el artículo como figura 2, anexo IV, página 71), los resultados de la figura 3C del artículo, son secuencias que realice en la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana, los resultados de las secuencia correspondientes a los péptidos de los bacteriófagos seleccionados, están en el disco duro de la computadora conectada al secuenciador, estos resultados se reportan en la tabla 3 (página 43) de la tesis aquí presentada. Los resultados reproducidos aparecen en la página 5 del artículo (anexo IV, página 71):

**Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of
cathepsin L selected from a phage display library**

Con la siguiente referencia: Villa-Mancera A., Quiroz-Romero H., Correa D., Ibarra F., Reyes-Pérez, Reyes-Vivas, López-Velázquez, Gazarian K., Gazarian T. and Alonso R. A., 2008. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. Parasitology. En imprenta. (Se anexa copia de la publicación en internet, ver anexo IV, página 67).

Hago de su conocimiento estos hechos, debido a que los datos concluyentes con los que pretendo titularme ya fueron utilizados sin darme el correcto reconocimiento.

Agradezco su amable atención y espero no se vea impedida o perjudicada mi titulación en el futuro.

A T E N T A M E N T E

Pas. Biól. Alfonso Reyes Lugo

Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library

A. VILLA-MANCERA¹, H. QUIROZ-ROMERO^{1*}, D. CORREA², F. IBARRA¹,
M. REYES-PÉREZ¹, H. REYES-VIVAS³, G. LÓPEZ-VELÁZQUEZ³, K. GAZARIAN⁴,
T. GAZARIAN⁴ and R. A. ALONSO⁵

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F. 04510

² Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F. 04530

³ Laboratorio de Bioquímica Genética, Instituto Nacional de Pediatría, México, D.F. 04530

⁴ Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F. 04510

⁵ Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F. 04510

(Received 25 February 2008; revised 11 April 2008; accepted 8 May 2008)

SUMMARY

An M13 phage random 12-mers peptide library was used to screen cathepsin L mimotopes of *Fasciola hepatica* and to evaluate their immunogenicity in sheep. Seven clones showed positive reactivity to a rabbit anti-cathepsin L1/L2 antiserum in ELISA, and their amino acid sequences deduced by DNA sequencing were tentatively mapped on the protein. Twenty sheep were randomly allocated into 4 groups of 5 animals each, for immunization with 1×10^8 phage particles of clones 1, 20, a mixture of 7 clones and PBS, without adjuvant at the beginning, and 4 weeks later. All groups were challenged with 300 metacercariae at week 6 and slaughtered 16 weeks later. The mean worm burdens after challenge were reduced by 47.61% and 33.91% in sheep vaccinated with clones 1 and 20, respectively; no effect was observed in animals inoculated with the clone mixture. Also, a significant reduction in worm size and burden was observed for those sheep immunized with clone 1. Animals receiving clone 20, showed a significant reduction in egg output. Immunization induced a reduction of egg viability ranging from 58.92 to 82.11%. Furthermore, vaccinated animals produced clone-specific antibodies which were boosted after challenge with metacercariae of *F. hepatica*.

Key words: *Fasciola hepatica*, cathepsin L, phage display, mimotopes, vaccine.

INTRODUCTION

Fasciolosis or liver fluke disease is caused by *Fasciola hepatica* in a wide range of mammals. The human infection is estimated in 2-4 million people and it seems to be increasing (Mas-Coma *et al.* 1999; Mas-Coma, 2005). Fasciolosis also causes important economic losses in the livestock industry (Torgerson and Claxton, 1999). Triclabendazole is the only effective drug against early stages of the parasite; however, resistance to it has been extensively reported (Overend and Bowen, 1995; Mitchell *et al.* 1998; Moll *et al.* 2000; Gaasenbeek *et al.* 2001). Other control measures such as vaccination should be developed for sustainable control of this disease. There are numerous studies on the use of purified native or recombinant molecules as candidate vaccines (Hillyer, 2005; McManus and Dalton, 2006). These include cathepsins L, a family of proteases

involved in activities such as immune evasion (Carmona *et al.* 1993; Smith *et al.* 1993), invasion of tissues (Dalton and Heffernan, 1989; Berasain *et al.* 1997), nutrition (Yamasaki *et al.* 1989; Smith *et al.* 1993) and egg output (Wijffels *et al.* 1994; Dalton *et al.* 1996). These activities may interfere with their protective effect; thus, it would be desirable to isolate the immunizing motifs for vaccination purposes. Moreover, while native cathepsins L could be purified in sufficient quantities for experimental trials, large-scale production requires a cheaper system, i.e. competitive with current drug treatments (Dalton *et al.* 2003).

Phage display is a powerful tool to select peptides or proteins with high affinity and specificity to almost any molecular target of interest. Its utility is based on collections of bacteriophage particles displaying random peptide sequences on their surfaces, as a fusion product with one of the phage coat proteins (Smith and Pretenko, 1997). Libraries of random peptides have been successfully used to identify peptides that mimic vaccine epitopes in the case of *Plasmodium vivax* or *Plasmodium yoelii* malaria, and *Schistosoma japonicum* schistosomiasis (Demangel

* Corresponding author: Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F. 04510. Tel: +52 56225898. Fax: +52 56225898. E-mail: hquiroz@servidor.unam.mx

et al. 1996; Tang et al. 2004; Wang et al. 2005, Narum et al. 2006; Wu et al. 2006). The mimotope vaccine strategy has not been reported for *Fasciola hepatica* cathepsins L in sheep; thus, this was the objective of the present study.

