

**Obtención de Mimotopos por “Phage Display” para el Mapeo de  
Epítomos de Paramiosina de *Taenia solium***

**Tesis que para Obtener el Título de Licenciado en Investigación**

**Biomédica Básica**

**Presenta la Alumna Karla Verónica Téllez Ramírez**

**Dirigida por Dr. Karlen Gazarian Gazarian.**

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., México D. F.**

**Noviembre 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Dedicatoria

**Dedico este trabajo muy cariñosamente a mis padres: Juan Carlos Téllez Guerrero y María del Carmen Verónica Ramírez Marín.**

**También quisiera dedicarlo muy respetuosamente a todos aquellos Seres cuyas vidas tanto han servido para el avance de la Investigación.**

## Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a todos mi profesores, tanto de materias académicas como de enseñanzas de vida. Entre ellos quisiera destacar a los que más de cerca me han instruído:

A Horacio Merchant Larios, por su infinita paciencia y su pasión a la ciencia

A Luis Servín González, por su delicada manera de compartir sus conocimientos y su amor a la investigación

A Patricia Ostrosky, por haberme acogido cuando más lo necesitaba.

A. Karlen Gazarian Gazarian por TODO y más.

A Tatiana Gazarian Gazarian por su tiempo y paciencia.

A Enrique Ortega, Patricia Tato, Jorge Ramírez y Baltasar Becerril, por sus valiosos tiempo y comentarios.

A Ricardo Hernández Ávila, por ser mi Ángel Guardián y un gran apoyo en mi trabajo de tesis.

A Oscar Ramírez Salcedo, por sus enseñanzas y amistad.

Muy cariñosamente a la futura Dra. Amaranta Rivas Carvalho, por sus valiosos consejos, su constancia existencial, su gran apoyo y su incondicional amistad.

A David Luna por aparecer con su varita mágica en el momento de mayor crisis y por enseñarme el concepto “pareja”. Te amo.

A mi Abuelo, por amarme a pesar de todo y de todos: serás eternamente correspondido.

A Marlo y a Mummy, por existir y permitirme hacerlo.

A mi Abuela, por sus pensamientos, siempre extrañamente positivos.

A Copelia y Andrés por ser tan cercanos y lindos conmigo.

A mi Familia: de cada uno de ustedes llevo piezas fundamentales para hacer frente a la vida.

A mis amigos: La Familia Rivas, Higareda y Mas, María Fernanda Higareda, Mariana Steimle, Elena Kamphausen, Valeria Mas, Lino Palacios, Gerardo González, Roberto Risco, Heidi Becker, Jens Piehler, y Sandra Ramírez, por todo lo que han compartido conmigo.

A Mireya Ramírez, por haberme mostrado otra forma de existir.

Al Dr. José Luis Jiménez, por su profesionalismo y gran ayuda.

A mi Val: desearía que las cosas hubieran resultado diferentes, pero mantengo en mi corazón esperanza porque la vida aún nos pueda sorprender positivamente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, con toda la gente de la que tanto aprendí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México: por su gran entrega al País, por seguir tan fuerte, a pesar de todas las tormentas y por haber sembrado en mí semillas de amor por el conocimiento, por mi Nación y mi gente.

## Índice

Obtención de Mimotopos de Paramiosina de <i>Taenia solium</i> por “Phage Display”	.....
Índice	.....
Glosario	.....
I Introducción	.....
I.1 <i>Taenia solium</i>	.....
I.1.2 Ciclo de Vida	.....
I.1.3 Morfología del Desarrollo	.....
I.1.4 Sintomatología	.....
I.1.5 Tratamiento	.....
I.1.6 Cisticerco	.....
I.1.7 Cisticercosis en Humanos	.....
I.2 Neurocisticercosis	.....
I.2.1 Evolución	.....
I.2.2 Patología	.....
I.2.3 Diagnóstico	.....
I.2.4 Tratamiento	.....
I.3 Antígeno B	.....
I.4 Anticuerpos	.....
I.5 Anticuerpos Monoclonales	.....
I.6 Péptidos Sintéticos	.....
I.6.1 Péptidos Sintéticos para producir Anticuerpos	.....
I.6.2 Síntesis de Péptidos en Microorganismos a Gran Escala	.....
I.6.3 Uso de Péptidos Sintéticos como Inmunógenos	.....
I.7 Fago Filamentoso	.....
I.7.1 Características	.....
I.7.2 Ciclo de Vida de M13	.....
I.8 Phage Display	.....
I.8.1 Principios de la Expresión de Péptidos	.....
I.8.2 Expresión de Péptidos en Fagos o Phage Display	.....
I.8.3 Phage Display en pIII	.....
I.8.4 Mimetismo de Epítomos: Mimotopos	.....
I.9 Antecedentes	.....
II Hipótesis	.....
III Objetivos	.....
III.1 Objetivo General	.....
III.2 Objetivos Particulares	.....
IV Material y Métodos	.....
IV.1 Medios de Cultivo	.....
IV.2 Amortiguadores y Soluciones	.....
IV.3. Anticuerpos y Controles	.....
IV.4 Purificación de la Fracción IgG del Antisuero	.....
IV.5 Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford	.....
IV.6 Biblioteca de Péptidos “Phage Display”	.....
IV.7 Biopanning del Antisuero y de la Fracción IgG purificada	.....
IV.8. Biopanning Sólido	.....
IV.9 Biopanning Líquido o Alternativo (unido en solución con proteína G)	.....
IV.10 Titulación	.....

# Obtención de Mimotopos de Paramiosina de *Taenia solium* por “Phage Display”

## Resumen

La cisticercosis es una enfermedad producida por el parásito *Taenia solium*, del cual el humano es el huésped definitivo y el cerdo el huésped intermediario. En el tercer mundo la cisticercosis es considerada un grave problema debido a las malas condiciones agropecuarias para la crianza de cerdos y a las pobres condiciones de salubridad en general, que permiten la continuidad del ciclo de vida del parásito cuya consecuencia es la infección de humanos que consumen alimentos contaminados. La infestación del sistema nervioso por este parásito conocida como neurocisticercosis es la parasitosis más común del sistema nervioso central (Nogales-Gaete y cols 2006)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> y presenta un cuadro clínico difícil de diagnosticar, puesto que los síntomas se pueden confundir con múltiples patologías neurológicas. Además, la infección puede variar dependiendo de la respuesta inmunológica, el tamaño del inóculo, la localización del parásito en el cerebro, etc.

Uno de los antígenos más inmunodominantes de *T. solium* es la paramiosina, (también conocida como antígeno B) por lo que se ha utilizado para detección de la neurocisticercosis en fluido cefaloraquídeo de pacientes, ya que la mayoría presentan anticuerpos contra esta proteína (Flisser y cols. 1980)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>.

En 1985, Young, y cols.<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> introdujeron una metodología para la clonación de secuencias inmunoreactivas de antígenos de superficie de bacterias por medio de su expresión, como proteínas, en placas de fago lambda (Phage Display); para posteriormente identificar las clonas de interés utilizando como sonda el anticuerpo adecuado.

En el presente trabajo se utilizó la técnica del Phage Display, seleccionando los fagos con un antisuero que reconoce la porción de 20 aminoácidos de un péptido recombinante del extremo amino terminal de la paramiosina de *T. solium* o TPmy, llamado ASpy, así como la fracción Ig G purificada del mismo, denominada ppyP.

Después de 3 rondas de selección con ASpy y 4, en el caso de ppyP; así como una pequeña modificación en el proceso de elución de ppyP, la inmunoreactividad de las clonas obtenidas fue medida por ensayos de ELISA y en varios casos resultó positiva. Posteriormente, la secuencia de las clonas fue comparada con la de la paramiosina de *T. solium*, con la que se encontraron similitudes importantes.

Los resultados de este trabajo muestran un grupo de péptidos con alta homología con el fragmento amino terminal de Ag B con reacción antigénica con oportunidad de ser utilizados como inmunógenos en trabajos posteriores en la búsqueda de una vacuna contra *T. solium*.

## Glosario

aa	Aminoácidos
Ag B	antígeno B
BSA	albúmina sérica fetal
cm	Centímetro
cbp.	cuanto baste para
DNA	ácido desoxiribonucleico
DO	densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
h	hora
IEF	inmunoelectroforesis
kDa	kilo saltones
m	metro
mAb	anticuerpo monoclonal
mg	miligramo
min	Minuto
mm	milímetro
$\mu$ l	microlitro
$\mu$ m	micrometro
nm	nanometro
PCR	polimerase chain reaction
Phage Display	expresión en fago
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundo
ssDNA	DNA de cadena sencilla
TAC	tomografía axial computarizada

ta	temperatura ambiente
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
ufc	unidades formadoras de colonias



# I Introducción

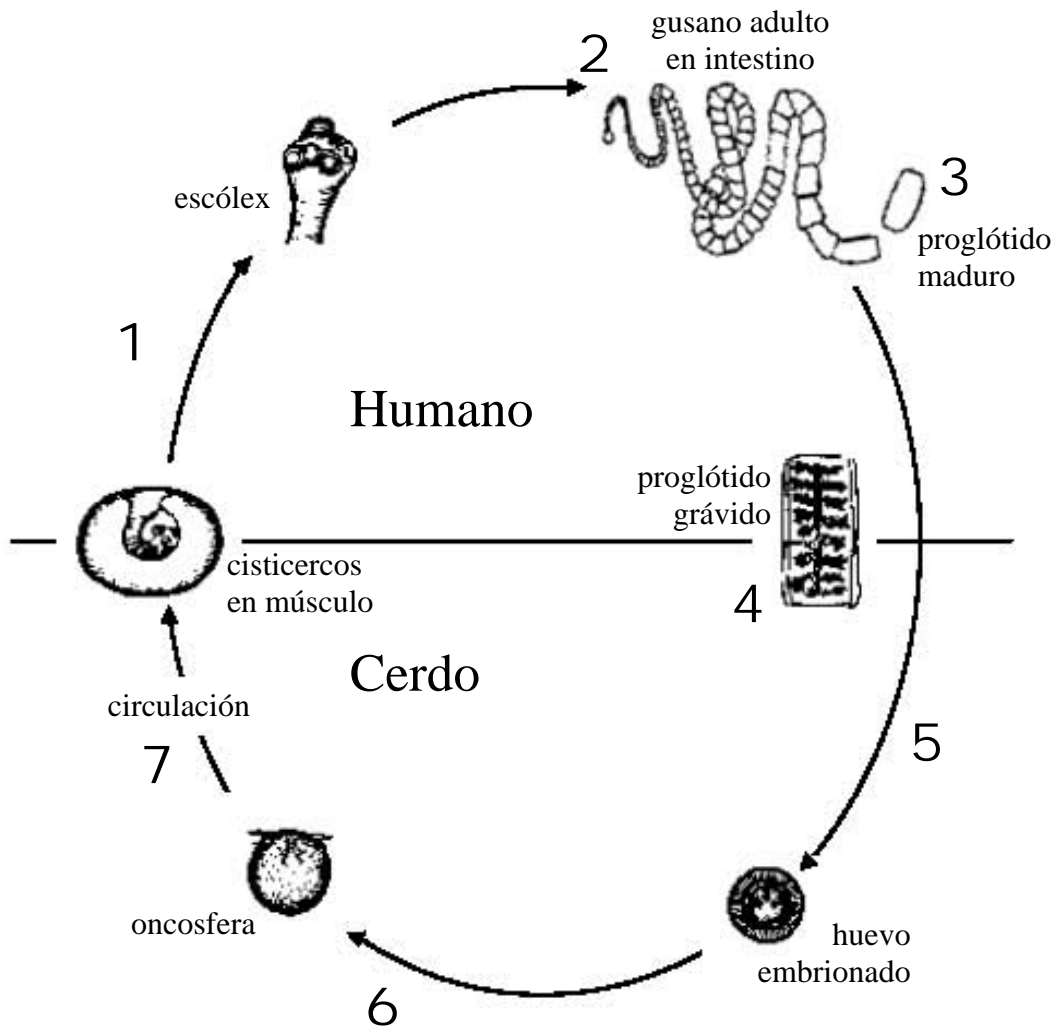
## I.1 *Taenia solium*.

*Taenia solium* es el gusano plano de mayor peligro potencial para los humanos debido a las posibles autoinfecciones con sus huevos.

El huésped definitivo de *T. solium* es el humano, el intermediario el cerdo. Este parásito se encuentra en todos los lugares donde se ingiere la carne de cerdo parasitada salada o mal cocida y prevalecen métodos de crianza no tecnificados o de traspatio. Raras veces se presentan infecciones por *T. solium* en EE.UU. y en las culturas en las que no se ingiere el cerdo, como la musulmana, siendo más frecuente en México y Europa Central. (García y cols, 1997)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>

### I.1.2 Ciclo de Vida.

El ciclo de vida de *T. solium* requiere un huésped intermediario. Los huevos son embrionados y totalmente infectivos, pero no eclosionan hasta ser ingeridos por el huésped intermediario, en cuyos músculos maduran hasta la siguiente etapa de larvas infectantes o cisticercos. El cisticerco es un tipo de metacéstodo o larva que consta de una vejiga de paredes delgadas llena de fluido que contiene el escólex, que forma una membrana germinativa. Tiene un diámetro de 0.5 cm o más. El humano se infecta al ingerir la carne mal cocida del puerco cisticercoso. Los elementos químicos presentes en el tracto digestivo del huésped activan al cisticerco y éste se fija en la pared del intestino delgado (fig. 1.1). Las larvas crecen y maduran en el intestino delgado hasta desarrollarse en la forma adulta del gusano, la tenia que madura en el humano se convierte en adulto en un período entre 5 y 12 semanas (fig. 1.2).



**Figura 1: Ciclo de Vida de *Taenia solium*.** El humano se infecta al ingerir la carne mal cocida del cerdo cisticercoso y al ser activado el cisticerco por los compuestos digestivos del huésped, éste se fija a la pared del intestino delgado por medio del escólex (1.1). La larva crece y madura hasta desarrollarse el gusano adulto o tenia por la formación sucesiva de proglótidos en distintos estadios de desarrollo (1.2). Mientras se alejan del cuello, desplazados por nuevos proglótidos, éstos van madurando hasta ser totalmente diferenciados (1.3). Los proglótidos grávidos se desprenden espontáneamente del gusano y son liberados al exterior por medio de las heces del humano (1.4). Una vez en contacto con el medio ambiente, los proglótidos grávidos se pudren y liberan los huevos embrionados que pueden ser ingeridos por el cerdo (1.5). Al ser ingeridas por el cerdo, la oncosferas son activadas por los compuestos digestivos del cerdo (1.6) Las oncosferas penetran la pared intestinal del cerdo y alcanzan capilares que los distribuyen por todo el organismo (1.7).

Una vez que la larva se fija por medio del escólex a la mucosa intestinal empieza su desarrollo que consiste en la formación de proglótidos a partir del cuello (fig.1.3). Mientras

se alejan del cuello, desplazados por nuevos proglótidos, éstos van madurando hasta ser totalmente diferenciados (fig. 1.4). La cadena de proglótidos en distintos estadios de maduración se conoce como estróbilo. Al final de éste se encuentran los proglótidos diferenciados que contienen alrededor de 50 000 huevos cada uno. Los proglótidos grávidos se desprenden espontáneamente del gusano y son liberados al exterior por medio de las heces del humano, ocurriendo la primera expulsión de huevos a los 67 días post infección aproximadamente (fig. 1.5). De hecho si se da un tratamiento antihelmíntico que no elimine el escólex por medio de su expulsión, el paciente dejará de liberar huevos de forma temporal, reanudándose la evacuación de éstos en un lapso de 57 a 61 días. Por lo tanto, después de un tratamiento, es importante la detección del escólex en las heces del individuo, de no ser esto posible hay que realizar un segundo análisis aproximadamente 2 meses después del tratamiento en busca de proglótidos o huevos para estar seguros que el paciente está libre del parásito o para volver a administrar medicamentos.

Una vez liberados los proglótidos grávidos y en contacto con el medio ambiente se pudren y liberan los huevos que ahora podrán ser ingeridos por el cerdo (fig. 1.6). Al ser ingeridos por el cerdo, los huevos eclosionarán. La oncosfera o embrión hexacanto dentro del huevo será activada por las sales biliares y enzimas proteolíticas en el intestino del huésped. Ya activadas las oncosferas penetran la pared intestinal del cerdo hasta alcanzar capilares sanguíneos y linfáticos que las distribuirán por todo el organismo. El proceso de maduración de embrión a cisticerco toma alrededor de 10 semanas, éste puede sobrevivir varios años en el huésped intermediario. Finalmente, el humano ingiere la carne mal cocida del cerdo infectado y se repite el ciclo al ser activado el cisticerco por los compuestos intestinales del huésped definitivo (fig. 1.7).

Distinto a la mayoría de especies de tenias, el cisticerco de *T. solium* sí se desarrolla en los humanos, fungiendo éstos como huéspedes intermediarios. La infección ocurre cuando los huevos embrionados pasan del estómago al intestino, donde eclosionan. Las personas infectadas con el gusano adulto pueden contaminar su entorno con los huevos que son ingeridos accidentalmente por ellos mismos o por otros miembros de la familia o comunidad.

### I.1.3 Morfología del Desarrollo

*Taenia solium* llega a medir hasta 10 m de longitud, siendo el tamaño más común entre 1.5 y 5 m. Tiene un escólex muscular con 4 ventosas y un rostelo no retráctil armado con dos hileras de 22 a 32 ganchillos entre 130 y 180µm de largo, por medio de los cuales se adhiere a la pared del yeyuno; y un cuello que es una estructura de unión entre el escólex y el estróbilo. A partir de la región distal del cuello se empiezan a formar los proglótidos nuevos e inmaduros siendo desplazados de su posición conforme van madurando y avanzan a lo largo del estróbilo hasta llegar al final cuando son grávidos.

Cuando están cerca del cuello, los proglótidos son de tamaños variables, pero ya maduros y con huevos miden entre 7 y 12 mm de largo y 5 a 6 mm de ancho. Estos segmentos son más anchos que largos y contienen un grupo de órganos sexuales masculinos y femeninos, por lo que se consideran como unidades reproductoras independientes. Los genitales masculinos están compuestos por 150 a 200 testículos con un vaso eferente cada uno, estos se unen para formar un vaso deferente común que desemboca por un costado del proglótido al atrio genital. Los genitales femeninos constan de un ovario trilobulado en la base del útero, en el extremo posterior del proglótido y estructuras asociadas (células vitelinas). El

conjunto se denomina oogenotopo y dota al ovocito de vitelo y cubierta. Conforme los ovocitos maduran avanzan por un único oviducto y desembocan en el atrio genital donde son fertilizados. Los proglótidos grávidos son más anchos que largos y presentan un útero típico de *T. solium* con un tallo medio entre 7 y 13 ramas laterales que tienen un número variable de ramificaciones secundarias y sirven para el diagnóstico de este parásito en preparaciones de individuos vivos o teñidos. Los proglótidos preñados contienen huevos en distintos estadios de maduración, aproximadamente la mitad presenta oncosferas infectivas; los inmaduros continúan su maduración fuera del humano y pueden permanecer viables e invasivos durante semanas o meses (Schmidt y cols. 1989)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>

Los huevos son cubiertos por tres membranas que los protegen del medio. La exterior es el vitelo que en *T. solium* es muy fina y la constituyen un grupo de células que forman un sincicio. La media es el embrióforo que es una cubierta gruesa, generalmente de color pardo oscuro formada por bloques proteicos unidos por una molécula cementante. Debido a su grosor es la que aporta la mayor protección a la oncosfera, además de ser estriada y dar una apariencia rugosa que es característica de estos huevos. La membrana interior es la oncosferal y rodea al embrión hexacanto que tiene tres pares de ganchos. La larva se puede observar fácilmente en los huevos vivos, pero es frecuente que se frunza y opaque en el material con que se preservan.

#### I.1.4 Sintomatología

Generalmente el gusano adulto no produce molestias en los pacientes. Algunos se quejan de hambre, indigestión crónica y molestias abdominales vagas pero la mayoría de las veces las quejas provienen de pacientes que se saben parasitados. Hay eosinofilia moderada.

### I.1.5 Tratamiento

La administración de praziquantel, albendazol, niclosamida y clorhidrato de quinacrina resulta eficaz en la eliminación del parásito adulto.

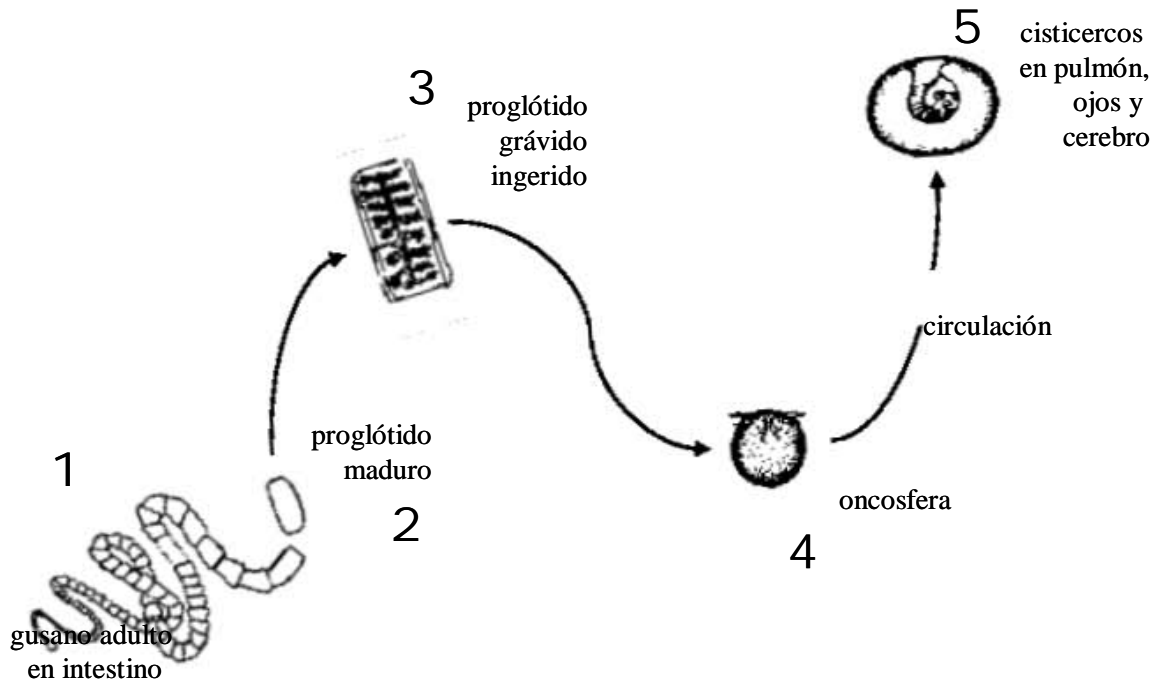
### I.1.6 Cisticerco

Es la larva o metacéstodo de *T. solium*. Tiene la forma de una vesícula ovalada y translúcida llena de fluido hialino. Forma una membrana germinativa alrededor del escólex invaginado. El escólex ya contiene cuatro ventosas y un rostelo armado, tal como el gusano adulto. Al ser ingeridos por el humano, la bilis, las enzimas y el pH del tubo digestivo activan el escólex y éste evagina y se adhiere a la pared intestinal.

Las tenias carecen de sistema digestivo y se nutren por la absorción de nutrientes directamente del intestino del huésped a través de su estructura externa o tegumento. La estructura tegumental está cubierta por diminutas proyecciones similares a los micro vellos presentes en las células de la mucosa intestinal y cubren por completo la superficie del gusano, incluyendo las ventosas.

### I.1.7 Cisticercosis en Humanos

La mayoría de los casos de cisticercosis humana ocurren por contaminación fecal de agua y alimentos, por riego de vegetales con aguas residuales y manejo poco higiénico de alimentos por personas infectadas (Dooley, 1980)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>.



**Figura 2: Cisticercosis en Humanos.** El gusano adulto se desarrolla en el intestino del humano (2.1). Los proglótidos se van desplazando a lo largo del cuello conforme van madurando (2.2). Los proglótidos grávidos liberados a través de las heces pueden ser ingeridos por el mismo u otro huésped humano al haber malas condiciones higiénicas (2.3). Las oncosferas son activadas por los compuestos digestivos del humano (2.4). ) Las oncosferas penetran la pared intestinal del humano y alcanzan capilares que los distribuyen por todo el organismo (2.5).

Se especula la posibilidad de que un proglótido grávido llegue a migrar del intestino delgado al estómago, posteriormente al duodeno debido a la peristalsis reversa y ahí eclosionen las oncosferas y penetren directamente por la pared intestinal (Villanueva y cols. 2004)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>. Por estos motivos, la teniosis es peligrosa (a pesar de que rara vez produce molestias) tanto para el huésped humano como para los que tienen contacto con él, por lo que es indispensable tratar la enfermedad en cuanto se detecta, así como dar un tratamiento eficaz para disminuir el peristaltismo en sentido contrario tanto como sea posible. La liberación y eclosión de muchos huevos simultáneamente resulta en infecciones masivas por cisticercos.

Prácticamente todos los órganos y tejidos humanos son susceptibles al alojamiento de cisticercos, ocurriendo con mayor frecuencia en los tejidos conectivos subcutáneos. El segundo lugar más común son los ojos, seguidos por el cerebro, músculos, corazón, hígado, pulmón y colon. El efecto que los cisticercos produzcan en el humano depende de su localización. En músculo esquelético, hígado o piel, la reacción es muy leve en caso de haber tal, a menos que la infección sea masiva.

Alrededor del metacéstodo, el huésped forma una cápsula fibrosa, excepto cuando éste se aloja en las cámaras oculares. La cisticercosis ocular puede resultar en daño irreversible en la córnea, iris, uvea o coroides. El desarrollo de un cisticerco en la retina puede ser confundido con un tumor maligno, repercutiendo en la extracción quirúrgica innecesaria del ojo. Por lo general, la extirpación del cisticerco por cirugía simple es suficiente.

Cuando un cisticerco muere suscita una reacción inflamatoria severa por parte del huésped, en muchos casos fatal, sobre todo si sucede en el cerebro. También suele ocurrir la calcificación del metacéstodo como reacción celular al parásito. De ocurrir en el ojo es poco común que se corrija con cirugía.

Rara vez prolifera un cisticerco de *T. solium* desarrollando extensiones ramificadas y destruyendo así más tejidos del huésped. Este caso es muy peligroso y algunas veces puede ser corregido por cirugía.

## **I.2 Neurocisticercosis**

Aunque es común en las zonas endémicas para teniosis, la cisticercosis es considerada como una forma benigna de la enfermedad, a pesar de la presencia de metacéstodos en músculo y la inflamación local que ésta genera, ya que frecuentemente involuciona de manera espontánea. La neurocisticercosis es la forma más dañina del padecimiento, ya que



consiste en el alojamiento de metacéstodos en el sistema nervioso central, y se puede confundir prácticamente con cualquier patología de éste. Menos común que la afección del SNC es la infestación de cisticercos en la médula espinal (Berman y cols. 1981)<sup>iError! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>

### I.2.1 Evolución de la Enfermedad

Se presenta indistintamente del género, aunque entre los 30 y 40 años de vida es mayor su incidencia.

En la primera etapa de la cisticercosis, el metacéstodo tiene forma vesicular y la membrana es transparente y delgada. La larva invaginada es de aspecto normal y el líquido en que se encuentra es claro. Hay poca reacción inflamatoria alrededor del cisticerco (Schmidt y cols.)<sup>iError! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> La siguiente etapa es vesicular coloidal. La membrana es más gruesa, la larva inconsistente y el líquido turbio. Hay infiltración de células plasmáticas, eosinófilos y linfocitos y se produce una cápsula de tejido conectivo alrededor del cisticerco. También se presenta gliosis moderada, infiltrado inflamatorio, necrobiosis neuronal, hipervascularización en el parénquima cerebral adyacente y signos de edema tisular (Ramírez, 1998)<sup>iError! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> Posteriormente, en la etapa granular tisular el tamaño de la vesícula disminuye y todo su contenido se vuelve semisólido. Entre la membrana vesicular de la larva y la cápsula conectiva del huésped se forman depósitos de infiltrado inflamatorio, que ocasionan que el parásito se desprenda del tejido nervioso adyacente. El infiltrado penetra a la larva, la membrana vesicular se hialiniza y esto la afecta. Existe depósito de sales de calcio en la membrana y en la larva. Finalmente ocurre la etapa nodular calcificada, en la que el parásito ya calcificado se

solidifica y se convierte en un nódulo. Ahora lo rodea una cápsula densa de tejido conectivo, así como células gigantes de cuerpo extraño y macrófagos.