MATERIALS AND METHODS

Excretion/secretion products (E/S)

Mature flukes were removed from the bile ducts of infected cattle livers from the local abattoir of the City of Toluca, washed 6 times in sterile 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, and incubated for 16 h at 37 °C in RPMI-1640, pH 7.3, with penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The medium was removed and centrifuged at 14 000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was collected and concentrated using Amicon Ultra-15 centrifugal filter tubes with a 10 000 molecular weight cut-off membrane (Millipore, USA). After determination of the protein concentration as described by Bradford (1976) using the Bio-Rad commercial kit, the supernatant was aliquoted and stored at -20 °C until use.

Purification of cathepsin L proteinases

Fasciola hepatica cathepsins L1/L2 were purified from the E/S products by HPLC ion-exchange chromatography on a Q-Sepharose column (Amersham Biosciences, USA), equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8, followed by gel-filtration chromatography on a Superdex 75 column (Amersham Biosciences, USA), equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 7.

Mass spectrometric analysis

The purified proteinases were separated by 12% reducing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with 0.1% Coomassie brilliant blue; the observed double band was cut and digested in gel with trypsin (Promega, USA), using the technique described previously (Shevchenko et al. 1996). Samples containing peptides resulting from proteolytic cleavage were analysed by matrix-associated laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in a Voyager-DE PRO MALDI-TOF system (Applied Biosystems, USA).

Preparation of polyclonal antibodies against cathepsin L, and Western blot analysis

One New Zealand rabbit was subcutaneously immunized with 75 µg of the purified enzymes; the initial injection was prepared in Freund's Complete Adjuvant and the 4 subsequent injections, given at 2-week intervals, were in Freund's Incomplete

Adjuvant (Sigma, USA). The immunoglobulin G (IgG) fraction of the serum was purified by affinity chromatography with protein A-Sepharose (Amersham Biosciences). For Western blotting, the purified fraction was separated by 12% reducing SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF, Millipore) membrane and probed with the polyclonal specific anti-cathepsin L antibody. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, USA) was used as a secondary antibody at a dilution 1:2500. The blots were visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma, USA).

Panning with the polyclonal anti-cathepsin L antibody

The Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library (New England Biolabs, USA) is composed of a combinatorial library of random peptide 12-mers fused to a minor coat protein (pIII) of the M13 phage and with a complexity of 2.7×10^9 electroporated sequences. The phage library was subjected to affinity selection as described by the Ph.D.-12 kit. Briefly, the wells of a 96-well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate (Nunc-Immuno, MaxiSorp) were coated with 150 µg/ml of purified antibodies against cathepsins L1/L2 in 100 µl of 0.01 M phosphate-buffered 0.15 M saline (PBS, pH 7.3) overnight at 4 °C in a humidified container. The wells were blocked for 1 h at 4 °C with 300 µl of blocking solution (1% bovine serum albumin in PBS). The library phages (1.0×10^{11} particles in 100 µl of PBS-T, 0.1% Tween 20) were added to the wells and left for 1 h at room temperature with gentle stirring, followed by 10 washes with PBS-Tween 20. Bound phages were eluted with 100 µl of 0.2 M Glycine-HCl, pH 2.2, for 10 min at room temperature and neutralized by adding 15 µl of 1 M Tris-HCl, pH 9.0.

The titre of the eluted phage was calculated by infecting a log-phase culture of ER 2738 *E. coli* (New England Biolabs, USA); the colonies were counted and expressed as plaque-forming units per millilitre (pfu/ml). Subsequently, the phage eluates were amplified and concentrated using polyethylene glycol precipitation by the standard procedure. The second and third panning round were similar to the first one, except that the purified antibodies against cathepsins L1/L2 were used at 75 µg/ml and 37.5 µg/ml, respectively.

Phage ELISA and DNA sequencing

ELISA plates were coated with 10 µg/ml of purified anti-cathepsins L1/L2 antibodies in 100 µl of PBS, and incubated overnight at 4 °C. The wells were washed 5 times with PBS-T, and blocked for 1 h at 37 °C with blocking solution. Specific phage clones (1×10^{10} pfu) in PBS containing 0.2% BSA-0.2% Tween 20, were incubated for 2 h at room

temperature with gentle shaking. After 5 washes with PBS-T, the bound phage particles were detected utilizing an anti-M13-HRP antibody (Amersham Biosciences, USA) at a dilution of 1:3000 in blocking solution for 1 h at room temperature. The reaction was developed with 2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Sigma, USA) in citrate buffer. The absorbance values were measured with a Beckman Coulter DTX 880 ELISA reader.

The selected clones were amplified and the purified single-strand phage DNA fragments sequences were determined with the 96gIII sequencing primer 5'-HOCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' (New England Biolabs, USA) on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Alignments of the selected clones with the published sequences of cathepsins L1/L2 were performed using the software Clone Manager Professional Suite (Sci Ed Central) software. The aligned amino acid sequences of cathepsin L mimotopes and the consensus sequences were performed using a web-based tool called MIMOX (Huang *et al.* 2006).

Phage Western blot

The phage (1.0×10^{12} particles) from each selected clone were separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to PVDF membrane. The membrane was blocked in 5% skimmed milk for 2 h at room temperature and the polyclonal rabbit anti-cathepsin L serum was added and incubated for 1.5 h. The membrane was washed thrice in PBS-T. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma, USA) was used as secondary antibody at a dilution 1:2500, incubated for 1 h; afterwards, the washings were repeated. The blots were visualized with DAB as indicated above.