### I.2.2 Patología

No hay una patología definida, ya que cambia mucho dependiendo de los siguientes elementos:

- El tamaño del inóculo parasitario, que puede variar de un cisticerco a muchos en caso de infestación masiva.
- La respuesta inmunológica del huésped ante esta invasión va desde la tolerancia al parásito a una respuesta inflamatoria severa y edema.
- El estado de evolución de las lesiones ya sea metacéstodos vivos, presencia de edema y exudados inflamatorios, calcificaciones, granulomas y fibrosis residuales.
- La localización de los parásitos en espina, espacio subaracnoideo, parénquima cerebral o cavidades ventriculares.

La combinación de estos factores resulta en diversas formas clínicas difíciles de interpretar sin un estudio minucioso de cada caso particular ya que los síntomas resultan vagos. Anteriormente, el diagnóstico adecuado solía ser post mortem.

La presión por necrosis puede causar daño severo al sistema nervioso central, ceguera, pérdida del equilibrio, hidrocefalia obstructiva, desorientación o parálisis. La epilepsia de brote espontáneo es la manifestación más común, de manera que al ocurrir en pacientes adultos sin historial infantil o antecedentes familiares de epilepsia la principal sospecha debería ser neurocisticercosis. (Medina y cols, 1990, Díaz-Camacho y cols. 1991, García y cols, 1993, García y cols, 1997) *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia., ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*

En un tercio de los casos de neurocisticercosis hay manifestaciones clínicas como mareo, vértigo, dolor de cabeza, deterioro intelectual, perturbaciones psiquiátricas o ataques parciales aún cuando el examen neurológico es normal. La neurocisticercosis tiene las siguientes variantes.

- Neurocisticercosis Espinal: Un solo cisticerco basta para producir patología. Sus manifestaciones son inespecíficas y frecuentemente llega a ser confundida con desórdenes degenerativos y tumores espinales. Para hacer un diagnóstico correcto se deben hacer mielografía, tomografía computarizada, así como análisis de líquido cefalorraquídeo ya que la información clínica es insuficiente.
- Neurocisticercosis Intraventricular: Se presenta por invasión del sistema ventricular. Hay obstrucción de la circulación del líquido cefalorraquídeo y como consecuencia se presenta hidrocefalia.
- Neurocisticercosis Parenquimal: Sucede cuando uno o varios parásitos se albergan en cualquier área del cerebro, principalmente en las que tienen alta presencia vascular. El diagnóstico se debe hacer con tomografía computarizada como complemento del análisis del líquido cefalorraquídeo, ya que en algunas ocasiones el último resulta normal. Los síntomas clínicos son muy diversos, como déficits neurológicos focales, perturbaciones mentales, ataques o deterioro intelectual. Antes de decidir un tratamiento se deben tomar en cuenta el grado de respuesta inmune contra el parásito, la viabilidad de los cisticercos, su distribución y la cantidad de ellos.
- Neurocisticercosis Subaracnoidea: Produce la inflamación de la aracnoides. Generalmente se presenta hidrocefalia como consecuencia de una oclusión inflamatoria. También puede haber infartos cerebrales múltiples; atrofia óptica y defectos en el

campo visual. Estos síntomas se confunden con los de un tumor y son inducidos por cúmulos de cisticercos. Normalmente hay reacciones inmunológicas positivas a cisticercosis y cambios inflamatorios en el fluido cerebroespinal.

### I.2.3 Diagnóstico

Aunque los estudios radiológicos son de utilidad en el diagnóstico de esta enfermedad (Correa D. y cols. 1989)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> Actualmente se utilizan complementados por métodos inmunes para confirmar la etiología de la enfermedad del paciente y han sido sustituidos por la tomografía computarizada y la resonancia magnética nuclear (RMN).

La tomografía axial computarizada (TAC) es un método para obtener imágenes corporales en el cual un haz de rayos X rota alrededor del paciente y unos pequeños detectores miden la cantidad de rayos que penetran en el área particular de interés. Los datos son analizados en una computadora para construir una imagen de corte transversal. Estas imágenes se pueden almacenar, visualizar en un monitor o imprimir en una película. Además, se pueden crear modelos tridimensionales de órganos reuniendo las imágenes individuales o "cortes".

La resonancia magnética nuclear es un procedimiento de diagnóstico que utiliza una combinación de imanes grandes, radiofrecuencias y una computadora para producir imágenes detalladas de los órganos y las estructuras dentro del cuerpo.

En la RMN se crea un fuerte campo magnético alrededor del paciente. Este campo magnético, junto con una radiofrecuencia, altera el alineamiento natural de los átomos de hidrógeno en el organismo. Posteriormente se usan computadoras para formar imágenes bidimensionales de la estructura del cerebro basándose en la actividad de los átomos de

hidrógeno. Para detectar más detalles, se pueden obtener vistas transversales. La RMN no utiliza radiación, como las radiografías o la tomografía computarizada.

Existen varios tipos de pruebas inmunológicas para diagnosticar la neurocisticercosis. La prueba de fijación del complemento (Morrison y cols. 1984)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, no es específica con el suero del paciente, por lo que sólo se utiliza el líquido cefalorraquídeo. Además es complicada ya que los reactivos se deben estandarizar frecuentemente.

La inmunoelectroforesis (IEF) se basa en la separación de los componentes protéicos de la muestra según su carga eléctrica. Posteriormente se realiza una reacción con anticuerpos en un medio semisólido, identificando cada reacción antígeno-anticuerpo por la formación de un arco al precipitarse el complejo. Es una técnica sencilla que emplea un extracto crudo de cisticercos y se presentan reacciones cruzadas, sin embargo es de baja sensibilidad por lo que no se puede utilizar con líquido cefalorraquídeo y sólo es positiva en un 44% de los pacientes con neurocisticercosis.

La técnica de PCR sirve para la detección de los parásitos utilizando una pequeña muestra y amplificando secuencias específicas de material genético para cada especie (Felleisen y cols. 1996)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>. Es un procedimiento muy sensible, pero es caro y las muestras se contaminan fácilmente.

La prueba de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) es muy utilizada, ya que se pueden estudiar tanto extractos crudos o antígenos purificados presentando una sensibilidad y especificidad muy parecida en ambos casos y permite distinguir claramente los pacientes con neurocisticercosis de los que presentan otras patologías neurológicas, además que su sensibilidad no decae con muestras congeladas (Baily y cols.1988)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>. También detecta anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo, incluso más

eficazmente que en el suero (Rodríguez del Rosal y cols. 1989)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>. Desafortunadamente presenta reacciones cruzadas con otros parásitos, por lo que su uso para valorar muestras de población abierta no es indicado (Espinoza B. y cols. 1986)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> aunque en esto hay discrepancia al respecto, ya que Nascimento y cols. (1987)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, reportan que esto se evita utilizando muestras más diluidas.

La inmunoelectrotransferencia o western blot mantiene la sensibilidad del ELISA sin presentar reacciones cruzadas. Se purifica el extracto crudo de cisticercos por cromatografía con lentil lecitina para obtener una fracción enriquecida de glicoproteínas. Éstas son separadas por electroforesis en poliacrilamida y posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Se cortan los carriles en una o más tiras y éstas se incuban con una muestra de líquido cefalorraquídeo o suero. Posteriormente se revelan de manera similar al ELISA y se obtienen de una a siete bandas específicas para la neurocisticercosis humana. Debido a su sensibilidad cercana al 100%, esta técnica es la más recomendada para el diagnóstico de la neurocisticercosis. Aunque otros autores recomiendan utilizar la prueba de ELISA para el estudio de sueros y confirmar los resultados por inmunoprecipitación (Bueno y cols. 2000)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>.

#### I.2.4 Tratamiento

Anteriormente las únicas opciones para tratar este padecimiento eran la cirugía o la administración de esteroides para controlar la reacción inflamatoria.

En 1984 dos grupos (Markwalder y cols.; Sotelo y cols.)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, <sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> reportan que el tratamiento con praziquantel, una isoquinolona es útil en el tratamiento de la neurocisticercosis. Con albendazol se

obtiene un 97% de reducción en el número de quistes de los pacientes (Escobedo y cols. 1988)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> y también se utiliza como tratamiento contra la enfermedad (García y cols. 1997) <sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

### **I.3 Antígeno B**

En los estudios inmunológicos de los sueros de los pacientes con neurocisticercosis se han encontrado inmunoglobulinas de todos los tipos que reaccionan con hasta ocho tipos diferentes de antígenos del cisticerco, siendo el antígeno B el más frecuente (Flisser y cols. 1980)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> La reactividad con anticuerpos IgG es detectada más comúnmente en el fluido cefalorraquídeo que en el suero.

El antígeno B o Ag B es la paramiosina de *T. solium*.; una proteína de 863 aminoácidos, de estructura alfa hélice, con estructuras lineares cortas a ambos extremos. Tiene un peso molecular de 95 kDa y originalmente fue purificada por su afinidad a la colágena (Guerra y cols. 1982)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

Ag B es inmunodominante ya que la mayoría de los pacientes presenta anticuerpos contra esta proteína (Flisser y cols. 1980)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, es un producto de la secreción del parásito (Laclette y cols. 1987)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, tiene propiedades similares a la fibronectina (Plancarte y cols. 1983)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> y se ha reportado que inhibe la cascada del complemento (Laclette y cols. 1992)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

Correa y cols. (1985)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> sugieren que, los parásitos vivos se enmascaran a sí mismos con las inmunoglobulinas del enfermo y se piensa que el Ag B pueda actuar como un camuflaje al ser secretado y como tiene afinidad por la colágena se une a ésta e induce una respuesta inflamatoria inmune fuerte lejos del parásito.

Estas características y la semejanza en su secuencia de aminoácidos (75%) son similares a las de la paramiosina de *Schistosoma mansoni* (Laclette y cols. 1990)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>

La capacidad de la paramiosina de *S. mansoni* para unirse a Fc (Loukas y cols. 2001)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> ha sugerido que tiene actividades inmunomoduladoras.

Se ha reportado, (Parizade y cols. 1994)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> que las larvas de *Schistosoma* en pulmón, así como los gusanos adultos expresan en sus superficies un inhibidor del complemento. Esta molécula tiene características similares a las de CD59 del humano, una glicoproteína de membrana expresada en la mayoría de los tejidos de los vertebrados (Davies y cols. 1989, 1993)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.,Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>, que protege a las células homólogas contra el daño del complemento, inhibiendo el ensamble del complejo de ataque a membrana (MAC) (Meri y cols. 1990, Rollins y cols. 1991)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.,Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>

Se han descrito (Deng, y cols. 2003)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> datos de secuenciación y de unión específica a un anticuerpo que indican que el inhibidor de complemento antes mencionado es una forma tegumental de paramiosina. Estos datos prueban que la paramiosina se une in vitro a proteínas del complemento e inhibe la formación de MAC. Esta proteína se ha usado en sistemas experimentales como una potente vacuna molecular con *S. mansoni* y *S. japonicum* (Lanar y cols. 1986, Ramírez y cols 1996)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.,Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> y se encuentra en investigación como candidata de vacuna contra la esquistosomiasis en humanos (Bergquist y cols, 2002)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>

Estos resultados extienden el rango del potencial de actividad inmunomoduladora de esta proteína por lo que la paramiosina de *T. solium* también puede ser una buena alternativa



para producir una vacuna contra este parásito (Laclette y cols. 1991)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

Ag B como proteína total es muy grande y compleja, para ser usada como vacuna. Además, sus propiedades inmunológicas son diferentes a lo largo de la molécula. Algunos sitios son inmunogénicos, otros pueden silenciar la inmunogenicidad de la proteína o ser inmunomoduladores. Para resolver este problema y utilizar como vacuna sólo las partes con actividad protectora fue necesario localizar los epítomos en diferentes dominios de la proteína.

El problema que impedía la realización de este potencial era la falta de información sobre los sitios inmunogénicos de la proteína y la abundancia de ellos en diferentes partes de ésta. Hasta el momento del inicio de este trabajo ningún epítomo de Ag B había sido descubierto ni localizado. Además no existían anticuerpos monoclonales que pudiesen ser utilizados para localizar sus epítomos, ni identificar sus potenciales neutralizaciones.

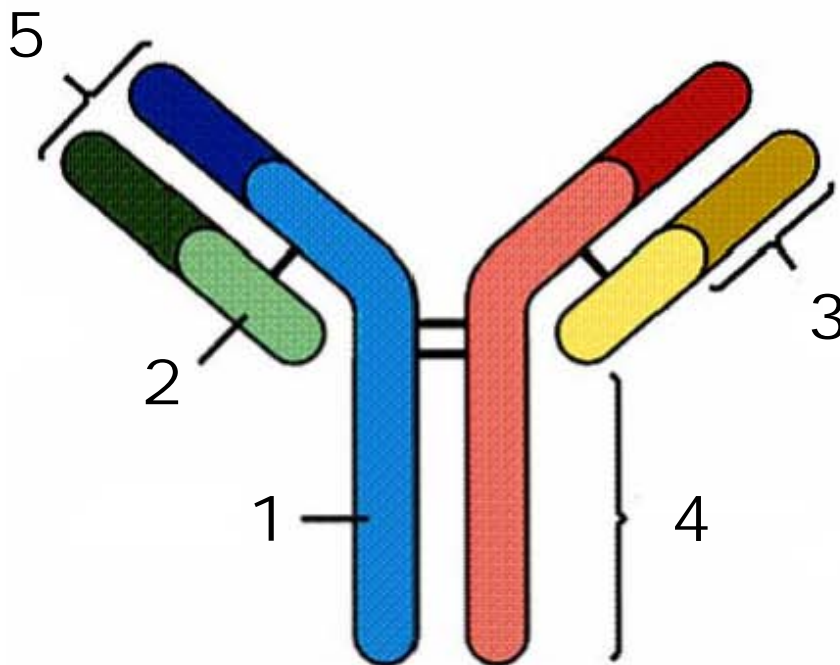
Para resolver este problema se utilizaron anticuerpos del suero de conejo inmunizado con un péptido sintético de 20 aminoácidos del extremo amino terminal de Ag B; y se utilizó el método de phage display para localizar cuales son los aminoácidos más inmunogénicos de este sitio, y que forman la fracción importante del epítomo.