Vaccination and challenge

Twenty cross-bred 1-year-old sheep were obtained and kept at the Teaching and Research Centre for Animal Health and Production (CEPIPSA), from the National Autonomous University of Mexico. All animals were checked for absence of *F. hepatica* eggs in the feces and antibodies in serum by ELISA, and were randomly allocated into 4 groups of 5 animals each. Each group was subcutaneously immunized with clone 1, clone 20 and a mixture of 7 clones (1, 2, 3, 5, 17, 19, 20); the dose was 1×10^{14} phage particles without adjuvant per animal, at the beginning and then at week 4. Control group animals were injected with PBS.

Metacercariae of *F. hepatica* used for challenging sheep were collected from laboratory colonies of *Lymnaea cubensis* snails experimentally infected with miracidia. Two weeks after the second immunization (week 6), each group member was orally challenged with 300 metacercariae given in a gelatin capsule administered with oesophageal tongs.

Protection assessment

All sheep were humanely slaughtered 22 weeks after the first immunization, and the livers and gall bladders were removed. The number of adults present in each animal were recovered and counted, and their length measured. The feces were removed from the rectum after slaughter and fecal examinations were performed using the sedimentation technique as described by Sexton *et al.* (1990). The number of *F. hepatica* eggs in the sediment was expressed as number of eggs per gram (EPG) of feces. Eggs were collected from the gall bladder, washed with tap water and incubated in darkness at 22 °C for 14 days (Dalton *et al.* 1996). They were examined microscopically for evidence of miracidium development and hatching. Eggs which hatched upon exposure to light or those containing a clearly-developed, mobile miracidium were scored as viable.

Analysis of antibody responses by ELISA

Blood samples were collected from all sheep prior to the first immunization and every 2 weeks until the time of slaughter (week 22). The serum was obtained and then stored at -80 °C. The antibody responses were analysed by ELISA, using 96-well microtitre plates coated with 2 µg of E/S products incubated in PBS overnight at 37 °C. The excess binding sites were blocked for 1 h at 37 °C with 200 µl of blocking solution. The serum samples were diluted 1:800 and incubated at 37 °C for 1 h. Bound antibodies were detected with donkey anti-sheep IgG-HRP (Sigma, USA) and ABTS as substrate. The absorbance values were measured with an ELISA reader (Beckman Coulter DTX 880). The protocol used for the ELISA using the phages as antigen was similar to that described above, except that the samples were diluted 1:400.

Statistical analysis

The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to compare the results of the number of worms recovered, the egg count and viability, as well as the size of *F. hepatica*. Correlations were calculated with Spearman's non-parametric correlation test. Differences in frequency of infection were tested by Chi-square, or when specified, by the Fischer exact test. All tests were performed using the software *SPSS 15 for Windows*. A $P \leq 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Western blot analysis using purified anti-cathepsin L antibodies

Cathepsin L identification was done by mass spectrometry; in which 5 masses assigned to expected peptides comprising 65 amino acids out of the 326

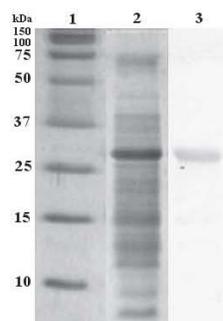


Fig. 1. Western blot analysis of anti-cathepsin L IgG response against E/S products of *Fasciola hepatica*. Molecular weight marker (lane 1), E/S products from mature flukes, separated by SDS-PAGE (12% gel) under reducing conditions (lane 2), and then transferred to PVDF membrane, recognized by the anti-cathepsin L antiserum (lane 3).

were demonstrated. Likewise, cathepsins L1/L2 migrated as a double 27–29.5 kDa band and were recognized by the anti-cathepsins L antiserum by Western blot analysis (Fig. 1).

Panning results and amino acid sequences of phage clones selected

To identify peptides that can mimic structural features of cathepsins L, we used the purified polyclonal anti-cathepsin L1/L2 antibodies to pan a 12-mer phage display library. In order to determine the effect of enrichment after each round of panning, input and output phages were titrated. The eluted phage of each round was increased from 2×10^4 pfu in the first round to 5.2×10^6 pfu in the third round (Table 1). After 3 rounds of panning 36 recombinant phage clones were randomly selected. The reactivity of the phage clones with anti-cathepsin L antibodies was measured by ELISA (Fig. 2). We selected 7 positive clones on the basis of the absorbance values above the negative controls and these were analysed by DNA sequencing. The deduced amino acid sequences of the selected peptides were aligned to several complete *F. hepatica* cathepsin L1/L2 sequences available from the GenBank database. The 7 phage clones selected and aligned with cathepsin L1/L2 were located at the middle of the sequence and/or the C-terminal end (Fig. 3A, B). The consensus amino acid residues of the mimotopes from the phage clones selected from the 12-mer peptide display library are presented in Fig. 3C. To examine whether the purified anti-cathepsin L1/L2 antibodies could recognize the peptides displayed by the bacteriophages, these were separated by Western blot with the purified IgG; 4 of 7 phage clones were clearly recognized (Fig. 3D).

Table 1. Enrichment of specific phages during panning

Round	Input phage (pfu)*	Eluted phages (pfu)	Phage recovery
1	1.0×10^{11}	2.0×10^4	2.0×10^7
2	1.0×10^{11}	4.6×10^5	4.6×10^6
3	1.0×10^{11}	5.2×10^6	5.2×10^8

* pfu: plaque-forming units.