#### **I.4 Anticuerpos**

Las sustancias ajenas al organismo (virus, bacterias y otros agentes infecciosos) llamados antígenos son reconocidos por el sistema inmunológico como extraños. Las defensas naturales contra éstos son los anticuerpos; que son proteínas plasmáticas de la familia de las inmunoglobulinas. Son producidos por los linfocitos B, tienen la capacidad de unirse específicamente a los determinantes antigénicos o epítomos de los antígenos, así como la de

discriminar entre epítomos muy similares entre sí. Una vez unidos a los epítomos correspondientes, reclutan a otras células y moléculas del sistema inmunológico para destruir a los antígenos. Estas funciones están separadas estructuralmente en la molécula del anticuerpo.

Una fracción del anticuerpo reconoce específicamente al epítomo y se denomina región variable Fab ya que cambia extensamente entre las moléculas de anticuerpos. La variabilidad de esta región permite a cada anticuerpo reconocer un antígeno en particular. El repertorio total de estas moléculas en cada individuo es tan amplio como para asegurar que prácticamente cualquier estructura pueda ser reconocida por un anticuerpo.



**Figura 3: Estructura de un Anticuerpo.** Los anticuerpos son formados por 4 cadenas, 2 cadenas pesadas (3.1) y 2 cadenas ligeras (3.2), que a su vez se componen de una región variable (3.3) y una región constante (3.4). El sitio donde se unen dos regiones variables se denomina paratopo (3.5) y es la parte que reconoce a los epítomos.

La otra fracción recluta los mecanismos efectores que se deshacen del antígeno. Esta región no varía de la misma manera que la región V y por eso se denomina región constante o Fc

sólo se presenta en 5 distintas formas principales o isotipos, especializados en activar diversas clases de mecanismos efectores en el organismo.

Los linfocitos B producen un anticuerpo con especificidad diferente en cada caso, pero no lo secretan hasta ser activados por un antígeno determinado. Puede haber diferentes anticuerpos con sitios de unión al mismo antígeno, entonces, al entrar al organismo, puede estimular la proliferación de diferentes clonas de linfocitos con la secreción de sus respectivos anticuerpos.

Los anticuerpos tienen dos características principales de gran utilidad para la investigación: la elevada especificidad que les permite reconocer sólo determinadas secuencias o configuraciones del antígeno, así como la capacidad de reconocer prácticamente cualquier epítipo; y la habilidad de algunos anticuerpos para conferir resistencia contra la enfermedad, una vez que son activados por un antígeno. Es esta segunda característica la que hace posible el desarrollo de las vacunas.

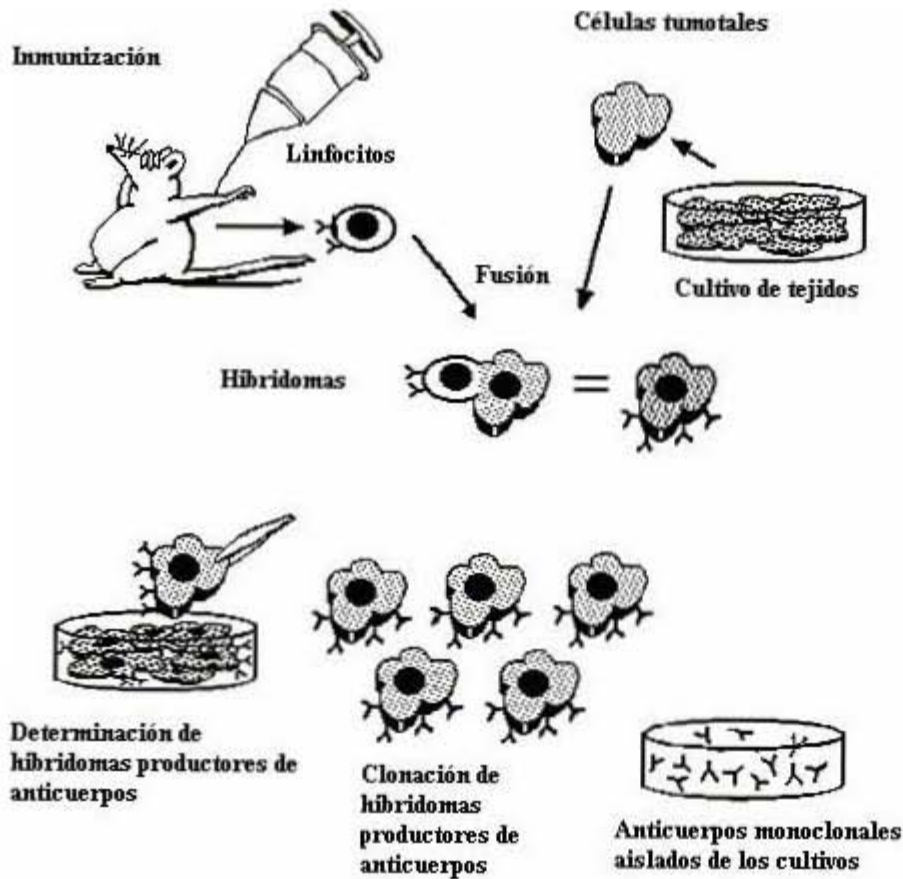
### **I.5 Anticuerpos Monoclonales**

Debido a la diversidad de su uso, la investigación científica se ha enfocado a la producción de grandes cantidades de anticuerpos puros. El método tradicional es inyectar animales de laboratorio con un cierto antígeno y cuando los anticuerpos se forman, se colectan a partir del suero de la sangre. El suero sanguíneo con los anticuerpos generados se denomina antisuero. Las desventajas de este procedimiento son que el antisuero obtenido contiene una gran cantidad de sustancias no deseadas, así como varios anticuerpos de diferentes isotipos que reconocen al mismo antígeno con distinta afinidad (antisuero policlonal); y al purificarse los anticuerpos deseados, se obtienen en cantidades muy pequeñas.

La producción de anticuerpos monoclonales surge de la necesidad de obtener sólo un tipo de anticuerpos que reconozcan al antígeno deseado con la misma afinidad.

Con la tecnología de los anticuerpos monoclonales se pueden obtener grandes cantidades del anticuerpo puro.

Un linfocito B como cualquier otra célula puede convertirse en canceroso. La proliferación sin control de estas células se denomina mieloma. En 1975 Köhler y Milstein *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* consiguieron combinar el potencial de crecimiento ilimitado de las células del mieloma con la especificidad predeterminada para producir anticuerpos de un linfocito B normal. Esto se logró fusionando células de mieloma con linfocitos de ratones previamente inmunizados. Esta técnica se conoce como hibridación de células somáticas y el resultado es un hibridoma.



**Figura 4: Descripción Esquemática de la Producción de Anticuerpos Monoclonales.** El ratón es inmunizado contra el antígeno deseado. Posteriormente se extrae el antisuero que produce los anticuerpos deseados. Los linfocitos obtenidos del ratón se fusionan en cultivo con células tumorales de mieloma, produciendo hibridomas. Los hibridomas son diluidos de manera que al ser cultivados quede máximo uno por pozo de cultivo, y son puestos en un medio adecuado para que sólo las células bien fusionadas sobrevivan. Los hibridomas que resisten el cultivo son cultivados para su proliferación. Del sobrenadante del cultivo de estos hibridomas se obtienen anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos se denominan monoclonales porque parten de un solo linfocito con la capacidad de producir sólo un tipo de anticuerpo contra el antígeno, contrario a los anticuerpos producidos por métodos tradicionales, cuyos anticuerpos parten de un número variable de linfocitos productores de diferentes anticuerpos contra el mismo antígeno.

Los hibridomas deben perder la función de producir anticuerpos por sí mismos para no tener un hibridoma que produzca dos distintos tipos de anticuerpos, uno de ellos contra un antígeno desconocido o de nula importancia para el objetivo deseado.

Una gran ventaja de utilizar anticuerpos monoclonales en lugar de antisueros policlonales es la potencial disponibilidad de cantidades prácticamente ilimitadas de un anticuerpo monoclonal específico dirigido contra un epítipo único. Generalmente, los anticuerpos monoclonales son obtenidos ya sea del sobrenadante de los cultivos de los hibridomas o del fluido ascítico de un ratón inoculado con el hibridoma. A partir de ambas fuentes los anticuerpos monoclonales pueden ser purificados pero frecuentemente se utilizan directamente del sobrenadante del cultivo o del fluido ascítico.

Antes de la producción de hibridomas, los investigadores sólo podían utilizar anticuerpos de sueros policlonales. Esto requería grandes cantidades de animales inmunizados y no era inmortalizada la línea celular productora de anticuerpos, de manera que se tenía que inmunizar animales cada vez que se requerían más anticuerpos. El desarrollo de la tecnología de los hibridomas redujo el número de animales utilizados para la producción de anticuerpos, pero con detrimento de su bienestar, en el caso del uso del método de las ascitis. Los anticuerpos monoclonales son muy utilizados como reactivos de diagnóstico e investigación, pero su introducción a la terapia en humanos ha sido muy lenta. En algunas aplicaciones *in vivo*, la administración del anticuerpo en sí, es suficiente y una vez unido a su blanco detona los mecanismos efectores normales del organismo. En otros casos, el anticuerpo es acoplado a otra molécula, ya sea una fluorescente útil para estudios de imagen o un isótopo radiactivo fuerte como  $^{131}\text{I}$  que destruya al blanco una vez unido a éste.

La inmunoterapia con anticuerpos monoclonales presenta algunos problemas, ya que a los producidos en ratón, el sistema inmunológico humano los reconoce como agentes extraños y el paciente monta una respuesta conocida como HAMA (human anti-mouse antibody) (Khazaeli y cols. 1994)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> que no sólo ocasiona la rápida eliminación de los anticuerpos terapéuticos por el huésped, si no también la formación de complejos inmunes que causan daño a los riñones.

Este problema se ha enfocado de dos formas distintas:

- La producción de anticuerpos quiméricos, en los que las regiones variables (sitios de unión al antígeno) del ratón son unidas a las regiones constantes (partes efectoras) de los anticuerpos de humanos por ingeniería genética (Boulianne y cols. 1984. Morrison y cols. 1984)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup><sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>. Pero también se han observado respuestas contra los anticuerpos quiméricos (Bell y cols. 2000)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> (HACAs human anti-chimeric antibody response).
- La producción de anticuerpos “humanizados”, en los que los aminoácidos responsables de formar el sitio de unión al antígeno son insertados en una molécula de anticuerpo humana, reemplazando las regiones hipervariables de éstos (Better y cols. 1988., Sioud, 1994)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup><sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> que pueden ser exitosamente expresados en *E. coli*.

Hay otros experimentos en los que se utilizan ratones transgénicos con los loci de anticuerpos humanos insertados por métodos de células embrionarias primordiales y en los

que se han eliminado los propios genes de producción de anticuerpos (Green y cols. 1999)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

Estos ratones pueden ser inmunizados con el antígeno deseado y producir anticuerpos humanos contra este antígeno. Al ser fusionados los linfocitos B de estos animales con células de mieloma se producirán anticuerpos monoclonales humanos.

Los anticuerpos monoclonales son herramientas del sistema inmunológico de excepcional pureza y especificidad capaces de unirse al antígeno contra el cual fueron creados. Entre sus aplicaciones están: medir niveles séricos de proteínas y drogas, identificar agentes infecciosos, identificación de bloques de diferenciación para la clasificación y concomitante terapia de leucemias y linfomas, identificación de antígenos tumorales y auto-anticuerpos, identificación de células específicas involucradas en la respuesta inmunológica, así como la identificación y cuantificación de hormonas.

Los anticuerpos monoclonales, al ser más puros que los obtenidos por el antisero policlonal, son potencialmente más efectivos que las drogas convencionales para tratar ciertas enfermedades, ya que estas sustancias no discriminan entre los agentes extraños al organismo y las propias células, produciendo a veces efectos secundarios no deseados como náusea o reacciones alérgicas. Los anticuerpos monoclonales sólo atacan la molécula blanco contra la que fueron obtenidos, sin mayores efectos secundarios. Así mismo, al tener sólo un anticuerpo que reconoce un antígeno, es más fácil obtener características de su blanco, ya sea por cristalografía o secuenciación (Chang y cols. 2005)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>



La producción de anticuerpos monoclonales es muy costosa ya que se utilizan líneas celulares especiales, cuartos de cultivo con múltiples especificaciones, y un gran número de animales, entre otros requerimientos.

## **I.6 Péptidos Sintéticos**

Los péptidos constituyen una clase de moléculas de creciente importancia para la química médica y la bioquímica. Muchas hormonas, neurotransmisores, citocinas y factores secretados son péptidos. Gracias a las técnicas de síntesis automatizada es posible obtener hoy día grandes cantidades de péptidos y sus derivados.

### **I.6.1 Péptidos Sintéticos para producir Anticuerpos**

La generación de anticuerpos monoclonales en la investigación biomédica se dificulta frecuentemente por la falta de antígenos apropiados. La síntesis de péptidos basada en la secuencia de DNA puede ser una opción viable.

Esta aproximación ha resultado en anticuerpos dirigidos contra proteínas tóxicas, dominios seleccionados de ciertas proteínas, variantes de las proteínas originales que difieren en un solo aminoácido y proteínas que no pueden ser purificadas en cantidades sustanciales.

De esta manera surgen procesos para obtener anticuerpos poli y monoclonales adecuados: selección de epítomos, síntesis de péptidos, construcción de péptidos conjugados para inmunización, desarrollo de ensayos de selección (WB, ELISA, histoquímica) y selección de anticuerpos monoclonales de alta afinidad.

Es posible obtener anticuerpos contra regiones específicas de proteínas inmunizando animales con péptidos sintéticos. Diversos péptidos tienen actividad hormonal (vasopresina, calcitocina, ACTH) y hay péptidos que actúan como inhibidores de enzimas

(proteasas de HIV), existiendo así un nuevo potencial de aplicaciones en el campo terapéutico

#### 1.6.2. Síntesis de Péptidos en Microorganismos a Gran Escala.

Para varias aplicaciones nuevas, la disponibilidad de grandes cantidades de péptidos a bajo costo es esencial. La producción microbiana de péptidos puede ser una alternativa atractiva para la producción sintética.

#### 1.6.3 Uso de Péptidos Sintéticos como Inmunógenos

El uso de péptidos sintéticos como inmunógenos, ha resultado una ruta importante para la producción de anticuerpos contra proteínas no caracterizadas previamente. Una vez que la secuencia de oligonucleótidos de un gene es determinada, la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por éste puede ser predicha. Los péptidos seleccionados de esta secuencia pueden ser utilizados para crear anticuerpos con el potencial de presentar reactividad cruzada con la proteína nativa. Muchos anticuerpos se han creado por primera vez de esta manera.