Parasite burden and size in sheep vaccinated with phage clones

Animals vaccinated with clones 1 and 20 showed a mean reduction in fluke burden of 47.61% ($P < 0.05$) and 33.91% ($P > 0.05$), respectively (Table 2). No reduction in the fluke counts were found in those sheep inoculated with the mixture of clones. Also, the size of the adult parasites of the group vaccinated with clone 1 was smaller those of the other groups.

FEC and fluke egg viability

The fecal egg counts for each group are shown in Table 3, where a statistically significant reduction can be seen in the group inoculated with clone 20 ($P < 0.05$). Immunization with clone 1 or the mixture had no effect, although significant differences in the viability of eggs were seen between control and all vaccinated animals (Table 3).

Humoral response induced by the selected phage clones

In vaccinated sheep a low but detectable humoral response against the homologous phages was observed, with a peak 2 weeks after the first immunization, and a slight decrease until the end of the experiment (Fig. 4). The response was stronger against clone 1, followed by that to clone 20. The group vaccinated with the mixture of clones showed the lowest response, but a second increase in antibody levels after challenge was observed.

Figure 5 shows the reactivity of all groups towards the E/S products. As it can be seen, a slight antibody response was produced in the groups vaccinated with clones 1 and 20 two weeks after the first immunization. In addition, an increase in the absorbance of the 4 groups was observed within 2 weeks following challenge (at week 6) and remained high throughout the infection. The absorbance against adult fluke E/S products was higher in the serum of vaccinated animals than in controls. A significant negative correlation between the absorbance of the group vaccinated with clone 1 and the parasite burden was observed (Spearman's correlation coefficient $r = -0.958$; $P < 0.05$).

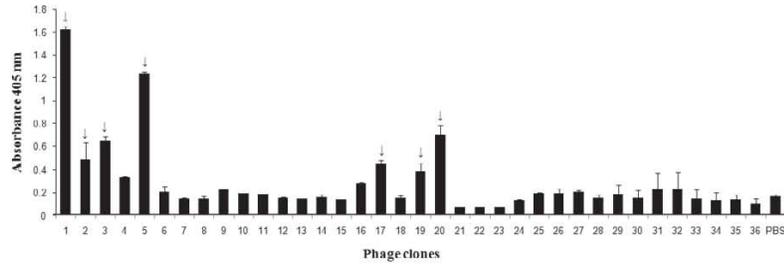


Fig. 2. Sandwich ELISA to select phage clones specifically bound to anti-cathepsin L antibodies. Arrows indicated phage clones selected. Data represent the mean of 3 determinations and bars represent standard deviations.

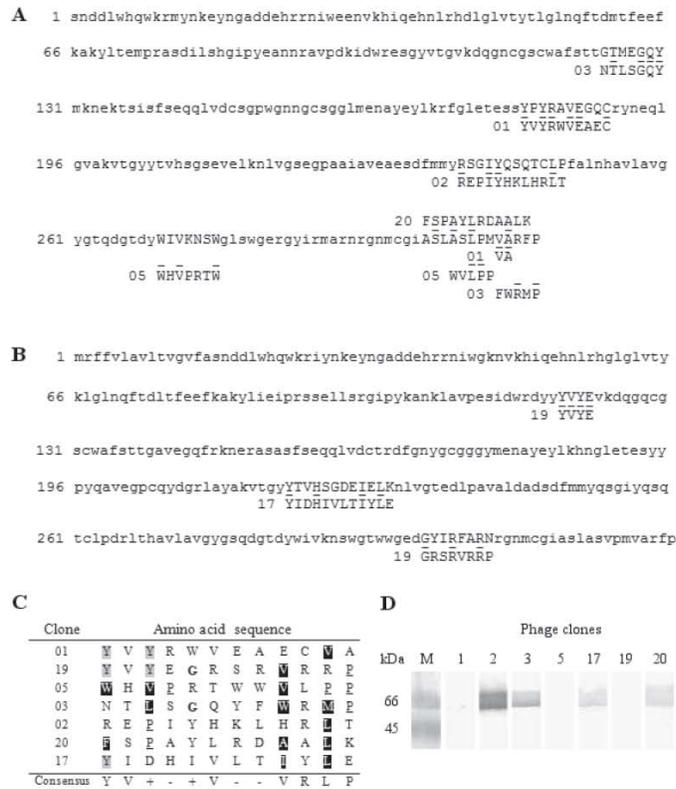


Fig. 3. Amino acid analysis of clones selected using purified rabbit anti-cathepsin IgG. Analysis of the 7 putative mimotopes and amino acid sequences of cathepsin L1 (A) and L2 (B) of *Fasciola hepatica* (GenBank database Accession numbers: L1, U62288; L2, U62289). (C) Sequence of peptides displayed by the phage clones and consensus amino acid residues. (D) Western blot analysis of phage clones with anti-cathepsin L antibodies. M: Molecular weight marker.

Table 2. Reduction in worm number and size due to vaccination of sheep with phage clones

Immunization with:	Number of flukes recovered		Reduction rate (%)	Mean size (mm) + s.d.
	Individual data	Mean + s.d.		
Clone 1	30, 48, 60, 74, 29	48.20 + 19.40*	47.61*	22.39 + 3.20*
Clone 20	55, 26, 73, 54, 96	60.80 + 25.88	33.91	24.47 + 3.46
Mixture of clones	110, 95, 27, 68, 176	95.20 + 55.09		25.39 + 3.55
PBS (control)	90, 126, 118, 57, 69	92.00 + 29.96		26.35 + 3.33

* Significant differences versus control group ($P < 0.05$).
s.d.: standard deviation.