La producción de anticuerpos contra péptidos sintéticos tiene muchas ventajas sobre otros métodos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser creados contra áreas específicas de alguna proteína como sonda bioquímica de su función o para bloquear su actividad biológica normal. También se pueden producir anticuerpos contra péptidos cuya secuencia es conservada entre proteínas de la misma familia o cercanamente relacionadas o emparentadas para producir sustancias pan-reactivas. De la misma manera se pueden

generar anticuerpos específicos contra miembros de la misma familia de proteínas por la selección cuidadosa de una secuencia de aminoácidos única para ésta.

En 1997 Tani y cols.<sup>*¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, utilizaron este procedimiento para demostrar la reactividad cruzada de los anticuerpos contra péptidos sintéticos y las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* con los antígenos de espondilitis anquilosante y artritis reumatoide, respectivamente. En el mismo año, Oshima y cols.<sup>*¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> propusieron unos péptidos sintéticos derivados de la neurotoxina botulínica para conferir inmunidad contra las toxinas de los clostridios.

Al ser los hibridomas el producto de la fusión de una célula de mieloma y de un linfocito, algunos hibridomas de ciertos anticuerpos con actividades antitumorales son inestables por lo que la producción de péptidos sintéticos para producir estos anticuerpos suele resolver este problema (Hammond y cols. 2000)<sup>*¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>.

Se ha demostrado por ensayos de competencia de anticuerpos que fagos seleccionados con las secuencias clave, compiten con los anticuerpos policlonales generados contra el virus de la enfermedad de Newcastle en los sitios de unión al mismo (Ramanujam y cols. 2002)<sup>*¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>.

En el caso del síndrome de Goodpasture la mayoría de los péptidos sintéticos obtenidos produjeron una reacción inmunológica contra ellos mismos exclusivamente y no contra el epítipo de Goodpasture (Luo y cols. 2002)<sup>*¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, de ahí la importancia de seleccionar al péptido antigénico correctamente, de manera de inducir anticuerpos capaces de unirse al péptido dentro de la secuencia de la proteína nativa. Es decir, determinar que péptidos es posible que se encuentren en la superficie de la proteína

configurada tridimensionalmente con potencial antigénico y que conserven esa forma en la secuencia natural.

También se han identificado péptidos candidatos a partir de bibliotecas de expresión en fagos capaces de mimetizar el epítipo del anticuerpo monoclonal 1D5 del receptor de estrógeno (ER). Este péptido es capaz de inhibir la unión de ER1D5 al receptor nativo, sugiriendo unión al anticuerpo cerca o en el sitio de unión al antígeno (Sompuram, 2002)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

La creación de anticuerpos contra epítipos sintéticos de proteínas nativas genera muchas aplicaciones en bioquímica, biología molecular e inmunología, como el aislamiento y caracterización de proteínas recombinantes y el desarrollo de vacunas.

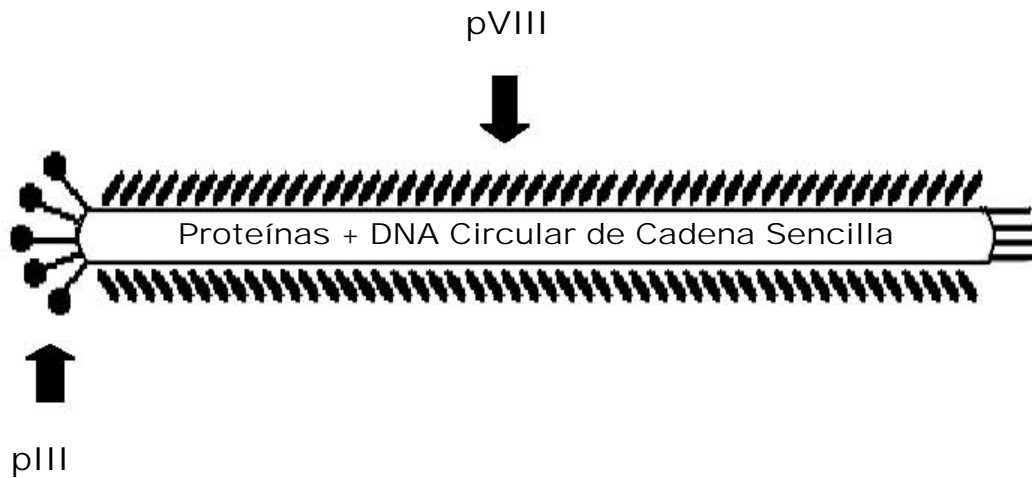
## **I.7 Fago Filamentoso**

### **I.7.1 Características.**

Hay tres distintos tipos de fagos filamentosos fd, f' y M13. Son estructuras fibrilares largas (900 x 6nm) y una cadena sencilla de DNA circular de 6407 nucleótidos que codifica para 10 genes. Al virión lo conforman 2 000 copias de una pequeña proteína de cubierta de 5.2 kDa arreglada en forma de hélice alrededor del genoma del fago y otra proteína de unión de 42 kDa. La hélice tiene una inclinación de 1.5 nm con 9 unidades proteicas cada 2 vueltas y tiene 3.5 nm de espesor.

Estos fagos infectan bacterias F<sup>+</sup> al unirse al pili y son lisogénicos. No inhiben la reproducción del hospedero, sólo alentan el metabolismo de la bacteria.

El virión del fago M13 puede aceptar hasta 40 000 bases extras en su genoma sin que su infectividad sea afectada. Sólo aumenta su tamaño y su replicación es más lenta.



**Figura 5:. Esquema de la Estructura del Fago M13.** El DNA de cadena sencilla se encuentra ensamblado de forma circular en el interior del fago, junto con las proteínas requeridas para su replicación .pVIII es la proteína de cubierta más abundante y es utilizada como vector en algunos sistemas de *Phage Display*. pIII es la otra proteína de cubierta, con 4 ó 5 copias en el fago; también se utiliza como vector para *Phage Display* y el método es mucho más simple que cuando se utiliza pVIII ya que se evitan la inducción de pIII y el uso de un fago ayudador.

### I.7.2 Ciclo de Vida de M13

Cuando la proteína pIII (producto del gen III) se une al pili de *Escherichia coli*, inicia el ciclo infectivo de dicho fago. Esta proteína es adecuada para la expresión en fago (Phage Display) debido a su adaptación para interactuar con estructuras externas.

El extremo C-terminal de pIII está insertado en la cubierta del fago en uno de sus extremos (4 ó 5 copias). El extremo N-terminal es el que se une al pili. Una vez unido el fago es atraído a la superficie de la bacteria. Las proteínas de la cápside se disocian en la membrana citoplásmica del hospedero y el DNA del virus entra en la bacteria. Después de esto, el DNA es convertido por la polimerasa de DNA y demás maquinaria de síntesis de DNA de

la bacteria a la forma replicativa del virión que es una doble cadena de DNA. En este proceso no interviene ninguna proteína codificada por el genoma viral.

La doble cadena de DNA antes mencionada actúa como templado para la replicación, transcripción y síntesis de proteínas. Todos los genes virales se expresan de inmediato.

La proteína producto del gen II efectúa un corte específico en la cadena positiva (+) del DNA de cadena doble y el extremo 3' resultante es elongado al realizarse la síntesis de DNA. La cadena avanza y va siendo desplazada, cuando alcanza el doble de la longitud unitaria es cortada y circularizada para producir una cadena sencilla de DNA idéntica a la del fago que infectó la célula y se conserva la molécula de DNA circular de doble cadena, pero la cadena negativa (-) cada vez se sintetiza de novo y la anterior es circularizada y así sucesivamente.

El gen V produce la proteína pV que es de unión al DNA de cadena sencilla acumulado a lo largo del proceso de ensamblaje, que de hecho inicia con la acumulación de ésta. Su función implica impedir la generación de más DNA en forma replicativa y secuestra el DNA recién sintetizado para movilizarlo hacia la membrana bacteriana donde se ensambla el virus ya maduro al intercambiarse pV por pVIII (producto del gen VIII) que se acumula insertada en la membrana gracias a una colita hidrofóbica que pierde al realizarse el cambio por pV y empezar a cubrirse el DNA. El mismo proceso de sustitución es el que excreta al virus hacia el exterior de la membrana y simultáneamente se agregan los componentes restantes del virus maduro, como pIII y los productos de los genes VI, VII y IX que formarán la punta del extremo del virus maduro.

La competencia entre los productos del gen II (que induce la forma replicativa) y el del gen V (que secuestra el DNA de cadena sencilla para la formación de partículas virales maduras) es lo que controla metabólicamente la producción de los fagos.

## **I.8 Phage Display.**

### **I.8.1 Principios de la Expresión de Péptidos.**

Las técnicas de presentación de péptidos que comprenden la clonación de secuencias manifestadas como péptidos o proteínas fusionadas a un acarreador y expresados en la superficie externa de un microorganismo provienen de métodos basados en la unión física de proteínas y DNA para la clonación de secuencias inmunoreactivas. El DNA de una proteína de tal característica es insertado en el genoma del microorganismo.

Por un proceso de “panning” o purificación por afinidad del péptido expresado en una matriz de anticuerpo inmovilizado o de la proteína de unión correspondiente para el objetivo deseado se obtienen clonas de interés y posteriormente son aisladas.

La inspección de gran cantidad de clonas es posible debido a que esta metodología permite el aislamiento de una manera eficiente y su posterior análisis. La fusión de péptidos y proteínas de cubierta de fagos filamentosos se utiliza en los sistemas más avanzados de expresión de péptidos (“Phage Display”).

Esta metodología emplea pIII (la proteína menor de superficie) como vehículo de expresión (Smith 1985. Parmley y cols. 1988)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup><sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

La mayor utilidad de este método ha sido la creación de grandes bibliotecas de secuencias de péptidos expresados aleatoriamente dentro de la proteína de superficie. También se utilizan fragmentos cortos de ciertas proteínas y péptidos más largos.

### I.8.2 Expresión de Péptidos en Fagos o Phage Display.

Esta técnica facilita el monitoreo de altos números de péptidos. Posterior a la identificación de los péptidos unidos al fago, grandes cantidades de éstos pueden ser sintetizadas para su investigación.

El phage display puede ser aplicado para varios propósitos, tales como la selección de ligandos de alta afinidad, análisis de especificidad para sustratos de proteasas y la identificación de epítomos y mimotomos de anticuerpos. Hay varios reportes recientes de péptidos derivados de colecciones de L-péptidos ensamblados aleatoriamente en vectores de expresión que son antagonistas de alta afinidad, e incluso agonistas de estos receptores. Esto indica que moléculas mucho más pequeñas que los factores proteicos naturales pueden interactuar efectivamente con los receptores y esto puede llevar a descubrir agentes no proteicos aún más pequeños (Dower W. J. 1988)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

Los fagos filamentosos son buenos candidatos para su utilización como vectores de expresión de péptidos ya que están bien caracterizados, la superficie del virión es poco compleja y son fáciles de manejar y propagar.

Por lo general se usan tres variaciones del Phage Display:

En el sistema original se utiliza pIII como proteína de fusión. En este caso, dicha proteína contiene el oligonucleótido clonado insertado en el genoma del fago M13, cerca del extremo 5' del gene III. El oligonucleótido expresa los péptidos codificados en fusión con el extremo N-terminal de pIII que son ensamblados en la superficie de las partículas fágicas, donde se encuentran disponibles para su unión al ligando (receptor, proteína de unión, anticuerpo, etc.). Cada una de las 4 ó 5 copias de pIII contiene una copia del péptido fusionado.



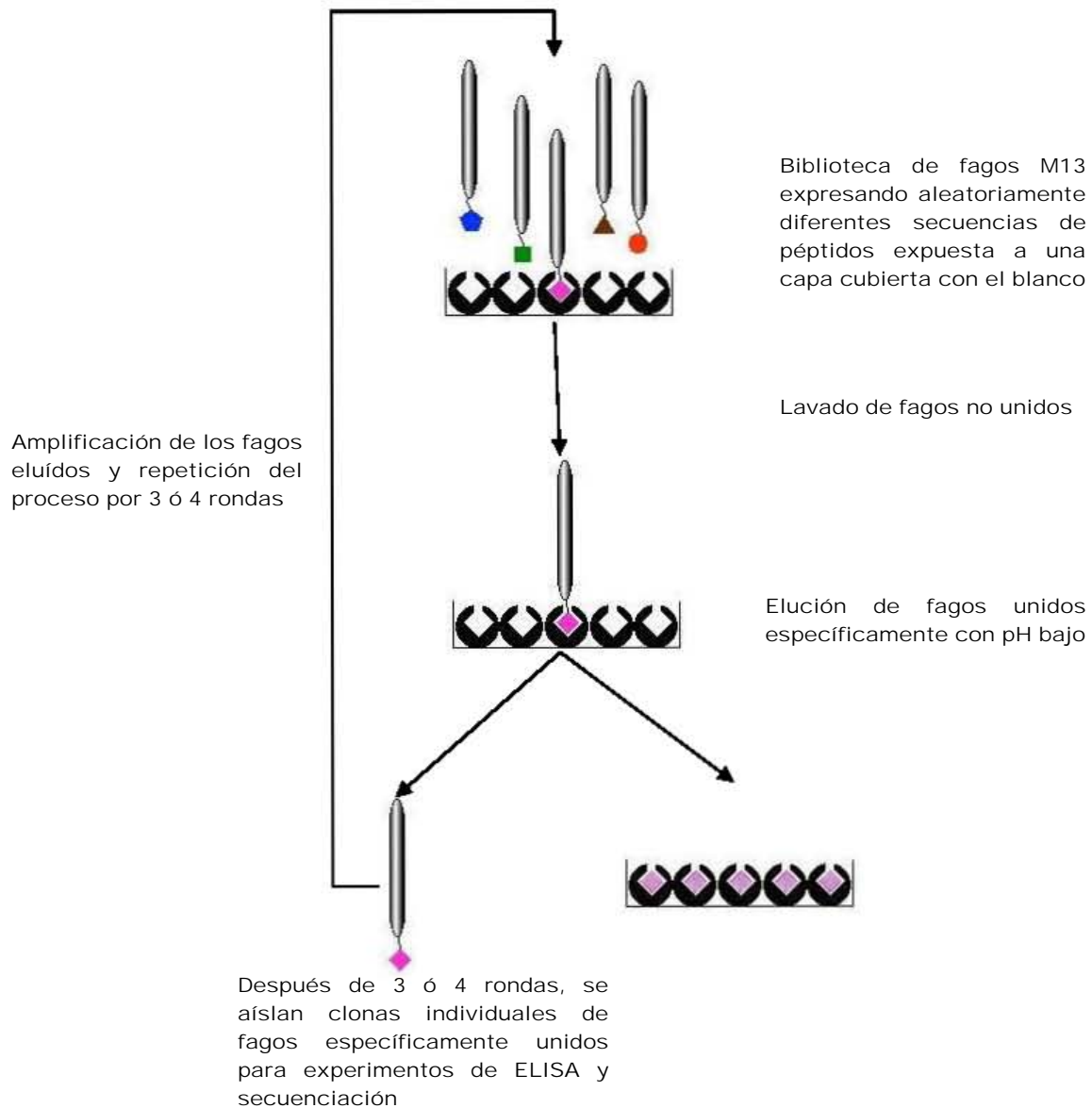
Una variación consiste en la utilización de un vector para fago compuesto por el gene III y los sitios de clonación para oligonucleótidos. Generalmente se reemplaza el promotor para pIII por un promotor inducible que permite su expresión controlada. Un fago ayudador aporta el gene III en su forma silvestre y otros productos que el fago requerirá para su propagación adecuada. El número de péptidos que se expresarán en cada partícula varía de 0 a 5 según el control del número relativo de plásmidos modificados y fagos ayudadores.