Table 3. Reduction of FEC and viability of *Fasciola hepatica* eggs recovered from gall bladders of vaccinated sheep

Immunization with:	Fecal egg counts (mean + s.d.)	Reduction in FEC (%)	Egg viability (%)
Clone 1	147.00 + 38.82	25.85	58.92*
Clone 20	108.00 + 30.75	45.55*	73.76*
Mixture of clones	141.20 + 49.96	28.78	82.11*
PBS (control)	198.20 + 57.19		97.59

* Significant differences versus control group ($P < 0.05$).
FEC: fecal egg counts.

DISCUSSION

Random peptide phage libraries have been employed to select mimotopes, epitope mimics that regardless of their homology to the natural antigen could serve as good candidates in the development of vaccines (Demangel *et al.* 1996; Narum *et al.* 2006). The libraries can also be screened with polyclonal antisera (Tang *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005; Wu *et al.* 2006). Here, we report on the first use of phage display technology to screen mimotopes of *F. hepatica* cathepsins L1/L2. The 7 phage clones used in this study elicited an IgG response of low but significant magnitude against the E/S, especially in the case of clones 1 and 20. Moreover, challenge induced an augmented response in these 2 groups, which suggests that the antibody levels were boosting memory B cells, and that these epitopes exist in the native molecule.

The immunization results showed that clones 1 and 20 induced significant protection levels of 47.61% and 33.91%, when they were administered separately. Likewise, a reduction in fecal egg counts ranging from 25.85 to 45.55% was observed in sheep vaccinated with phage clones. Vaccination with each cathepsin L mimotope induced unique effects on adult and egg burdens. In the first report of vaccination with native cathepsins L in sheep, fecal egg counts were reduced in 69.7%, without having an effect on adult worm burdens (Wijffels *et al.* 1994). Immunization of sheep with native cathepsin L1 or cathepsin L2 against

F. hepatica elicited protection levels of 33% and 34% as measured by reduction of worm burdens and of 71% and 81%, reduction in egg output, respectively, while a cocktail of native cathepsins L1 and L2 induced 60% reduction in fluke burden (Piacenza *et al.* 1999). Expression of recombinant cathepsin L1 in *Pichia pastoris* for vaccination trials in sheep induced 35 to 43% protection with 30% anti-fecundity effect (McManus and Dalton, 2006). Thus, the level of protection elicited with the phage mimotopes was within the range reported with the use of other, larger and more expensive immunogens.

Flukes recovered from all vaccinated groups tended to be smaller than those collected from the control group, particularly in the case of those immunized with clone 1. Dalton *et al.* (1996) also reported that flukes recovered from cattle vaccinated with native cathepsin L and haemoglobin had a significant reduction in size, which indicated that vaccination adversely affected the development of the parasites.

In this trial, immunization with the phage clones also had an effect on the viability of eggs recovered, ranging from 58.92 to 82.11%. An anti-embryonation effect mediated by the immune response, using native cathepsin L1 was also observed in bovines, and eggs with 50–75% viability were recovered from the gall bladders (Dalton *et al.* 1996). By immunohistochemistry the presence of cathepsin L has been demonstrated in the oocytes, as well as in the Mehlis' and vitelline glands of *F. hepatica* (Wijffels *et al.* 1994).

Harmsen *et al.* (2004) immunized rats with 3 synthetic peptides of cathepsin L1 (residues 15–33) and L3 (residues 16–34) encompassing the region of the pro-peptide, and cathepsin L1 comprising 3 residues of the pro-peptide and the 17 N-terminal residues of the mature protease (residues 104–122), and found a reduction in parasite burden of 40.4 to 75.8%. The alignment of the phage clones within the amino acid sequence of cathepsins L1/L2 showed that they are located in the middle of the sequence and/or the C-terminal end. Clone 1 induced a protection level of 47.6% and aligned with amino acids 180–189 and 307–308 of mature cathepsin L1,

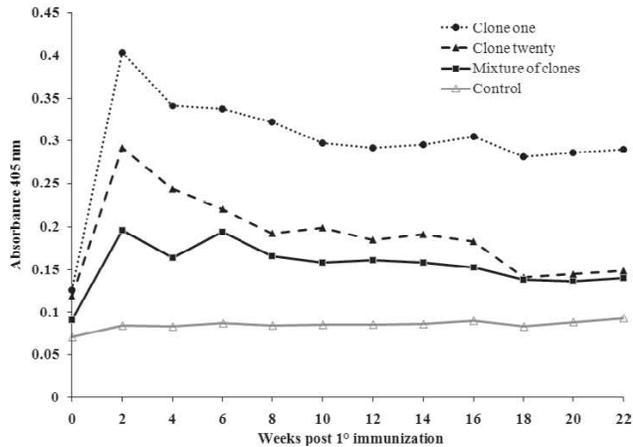


Fig. 4. IgG reactivity against selected phage clones of the sera from control and vaccinated sheep, challenged with 300 metacercariae at week 6. Sheep were given 2 immunizations at 0 and 4 weeks with 1×10^4 pfu without adjuvant. Results are the mean of the 5 animals run in duplicate.

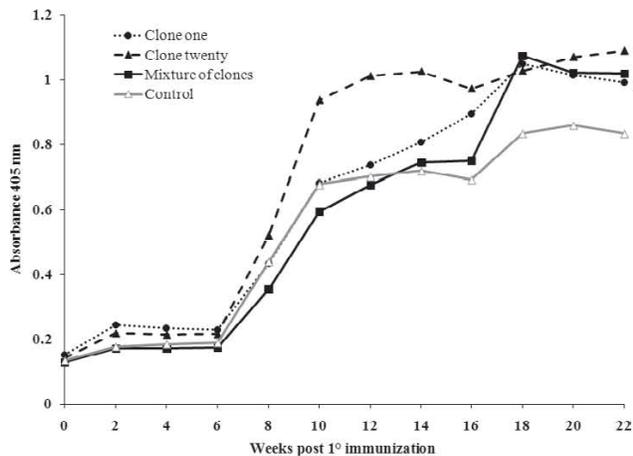


Fig. 5. IgG reactivity to E/S products in ELISA of the sera from control and vaccinated sheep, challenged with 300 metacercariae at week 6. Sheep were given 2 immunizations at 0 and 4 weeks with 1×10^4 pfu without adjuvant. Mean OD of 1:400-diluted serum in duplicate wells. Results are the mean of the 5 animals run in duplicate.

suggesting this is a conformational epitope, and thus that antibodies against it may be directly playing a protective role. In this regard, it is worth mentioning that *in vitro* binding of rabbit anti-cathepsin L1 IgG to the protease results in inhibition of its ability to cleave IgG molecules that mediate eosinophil attachment to flukes (Smith *et al.* 1994).

Since clone 20 probably displayed a linear epitope (it was positive in Western blot), we aimed to compare it with clone 1, and interestingly we found induction of protection, but probably through a different way, since it induced a stronger reduction upon egg count than clone 1, but a weaker protection as measured by egg viability or adult burden and size.

Similar to clone 1, phages 8 and 19 seemed to display conformational epitopes, as suggested by Western blot. Unfortunately, due to economical reasons, they were studied mixed with the other 3 clones. Even though no effect was observed on adult burden or size and a non-significant effect on FEC was observed, a slight but significant reduction in egg viability was demonstrated. Clearly, these clones are good candidates for individual immunoprophylaxis studies. The activity of cathepsin L and thereby miracidial development and egg output may have been blocked by the induction of antibodies.

The data presented demonstrate that the selected mimotopes of cathepsin L induced a protective immune response against infection by *Fasciola hepatica*. These results are encouraging in terms of vaccine development because of the relative simplicity of selection and the short length of the peptides. Potentiation of immune responses to the mimotope by the use of appropriate adjuvants should be further investigated. In addition, phage clones of the same or different molecules could be used in conjunction to increase the level of protection. However, reduction in worm burden and size, fecal egg count and miracidium development could lead to reduced cattle morbidity and suggests that these mimotopes of cathepsin L may represent potential vaccine candidates. A lower dissemination of eggs would have a negative effect on pasture contamination and in this way on the prevalence of fasciolosis in endemic areas (Dalton *et al.* 1996).

This study was supported by the project PAPIIT-IN208703-03 DGAPA-UNAM, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. The authors are grateful to the staff of the Teaching and Research Centre for Animal Health and Production (CEPIPSA), of the National Autonomous University of Mexico for collecting the samples. We also thank Esther Calderón, Héctor Luna, Carmen Ortiz, Ignacio De la Mora, Alfonso Reyes, Laura Trejo and Jorge Cruz for providing excellent technical assistance.

REFERENCES

- Berasain, P., Goni, F., McGonigle, S., Dowd, A., Dalton, J. P., Frangione, B. and Carmona, C. (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *Journal of Parasitology* **83**, 1–5.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Carmona, C., Dowd, A. J., Smith, A. M. and Dalton, J. P. (1993). Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Molecular and Biochemical Parasitology* **62**, 9–17.
- Dalton, J. P. and Heffernan, M. (1989). Thiol proteases released in vitro by *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **35**, 161–166.
- Dalton, J. P., McGonigle, S., Rolph, T. P. and Andrews, S. J. (1996). Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and Immunity* **64**, 5066–5074.
- Dalton, J. P., Neill, S. O., Stack, C., Collins, P., Walshe, A., Sekiya, M., Doyle, S., Mulcahy, G., Hoyle, D., Khaznadji, E., Moiré, N., Brennan, G., Mousley, A., Kreshchenko, N., Maule, A. G. and Donnelly, S. M. (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology* **33**, 1173–1181.
- Demangel, C., Lafaye, P. and Mazie, J. C. (1996). Reproducing the immune response against the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 with mimotopes selected from a phage-displayed peptide library. *Molecular Immunology* **33**, 909–916.
- Gaasenbeek, C. P., Moll, L., Cornelissen, J. B., Vellema, P. and Borgsteede, F. H. (2001). An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology* **95**, 37–43.
- Harmsen, M. M., Cornelissen, J. B., Buijs, H. E., Boersma, W. J., Jeurissen, S. H. and van Milligen, F. J. (2004). Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *International Journal for Parasitology* **34**, 675–682.
- Hillyer, G. V. (2005). Fasciola antigens as vaccines against fascioliasis and schistosomiasis. *Journal of Helminthology* **79**, 241–247.
- Huang, J., Gutteridge, A., Honda, W. and Kanehisa, M. (2006). MIMOX: a web tool for phage display based epitope mapping. *BMC Bioinformatics* **12**, 451.
- Mas-Coma, S., Burgues, M. D. and Esteban, J. G. (1999). Human fasciolosis. In *Fasciolosis* (ed. Dalton, J. P.), pp. 411–434. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Mas-Coma, S. (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of Helminthology* **79**, 207–216.
- McManus, D. P. and Dalton, J. P. (2006). Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* **133**, S43–S61.
- Mitchell, G. B., Maris, L. and Bonniwell, M. A. (1998). Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *The Veterinary Record* **143**, 399.
- Moll, L., Gaasenbeek, C. P., Vellema, P. and Borgsteede, F. H. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology* **91**, 153–158.
- Narum, D. L., Ogun, S. A., Batchelor, A. H. and Holder, A. A. (2006). Passive immunization with a multicomponent vaccine against conserved domains of apical membrane antigen 1 and 235-kilodalton rhoptry proteins protects mice against *Plasmodium yoelii* blood-stage challenge infection. *Infection and Immunity* **74**, 5529–5536.
- Overend, D. J. and Bowen, F. L. (1995). Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. *Australian Veterinary Journal* **72**, 275–276.