En otro sistema más se utiliza la proteína de cubierta pVIII como vector. En este caso, la cantidad de copias del péptido por cada fago es mucho mayor pero el tamaño de los péptidos se limita a seis o menos residuos de aminoácidos. Como en el procedimiento anterior, en éste se utiliza un sistema alternativo con un vector para fago que tiene modificado pVIII además de un fago ayudador con pVIII silvestre. El manejo de este método se complica ya que aunque se pueden expresar péptidos más largos, el número de copias de pVIII modificada es menor por cada fago.

### I.8.3 Phage Display en pIII.

El método más simple es en el que se utiliza pIII como vector. En este sistema se evitan los pasos de inducción de pIII, así como la necesidad de un fago ayudador. Comercialmente se pueden adquirir bibliotecas de pIII que fluctúan entre  $10^8$  y  $10^9$  péptidos diferentes con 6 a 20 residuos de longitud.

Para la fusión del péptido se pueden utilizar dos diferentes sitios de pIII. El extremo N-terminal de la proteína y el espaciador flexible entre los dos dominios de ésta.



**Figura 6: Esquema del Procedimiento de *Phage Display*:** Una biblioteca de fagos M13 que expresa aleatoriamente diferentes secuencias de péptidos en la proteína de cubierta pIII es expuesta a una capa cubierta con el blanco para el que se buscan clones afines. Se hacen lavados para quitar los fagos que no se hayan unido a la molécula deseada. Con una solución de pH bajo se eluyen los fagos que se hayan unido específicamente al antígeno. Los fagos eluidos son amplificados y se repite el proceso por 3 ó 4 rondas más. Finalmente se aíslan aleatoriamente clones individuales de fagos específicamente unidos que hayan sido seleccionados por el número de rondas determinado y se utilizan para ensayos de ELISA para determinar su inmunoreactividad por el antígeno escogido y se hace secuenciación de las diferentes clonas.

La presentación de péptidos con estructura secundaria y terciaria como fragmentos de anticuerpos es posible mediante este procedimiento lo que permite la construcción de

regiones variables de anticuerpos ahorrándose la inmunización o el uso de hibridomas, que además de tardado es más costoso.

El repertorio de genes se obtiene a partir de una población de linfocitos o son ensamblados *in vitro*. Luego se clonan como dominios variables de cadena pesada y ligera asociados en la superficie del fago para su expresión. Las estructuras específicas se localizan por la unión con un antígeno y otras proteínas.

Los péptidos expresados en fagos se pueden aislar por la unión a un anticuerpo biotinilado en solución posteriormente capturado con estreptavidina en fase sólida o por unión directa a anticuerpos en base sólida (Skerra, y cols. 1988)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> o semi sólida. Si los fagos expresan anticuerpos pueden ser aislados por su unión a antígenos biotinilados, en placa de ELISA o columnas de purificación. Los que se inmovilizan en fase sólida pueden ser lavados posteriormente y eluidos o por un hapteno soluble o por ácido o álcali. En una reacción de selección se puede amplificar un fago (aumento del número de clonas con el mismo epítipo) de 20 a 1 000 veces.

#### I.8.4 Mimetismo de Epítipos: Mimotopos.

Se definen como mimotopos a los péptidos capaces de inducir la misma inmunoreactividad que el antígeno real y que no tienen la misma secuencia de aminoácidos (Ramírez, 1998)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia..*</sup>

En 1994 Folgori y cols.<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> seleccionaron mimotopos de 2 diferentes epítipos de una proteína de cubierta virus de hepatitis B humano. Hicieron ensayos inmunológicos con sueros de pacientes enfermos y de pacientes sanos. Demostraron que, sólo el suero de los pacientes enfermos identificó las estructuras

peptídicas específicas contra la enfermedad. De esta manera se puede obtener información del patógeno a partir del sistema inmunológico del individuo en el caso de enfermedades infecciosas.

De estudiarse directamente el patógeno, pueden encontrarse los epítomos reconocidos por el organismo, ya que en el sistema inmunológico los antígenos son procesados y presentados de manera compleja. De este procedimiento se producen anticuerpos contra ciertos epítomos. Los mimotopos obtenidos a partir del Phage Display con el suero de individuos enfermos tendrían la capacidad de inducir la misma respuesta en el sistema inmune, porque fueron seleccionados con los mismos receptores del antígeno original. Esto no implica que sean el mismo antígeno, sólo que tienen un comportamiento similar debido a sus propiedades fisicoquímicas.

En el caso del antígeno de superficie de la hepatitis B resultó que, mimotopos expresados en fagos específicos para éste originaron anticuerpos contra el epitopo original (Meola A. y cols. 1995)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

## I.9 Antecedentes

En un trabajo previo en el mismo laboratorio, (Ramírez, 1988, Gazarian y cols. 2001)<sup>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> se utilizó la técnica del Phage Display en el modelo de la cisticercosis porcina experimental para identificar y caracterizar epítomos inmunoreactivos de *T. solium*.

Se obtuvieron clonas de fagos reconocidas específicamente por los anticuerpos del suero de cerdos infectados artificialmente con huevos de *T. solium*, que posteriormente fueron secuenciadas y comparadas con una base de datos de proteínas de *T. solium* y del antígeno recombinante KETc7 de *T. crassiceps*, debido al alto grado de reacción cruzada que presenta con los de *T. solium* (Larralde C. y cols. 1990)<sup>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>. Finalmente, se analizó la inmunoreactividad de las clonas para identificar las que más probablemente fueran mimotopos de los antígenos de *T. solium*.

El análisis de las secuencias de las clonas mostró varios péptidos con homología en la región N-terminal de KETc7 y otro que reconoció otro sitio dentro del mismo antígeno, previamente caracterizado como región inmunoreactiva de KETc7 (Gevorkian y cols. 1996. Manoutcharian y cols. 1996)<sup>¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup>. Posteriormente, el análisis inmunológico de estas clonas, reveló que todas fueron inmunoreactivas con los sueros con los que se aislaron.

## **II Hipótesis**

La técnica de Phage Display puede facilitar la selección de mimotopos inmunoreactivos para la identificación de epítomos individuales en los sitios de interés de la región amino terminal de la paramiosina de *T. solium*.

Esto se pretende lograr por medio de anticuepos inducidos con péptidos sintéticos, del tamaño de un epítomo (20 aa apróx.), a falta de anticuerpos monoclonales disponibles para esta proteína.

### **III Objetivos**

#### **III.1 Objetivo General.**

- Adecuar la técnica de “Phage Display” para la identificación de epítomos en un sitio determinado de la parte amino terminal de Ag B con el uso de antisuero de conejo contra un péptido sintético de este sitio (aminoácidos 1-20).

#### **III.2 Objetivos Particulares**

1. Realizar experimentos de biopanning y seleccionar clonas de fago reconocidas de manera específica por los anticuerpos contra el péptido sintético.
2. Obtener las secuencias de aminoácidos de los péptidos expresados en fagos y compararlos con la secuencia de la parte amino terminal del Ag B.
3. Determinar por ELISA las propiedades antigénicas de los péptidos obtenidos para identificar aquéllos que pudieran ser mimotopos del Ag B.
4. Identificar la estructura del epítomo y localizar sus aminoácidos en el extremo amino terminal del Ag B.

## **IV Material y Métodos**

### **IV.1 Medios de Cultivo**

LB (Luria Bertani)

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

YT2X

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

Agarose Top

Triptona 1%; Extracto de levadura 0.5%; NaCl 0,5%; MgCl<sub>2</sub> 0.1%, Agarosa 0,7%.

### **IV.2 Amortiguadores y Soluciones**

TBS pH 7.5

NaCl 150 mM; TRIZMA-base 9.74 mM; TRIZMA-HCL 40.29 mM

PEG/NaCl 40%

NaCl 5M; PEG (8 000) 40%.

PBS 10x

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42.9 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.9mM; NaCl 1368.6 mM; KCl 26.8 mM

PBS 1x

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.29 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.39mM; NaCl 136.86 mM; KCl 2.68 mM

Amortiguador de Bloqueo

PBS 1x , BSA 1%



TAE pH 8 (50x)

Tris 1.99 M, CH<sub>3</sub>COOH glacial 1M, EDTA 0.05M

TBE pH 8 (1x)

Tris 0.445M, Ácido bórico 0.444M, EDTA 0.010M

Gel de Agarosa

Agarosa 0.5g + 49 ml H<sub>2</sub>O, se hierve y se añade 1ml TAE 50X + 8 l Bromuro de Etidio.

Gel de Acrilamida para Secuencia de DNA (6%)

Urea 33.6g; Sol. Poliacrilamida (40%) 11.6 ml; TBE 5X 16 ml; H<sub>2</sub>O 28 ml.

Esta mezcla se pasa por papel filtro y se desgasifica aplicando vacío en un matraz Kitasato.

Para solidificar se añaden a la mezcla anterior 640 l de persulfato de amonio (10%) y 16 l de TEMED (0.1mg/ l de H<sub>2</sub>O).

Amortiguador de Ioduro

10mM Tris-HCL pH 8.0; 1mM EDTA; 4M NaI.

Amortiguador de Dietanolamina al 10% pH 9.8

Dietanolamina 100ml; MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 102 mg; NaN<sub>3</sub> 0.40g; se ajusta el pH con HCl aforar con H<sub>2</sub>O a. 1l.

Amortiguador de Unión:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01M pH 7.0, NaCl 0.15M

Amortiguadores de Elusión:

Glicina-HCl 0.1M, pH 2.6

Glicina-HCl 0.1 M, pH 4.0

Amortiguador de Ioduro

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

### **IV.3. Anticuerpos y Controles**

- 1.) TPmy: paramiosina de *Taenia solium*.
- 2.) VW2-1: fragmento recombinante de 208 aminoácidos correspondiente al primer tercio del extremo amino terminal de TPmy (control positivo).
- 3.) ASppy: el antisuero que reconoce a un péptido recombinante correspondiente a la porción de 20 aminoácidos del extremo amino terminal de TPmy.
- 4.) ppyP: Fracción IgG purificada a partir de ASppy.

Para los experimentos realizados en este trabajo se utilizaron ASppy y VW 2-1 proporcionados por el laboratorio del Dr. Juan Pedro Laclette.

### **IV.4 Purificación de la Fracción IgG del Antisuero.**

La Fracción IgG del antisuero ASppy fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando proteína G.

Se empacó una columna (Poly Prep, Bio Rad) con 1 ml de proteína G – Agarosa (Life – Technologies, USA) y se utilizó para la purificación de la fracción IgG, según las instrucciones del fabricante. En resumen: la columna se equilibró con 10 volúmenes de amortiguador de unión, se cargó con 2 ml del ASppp previamente clarificado por centrifugación a 3000 rpm. Se lavó el antisuero con 10 volúmenes de amortiguador de unión, controlando la absorbancia a 280 nm. La fracción IgG fue eluída con 6 volúmenes de amortiguador de elusión, e inmediatamente se neutralizó el eluato con Tris base 1.0M. Se eluyó 1 ml de fracción IgG y se tituló. Posteriormente se utilizó para el panning la fracción que obtuvo mayor título.

#### **IV.5 Cuantificación de Proteína por el Método de Bradford**

Se realizó la variante “micro Bradford” que consiste en los siguientes pasos:

En una placa de 96 pozos se realizó una curva patrón con diferentes concentraciones de BSA (200 ng, 400 ng, 600 ng, 800 ng, 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg, 8 µg, 10 µg, 12 µg, 14 µg y 16 µg) en un volumen final de 160 µl/pozo, por duplicado.

Se realizaron diluciones de la muestra problema (5 µl y 10 µl en un volumen final de 160 µl).

Se agregaron 40 µl de reactivo de Bradford (Biorad).

Se leyeron las muestras a 545 nm (luz visible) y al graficar los datos se determinó la cantidad de proteína (2 µg/µl).

#### **IV.6 Biblioteca de Péptidos “Phage Display”**

Se utilizó una biblioteca de “Phage Display” del tipo pIII, en la cual el péptido artificial de doce residuos se encuentra unido a la región N-terminal de la proteína pIII de la cápside del fago M13 de *E. coli*. Hay entre 1 y 5 proteínas de este tipo por fago, que no

requiere de un fago ayudador para ser infectivo. La biblioteca fue comprada a BioLabs (PhD-7 TM.) New England, USA. Con las siguientes especificaciones:

La biblioteca consta aproximadamente de  $2 \times 10^9$  clonas diferentes de fago. Cada clona presenta al azar un péptido de 12 aminoácidos diferente en la proteína pIII. La biblioteca fue amplificada de tal manera, por el fabricante, que hay  $10^2$  copias de cada clona (título final  $10^{11}$  clonas). Los experimentos de panning se hicieron según el fabricante, en sólido o líquido, como se indica más adelante.

#### **IV.7 Biopanning del Antisuero y de la Fracción IgG purificada.**

Para los experimentos de biopanning se utilizaron: ASppy; el antisuero que reconoce la porción de 20 aminoácidos del extremo amino terminal de TPmy y ppyP; la fracción IgG purificada a partir de ASppy.