- Piacenza, L., Acosta, D., Basmadjian, I., Dalton J. P. and Carmona, C.** (1999). Vaccination with cathepsin L proteinases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fascioliasis in sheep. *Infection and Immunity* **67**, 1954–1961.
- Sexton, J. L., Milner, A. R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T. W., Mitchell, G. F. and Campbell, N. J.** (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology* **145**, 3905–3910.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**, 850–858.
- Smith, A. M., Carmona, C., Dowd, A. J., McGonigle, S., Acosta, D. and Dalton, J. P.** (1994). Neutralization of the activity of a *Fasciola hepatica* cathepsin L proteinase by anti-cathepsin L antibodies. *Parasite Immunology* **16**, 325–328.
- Smith, A. M., Dowd, A. J., Heffernan, M., Robertson, C. D. and Dalton, J. P.** (1993). *Fasciola hepatica*: a secreted cathepsin L-like proteinase cleaves host immunoglobulin. *International Journal for Parasitology* **23**, 977–983.
- Smith, G. P. and Petrenko, V. A.** (1997). Phage display. *Chemical Reviews* **97**, 391–410.
- Tang, L. F., Yi, X. Y., Zeng, X. F., Wang, L. Q. and Zhang, S. K.** (2004). *Schistosoma japonicum*: isolation and identification of peptides mimicking ferritin epitopes from phage display library. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **36**, 206–210.
- Torgerson P. R. and Claxton, J. R.** (1999). Epidemiology and control. In *Fasciolosis* (ed. Dalton, J. P.), pp. 113–149. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Wang, M., Yi, X. Y., Li, X. P., Zhou, D. M., Larry, M. and Zeng, X. F.** (2005). Phage displaying peptides mimic schistosoma antigenic epitopes selected by rat natural antibodies and protective immunity induced by their immunization in mice. *World Journal of Gastroenterology* **11**, 2960–2966.
- Wijffels, G. L., Salvatore, L., Dosen, M., Waddington, J., Wilson, L., Thompson, C., Campbell, N., Sexton, J., Wicker, J., Bowen, F., Friedel, T. and Spithill, T. W.** (1994). Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology* **78**, 132–148.
- Wu, H. W., Hu, X. M., Wang, Y., Kurtis, J. D., Zeng, F. J., McGarvey, S. T., Wu, G. L., Zhang, Z. S. and Hua, Z. C.** (2006). Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Tropica* **99**, 200–207.
- Yamasaki, H., Aoki, T. and Oya, H.** (1989). A cysteine proteinase from the liver fluke *Fasciola* spp.: purification, characterization, localization and application to immunodiagnosis. *Japanese Journal of Parasitology* **38**, 373–384.

10. Bibliografía

Acosta D., Cancela M., Piacenza L., Roche L., Carmona C., Tort j. 2008 *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Molecular & Biochemical Parasitology* 158:52-64.

Bollag D. M., Stuart j. Edelstein, Michael D. Rozycki (1996). *Protein Methods*. New York, Wiley-Liss, Inc.

Brichta J., Hnilova M., Viskovic T. 2005. Generation of hapten-specific recombinant antibodies: antibody phage display technology 50(6):231-252.

Beckham SA, Law RH, Smooker PM, Quinsey NS, Caffrey CR, McKerrow JH, Pike RN, Spithill TW. 2006. Production and processing of a recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin B-like enzyme (FhcatB1) reveals potential processing mechanisms in the parasite 387(8):1053-61.

Chemale G, Morphey R, Moxon JV, Morassuti AL, Lacourse EJ, Barrett J, Johnston DA, Brophy PM. 2006. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. *Proteomics*;6(23):6263-73.

De Berardinis P, Haigwood NL. 2004. New recombinant vaccines based on the use of prokaryotic antigen-display systems. *Expert Rev Vaccines*. 3(6):673-9.

Dixit A.K., Pooja Dixit, Sharma R.L. 2008. Immunodiagnostic/protective role of Cathepsin L cysteine proteinases secreted by *Fasciola* species. *Veterinary Parasitology*, 154 (2008) 177-184

Heatley N. G. 1977. Production of antibody to staphylococcal delta-haemolysin in the rabbit. *British journal of experimental pathology*. 58(4):400-11.

Hoyle D.V., Dalton J.P., Chase-Topping M., Taylor D.W. 2003. Pre-exposure of cattle to drug-abbreviated *Fasciola hepatica* infections: the effect upon subsequent challenge infection and the early immune response. *Veterinary Parasitology*, 111(1):65-82.

McConville M, Brennan GP, McCoy M, Castillo R, Hernandez-Campos A, Ibarra F, Fairweather I. 2006. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: surface and subsurface tegumental responses to in vitro treatment with the sulphoxide metabolite of the experimental fasciolicide compound alpha. *Parasitology* 133(Pt 2): 195-208.

Morphey Russell M., Wright Hazel A., LaCourse E. James, Woods Debra J. and Brophy Peter M.. 2007. Comparative Proteomics of Excretory-Secretory Proteins Released by the Liver Fluke *Fasciola hepatica* in Sheep Host Bile and during *in Vitro* Culture *ex Host*. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:963-972.

Munguía-Xóchihua JA, Ibarra-Velarde F, Ducoing-Watty A, Montenegro-Cristino N, Quiroz-Romero H. 2007. Prevalence of *Fasciola hepatica* (ELISA and fecal analysis) in ruminants from a semi-desert area in the northwest of Mexico. *Parasitolo Res.* 101(1):127-30.

Ocampo Ezpinoza, Verónica. 2004. Construcción de bibliotecas genómica y de expresión genética para la identificación de antígenos para *Anaplasma marginale*. Tesis maestría UNAM Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Palacios Rodríguez, Yadira. 2007. Caracterización estructural, antigénica e inmunogénica de epítomos de envoltura del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1): un estudio con la metodología Phage-Display. Tesis Doctorado UNAM Facultad de Ciencias.

Rangel-Ruiz L.J. & E. Martínez-Durán. 1994. Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la Fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. *Vet. Méx.* 25(4): 327-331

Rodell AK, Ahlstedt S, Olsson TK, Svärd PO. 1976. Formation of homocytotropic antibodies with penicilloyl specificity in the rabbit. *International archives allergy and applied immunology.* 51(2):156-67.

Sidhu S.S., Lowman H.B., Cunningham B.C., Wells J.A. 2000. Phage display for selection of novel binding peptides. Chap. 21. In *Methods in enzymology*. Ed. Academic Press. 238:333-363.

Smith A.M., Dowd A.J., McGonigle S., Keegan P.S., Brennan G., Trudgett A., Dalton J.P. 1993. Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol.* 62(1):1-8.

Smith G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317.

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

Söderström M, Morgenstern R, Hammarström S. 1995. Protein-protein interaction affinity chromatography of leukotriene C4 synthase. Protein expression and purification. 6(3):352-6.

Villa-Mancera A, Quiroz-Romero H, Correa D, Ibarra F, Reyes-Pérez M, Reyes-Vivas H, López-Velázquez G, Gazarian K, Gazarian T, Alonso RA. 2008. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Parasitology.* 135(12):1437-45.

Wetsel R.A. 1995. Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Current opinion Immunology*. 7(1):48-53.

Yetzi Robles, Erik González, Tzipe Govezensky, Maria Elena Mungia, Gonzalo Acero, Raul J. Bobes, Goar Gevorkian and Karen Manoutcharian. 2005. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cADN library and evaluation of their use for diagnosis of neurocysticercosis. *Clinical Immunology* 116(3):265-270.

11. Índice

Amplificación de clonas seleccionadas	22	Evaluación de la reactividad antigénica de las clonas seleccionadas por ensayo de ELISA	
Anexo I	48	directo	25
Anexo II	58	<i>Fasciola hepatica</i>	9
Anexo III	61	Generación de antígeno.....	12
Anexo IV	67	Hipótesis	15
Anexos	48	Inmunización de conejos con productos SE de <i>F. hepatica</i>	17
Antígenos en <i>F. hepatica</i>	11	Introducción.....	9
Bacteriófago M13.....	12	Materiales y Métodos	16
Bibliografía	76	Objetivos	15
Biología de <i>Fasciola hepatica</i>	9	Objetivos Particulares	15
Biopanning	21	Obtención de fasciolas para la preparación de antígeno somático y productos SE.....	16
Bioselección.....	14	Obtención de secuencias de ADN de las clonas seleccionadas de la biblioteca.....	40
Conclusiones.....	47	Obtención de sueros negativos de borrego.....	19
Cromatografía de afinidad.....	17	Obtención de sueros positivos de borrego.....	18
Discusión.....	45	Perspectivas	47
Ensayo de Western Blot (inmuno blot).....	20	Phage Display.....	13
Evaluación de las IgG y sueros contra antígeno somático y productos de SE por ELISA indirecto	19	Purificación y evaluación de IgG de conejo inmunizado con antígeno somático contra productos SE y antígeno somático de <i>F. hepatica</i>	28
Evaluación de clonas inmunodominantes por ensayo de ELISA competitivo	25	Resultados.....	27
Evaluación de IgG dirigida contra productos SE de <i>F. hepatica</i> por Western blot y ELISA.....	36	Resumen.....	8
Evaluación de la antigenicidad de las clonas inmunodominantes por ensayo de ELISA indirecto	24	Secuenciación de clonas seleccionadas de la biblioteca.....	26
Evaluación de la antigenicidad de las clonas inmunodominantes seleccionadas por ELISA	39	Selección clonas inmunodominantes de una biblioteca combinatoria de Phage Display, empleando anticuerpos dirigidos contra productos SE.....	39
Evaluación de la especificidad de reconocimiento de sueros de borregos positivos y negativos a <i>F. hepatica</i> por ensayo de ELISA	33	Sistema phage display	20
Evaluación de la inmunización de conejos con antígeno somático y productos SE por ensayo de ELISA	27	Titulación de clonas recuperadas.....	23