#### **IV.8. Biopanning Sólido**

Se realizó el proceso de biopanning en sólido, que es una cromatografía de afinidad con el blanco inmovilizado, adherido a los pozos de las placas.

El antisuero fue diluido 1:100 en PBS y se añadieron 50  $\mu$ l / pozo a 6 pozos de una placa de poliestireno de 96 pozos marca Immulon (Immulon 4 flat bottom plates). Esta placa se incubó toda la noche con agitación suave a 4°C. Al día siguiente se lavaron los pozos 5 veces con PBS 1x – 0.1% Tween 20, añadiendo 200  $\mu$ l / pozo y dejando el lavado durante 1 min Inmediatamente después, se bloquearon los pozos con 300  $\mu$ l / pozo de PBS 1x – BSA 1% y se incubaron 1h a 37°C. Se lavaron nuevamente como se indicó anteriormente. Se tomaron los fagos directamente de la biblioteca comercial y se diluyeron 1:60 en PBS 1x – BSA 0.1% ( $10^{10}$  diferentes clonas de fago) y se agregaron 100  $\mu$ l de esta dilución a cada pozo. Posteriormente se incubaron 2h a 4°C en agitación

suave y se volvieron a lavar los pozos. Se agregó PBS 1x – BSA 1%, 350 µl / pozo y se dejó la placa en incubación 30 min a 37°C. Se repitieron los lavados. Se añadieron 100 µl / pozo de glicina – HCl pH 2.2. y se incubó a ta 10 min para eluir los fagos unidos a ASppy. Los eluatos se recuperaron rápidamente en un tubo eppendorf, al que se le agregaron previamente 35 µl de TRIS base 2M para neutralizar.

#### **IV.9 Biopanning Líquido o Alternativo (unido en solución con proteína G).**

Se transfirieron 50 µl de Proteína G-Agarosa (50% suspensión acuosa) a un tubo de microfuga, al que se le agregó 1 ml de TBS + 0.1% Tween (TBST). Se suspendió la resina golpeando e invirtiendo suavemente al tubo. La resina se precipitó por microcentrifugación a 4 000 rpm/30 seg y se retiró el líquido, sin alterar el botón. Posteriormente, se resuspendió el botón en amortiguador de bloqueo y se incubó 1h a 4°C, agitando suavemente, con intervalos de 10 min Durante la incubación, se diluyeron  $4 \times 10^{10}$  viriones fágicos (10 µl de la biblioteca de Phage Display) y 300ng de anticuerpo en un volumen final de 200 µl con TBST. Se incubó 10 min a ta. Al terminar el bloqueo, se precipitó la resina, como en el paso 2 y se lavó 4 veces con 1 ml de TBST, reprecipitando la resina cada vez. Se transfirió la mezcla fago-anticuerpo al tubo con la resina lavada, se mezcló suavemente y se dejó incubando a ta durante 15 min, agitando ocasionalmente. La resina fue precipitada, como en el paso 2 y se lavó 10 veces con 1 ml de TBST, reprecipitando la resina cada vez. Los fagos unidos con menor afinidad fueron eluidos resuspendiendo la resina en 1 ml de Glicina – HCl 0.2M pH 4, incubando 10 min a ta. y mezclando ocasionalmente. La mezcla de elución se microcentrifugó 1 min a 4 000 rpm. Se transfirió el sobrenadante, sin tocar el botón a un tubo con 75 µl de Tris HCl 1M pH 9.1, para neutralizar. Para eluir los fagos unidos con mayor afinidad se resuspendió la resina en 1 ml de Glicina – HCl 0.2M pH 2.2,

incubando 10 min a ta y mezclando ocasionalmente. La mezcla de elución se microcentrifugó 1 min a 4 000 rpm. Se transfirió el sobrenadante, sin tocar el botón a un tubo con 150 µl de Tris HCl 1M pH 9.1, para neutralizar.

#### **IV.10 Titulación**

Para determinar el número de clonas recuperadas después del proceso de biopanning, se hicieron 2 diluciones de los fagos eluidos, inoculando en LB a *E. coli* (cepa ER 2537 de Biolabs, cultivo crecido durante toda la noche), a una dilución de 1:200 y 10:200, se dejó infectar 3 min a ta y se transfirieron a 4 ml de Agarose Top, fundido y enfriado a 40°C, se mezcló por inversión y se transfirió a una caja de Petri con 20 ml de LB/Agar, que se puso a incubar toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente se contaron las unidades formadoras de colonia (ufc) para determinar así el número de clonas de fago eluidas a partir del biopanning.

#### **IV.11 Amplificación**

Después de la titulación, se amplificaron los eluatos usando una dilución 1:100 de un cultivo de *E. coli*, en fase estacionaria, en YT2X, al cual se le añadió 70% del volumen total obtenido de cada eluato del biopanning (por separado).

Se incubó en agitación a 37°C., 270 min

#### **IV.12 Precipitación del Fago**

Después de la amplificación, se centrifugó el cultivo durante a 10 000 rpm /10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió ¼ de volumen de PEG/NaCl 40 %

mezclando vigorosamente para resuspender y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 10 000 rpm / 15 min a 10 000 rpm a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de TBS y se transvasó a tubo Eppendorf. Se microcentrifugó a 14 000 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 300 µl de TBS + NaN<sub>3</sub> 0.02M. Se microcentrifugó 1 min y se trasladó el sobrenadante (fago purificado) a un tubo Eppendorf limpio.

Ya purificado el fago, se volvió a titular, para siempre usar la misma cantidad de fago en cada ronda de biopanning, con una modificación en las diluciones: 1:1 000 000 y 1: 1 000 000 000. Posteriormente se guardó en refrigeración para usarse en las subsecuentes rondas de biopanning.

Este proceso de biopanning - titulación - amplificación - precipitación - titulación, se repitió 3 veces consecutivas después de la primera ronda de panning, en líquido con ASppy y en sólido con ppyP para seleccionar cada vez fagos con mayor afinidad por el suero y por el anticuerpo respectivamente. Concomitantemente la concentración de ASppy fue disminuída para la segunda, tercera y cuarta ronda de panning: 1:50; 1:200 y 1:200, respectivamente. De la fracción IgG se utilizaron 100 ng y 30 ng para las subsecuentes series de panning.

Después de la tercera reacción de biopanning se aislaron clonas de los fagos eluidos con ASppy y se manejaron individualmente para hacerles ensayos inmunológicos y comparar sus secuencias de aminoácidos.

Posteriormente se sometió a ASppy a una cuarta ronda de panning, en líquido.

#### **IV.13 Aislamiento de Clonas Seleccionadas**

Al titular el eluato de la tercera ronda de panning, se usaron cajas de Petri con LB – Agar + IPTG – X – Gal, para distinguir las unidades formadoras de placa, sin mutaciones por un color azul. La infección se realizó como ya se describió, pero con una dilución del eluato 1:1000 e infectando con 1 µl del eluato, ya que se esperaban entre  $10^7$  y  $10^8$  ufc. Después de la incubación nocturna, se recuperaron 18 ufc. azules de la caja de Petri, por picadura y se amplificaron individualmente en 3ml de YT2X con una dilución 1:100 de un cultivo fresco, crecido en agitación durante la noche anterior de *E. coli* ER 2537, 4.5 – 5 h a 37°C a 200 rpm.

Después se tomó 1 ml de cada cultivo para purificación de DNA de cadena sencilla (ssDNA) y se precipitaron las clonas como se describió anteriormente para purificar los fagos.

Para determinar si los péptidos obtenidos por el proceso de biopanning eran antigénicos se utilizaron las clonas individuales para hacerles un ensayo de ELISA.

#### **IV.14 ELISA de Fago y Anticuerpos**

Esta técnica está basada en lo descrito por Dyward, y cols. *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* En una placa de 96 pozos marca Nunc (F96 Cert. Maxisorp; Nunc-Immunoplate) se añadieron  $10^9$ - $10^{10}$  de cada clona seleccionada y amplificada diluidos en PBS – BSA (50 ng/pozo) poniendo 100 µl por pozo e incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se hicieron 5 lavados de 4 min c/u con 150 µl / pozo de PBS 1x-Tween 20 0.3%. Se bloqueó la placa con PBS 1x – BSA 1% durante 1 h a 37°C. Se repitieron los lavados. Se agregó el suero ASpyy como anticuerpo primario respectivamente, diluidos 1:100 en PBS 1x – Tween 0.2% - BSA 0.2%, 100 µl por pozo y se incubó 1h a 37°C. Se repitieron los lavados. Se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo



conjugado a fosfatasa alcalina, diluido 1:5000 en PBS 1x – Tween 0.2% - BSA 0.2%, 100 µl/pozo (esta dilución se decidió después de haber hecho una curva de titulación del anticuerpo). y se incubó 1h a 37°C. Se repitieron los lavados y se agregó paranitrofenilfosfato como sustrato para la enzima, disuelto en amortiguador de dietanolamina. Se incubó a 37°C y se hicieron dos lecturas de absorbancia de cada pozo a los 10 y 30 min de incubación en un lector de placas de ELISA (Stat Fax – 2100; Awareness Technology Inc.) a una longitud de onda de 405 nm. El ELISA con anticuerpos se realizó de la misma manera sólo que utilizando ASppy o ppyP con las concentraciones mencionadas más adelante.

Las clonas se consideraron inmunogénicas si la absorbancia del suero o del anticuerpo purificado unidos a los pozos con fagos seleccionados por biopanning era mayor a 0.2 DO o mucho mayor que la DO del anticuerpo o suero al unirse a los pozos con fago silvestre (no seleccionado) o a los pozos sin fago.

Posteriormente se realizó un estudio estadístico para determinar la inmunoreactividad de las clonas.

#### **IV.15 Purificación de DNA de Cadena Sencilla (ssDNA)**

Al ml obtenido del cultivo + fago amplificado individualmente, se le añadió 400 µl de PEG/NaCl 40%, se mezcló vigorosamente y se incubó 10 min a ta. Se microcentrifugó 10 min a 14 000 rpm Se desechó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 100 µl de amortiguador de yoduro y se le añadió 250 µl de etanol absoluto. Se incubó 10 min a ta y posteriormente se microcentrifugó a 14 000 rpm, 10 min Después de eliminar el sobrenadante el precipitado se lavó con etanol 70%. Se microcentrifugó a 14 000 rpm durante 4 min Se desechó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 30 µl de H<sub>2</sub>O

destilada estéril, se corrieron 2 µl de cada muestra en un minigel de agarosa 1% con Bromuro de Etidio para saber si la purificación fue exitosa y lo demás se congeló a – 20°C.

#### **IV.16 Determinación de Secuencia**

Esta reacción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del Kit de Secuencia Amersham (T7 Secuenase<sub>v 2.0</sub>; T7 Secuenase Quick-Denature plasmid sequencing kit. Amersham LIFE SCIENCE). En resumen, para cada clona individual se hizo una reacción de secuencia con dideoxinucleótidos, usando la secuenasa T7, utilizando deoxioligonucleótidos específicos para la región de inserción del péptido.

#### **IV.17 Comparación de Secuencia**

Una vez obtenida cada secuencia de aminoácidos del péptido de cada clona individual, se compararon con la secuencia de TPmy y de VW 2-1.

El objetivo de esta comparación, fue determinar si los péptidos inmunoreactivos, presentaban similitud de secuencia con la proteína o con el fragmento de 20 aa, VW 2-1.

## V Resultados

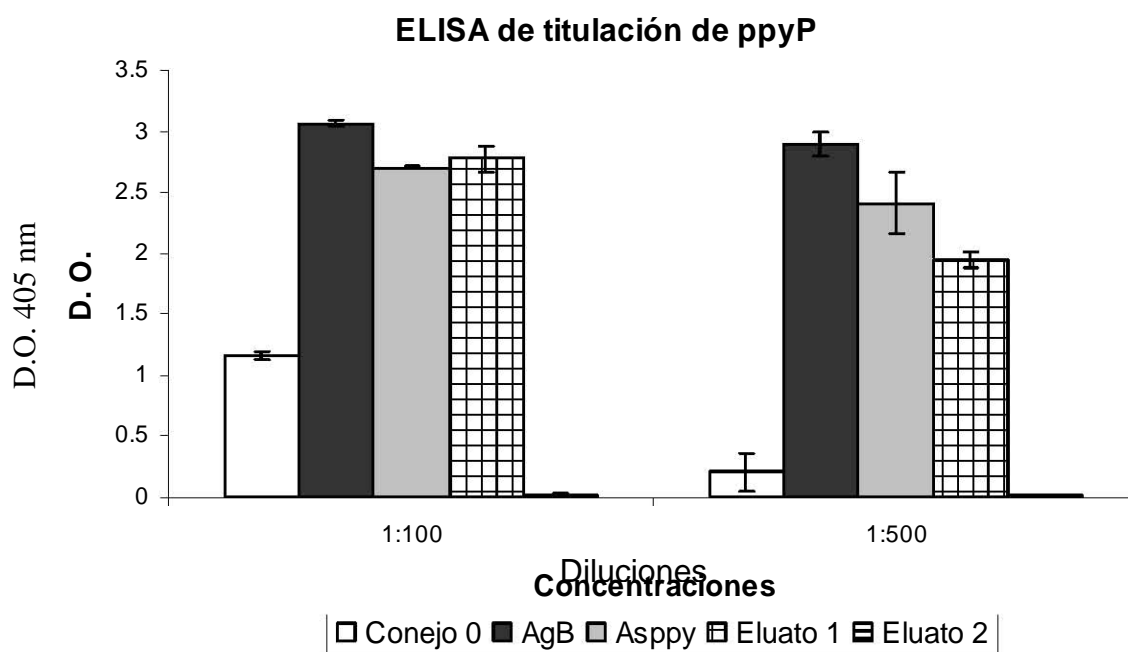
Antes de hacer los experimentos de biopanning, aislamiento, determinación de inmunoreactividad y secuenciación de las clonas, hubo que hacer algunos experimentos preeliminares para asegurarse de que tanto el antisuero (ASppy), el control (VW 2-1) y la fracción IgG purificada (ppyP) fueran de utilidad para los experimentos posteriores. Así mismo se hicieron diferentes titulaciones para determinar la concentración óptima del anticuerpo, es decir, la mínima concentración requerida de anticuerpo con buena inmunoreactividad.

Al terminar de purificar la fracción IgG de ASppy se hizo un ELISA para verificar que la fracción inmunoreactiva fuera la que se había extraído y que el eluato posterior no contuviera anticuerpos. (Figura 7).

La placa fue sensibilizada con 100 ng/pozo de VW 2-1. Como anticuerpos primarios se pusieron: suero de conejo no inmunizado contra *T. solium* (Conejo 0), como control negativo; antisuero contra Ag B y ASppy como controles positivos y ambos eluatos. Todos los anticuerpos primarios se pusieron en dos diferentes diluciones, 1:100 y 1:500. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina. [1:5000]

En la figura 7 se aprecia que la fracción IgG fue obtenida en el primer eluato y éste fue con el que se siguió trabajando. Se le denominó ppyP

De manera cualitativa se observó que ppyP tiene una reactividad antigénica comparable con la de ASppy y éste a su vez con el Ag B por lo que ambos son de utilidad para intentar obtener clonas reactivas por medio de experimentos de biopanning.



**Figura 1: ELISA de Titulación de ppyP.** La placa fue sensibilizada con WV 2-1 y posteriormente se probaron diferentes concentraciones (1:100 y 1:500) del primero y segundo eluato de la purificación de la fracción IgG de ASppy (Eluato 1 y Eluato 2). Como control negativo se utilizó suero de conejo no inmunizado (Conejo 0). AgB y ASppy fueron los controles positivos. Se presentan los promedios de los valores, con sus desviaciones estándar.

Para establecer la concentración óptima de VW 2-1 a utilizar en los posteriores ELISAs con fago se decidió hacer dos titulaciones de éste (figuras 8 y 9).

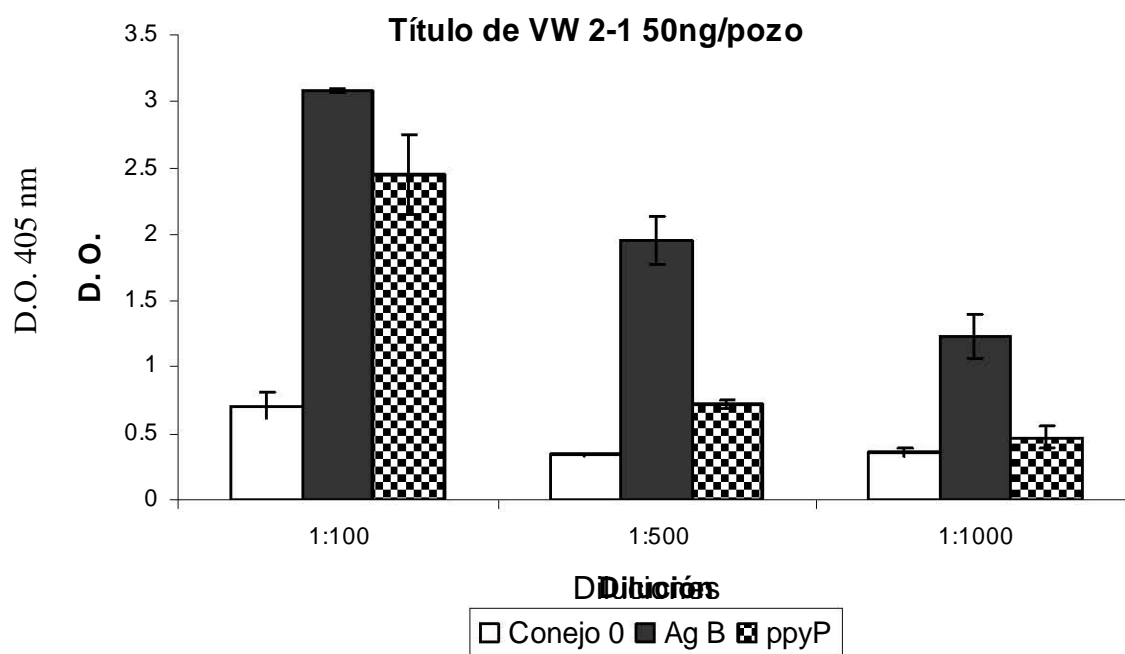
Se utilizaron 2 concentraciones distintas de VW 2-1 para sensibilizar las placas: 50 ng/pozo y 100 ng/pozo, respectivamente. Como anticuerpos primarios se utilizaron: Conejo 0 como control negativo; Ag B, como control positivo y ppyP, todos en las concentraciones 1:100, 1:500 y 1:1000.

Los resultados mostraron que la diferencia entre la sensibilidad del anticuerpo VW 2-1 contra Ag B, ppyP y Conejo 0 a las concentraciones de 50 ng/pozo y 100 ng/pozo no es

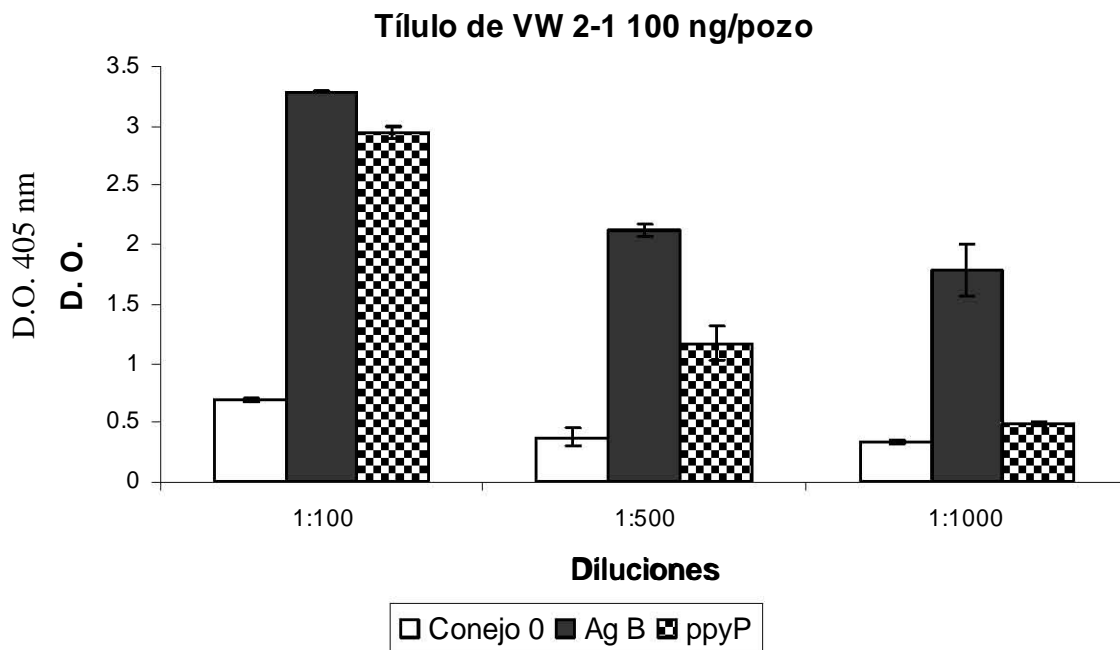
significativa por lo que para ahorrar antígeno y mantener la sensibilidad en los experimentos posteriores se utilizó VW 2-1 a una concentración de 50 ng/pozo

Ya establecida la concentración óptima de VW 2-1 se realizó otro ELISA para comparar el comportamiento de ASppy contra ppyP.

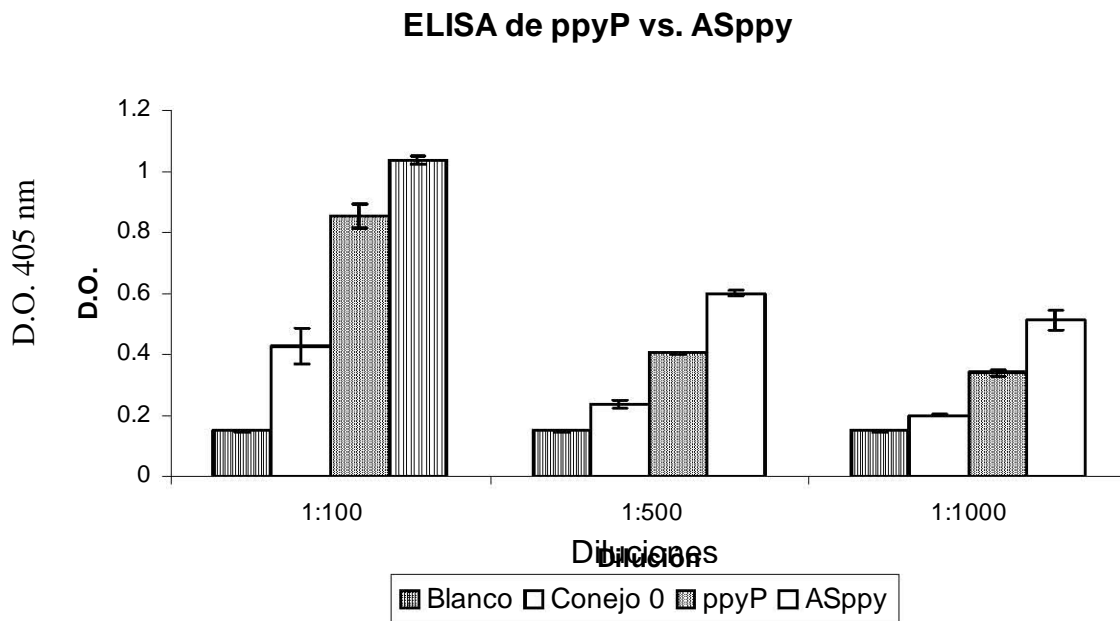
La placa fue sensibilizada con VW 2-1. Como testigos se utilizaron: PBS Y Conejo 0 como controles negativos; Ag B como control positivo; ASppy como control positivo y ppyP.



**Figura 2: Elisa de Titulación de ppyP a Diferentes Concentraciones con VW 2-1.** Esta placa fue sensibilizada con 50 ng/pozo de VW 2-1. Se agregaron diferentes concentraciones del control negativo (Conejo 0), el positivo (Ag B) y de la fracción IgG purificada de ASppy (ppyP)



**Figura 3: Elisa de Titulación de ppyP a Diferentes Concentraciones con VW 2-1.** Esta placa fue sensibilizada con 100 ng/pozo de VW 2-1. Se agregaron diferentes concentraciones del control negativo (Conejo 0), el positivo (Ag B) y de la fracción IgG purificada de ASppy (ppyP).



**Figura 4: ELISA de Comparación de ppyP y ASppy** Esta placa fue sensibilizada con 50 ng/pozo de VW 2-1. Se agregaron diferentes concentraciones del control negativo (Conejo 0); de la fracción IgG purificada de ASppy (ppyP) y de ASppy como control positivo.

En la figura 10 se observan los resultados de este ELISA que muestran que ppyP es inmunogénico y que, como ASppy, puede ser útil para seleccionar clonas por medio del proceso de biopanning.

### **V.1 Biopanning**

Tomando en cuenta estos resultados y observando que ppyP reacciona con VW 2-1 se decidió aislar clonas con ASppy y ppyP para determinar la secuencia de las clonas que fuesen inmunoreactivas después de la tercera ronda de biopanning.

Se aislaron clonas con ASppy y ppyP por medio de panning en fases sólida y líquida, según se indica en la metodología.

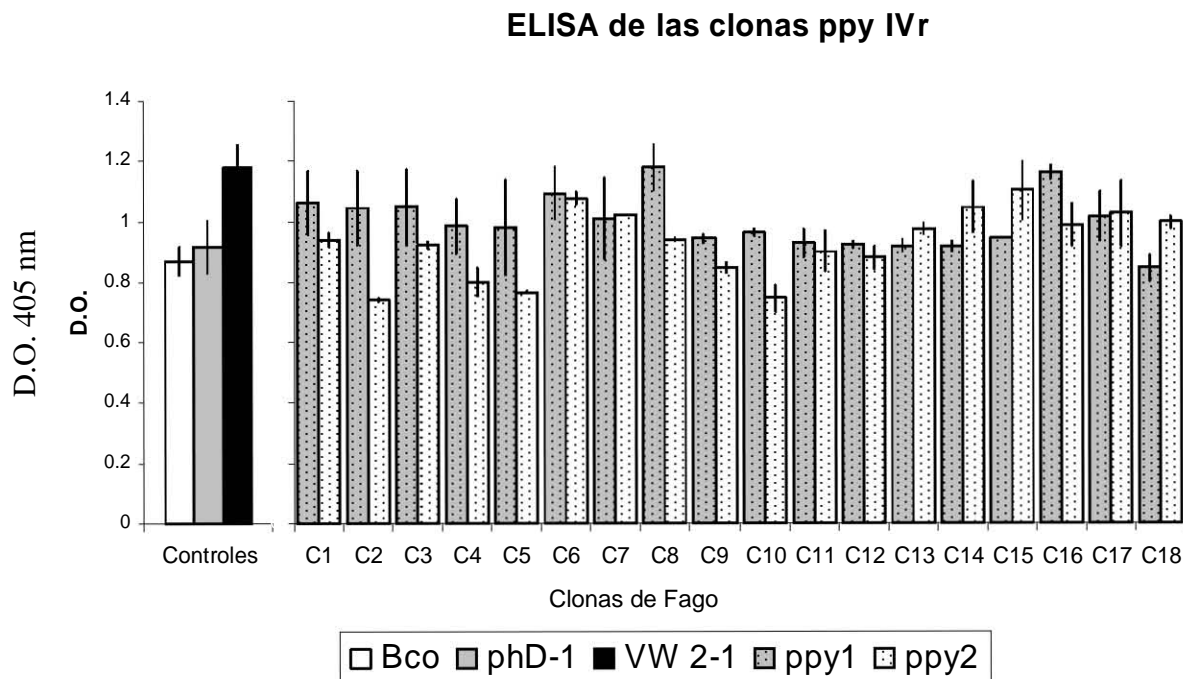
Los eluatos finales de la cuarta ronda de panning en fase sólida con ASppy se llamaron ppy1 y ppy2 según el experimento en el que se hayan realizado.

El eluato final de la tercera ronda de panning en fase líquida con ppyP se denominó ppyP.

Se aislaron aleatoriamente clonas de los tres eluatos obtenidos por panning y se les dio el nombre del eluato del que fueron obtenidos más el número en el que fueron aisladas del 1 al 18 siguiendo el “ppy1”, “ppy2” o el “ppyP”.

Después de la cuarta ronda de panning se seleccionaron aleatoriamente 18 clonas para cada eluato (36 clonas) cuya inmunoreactividad fue analizada.

## V.2 Inmunoreactividad

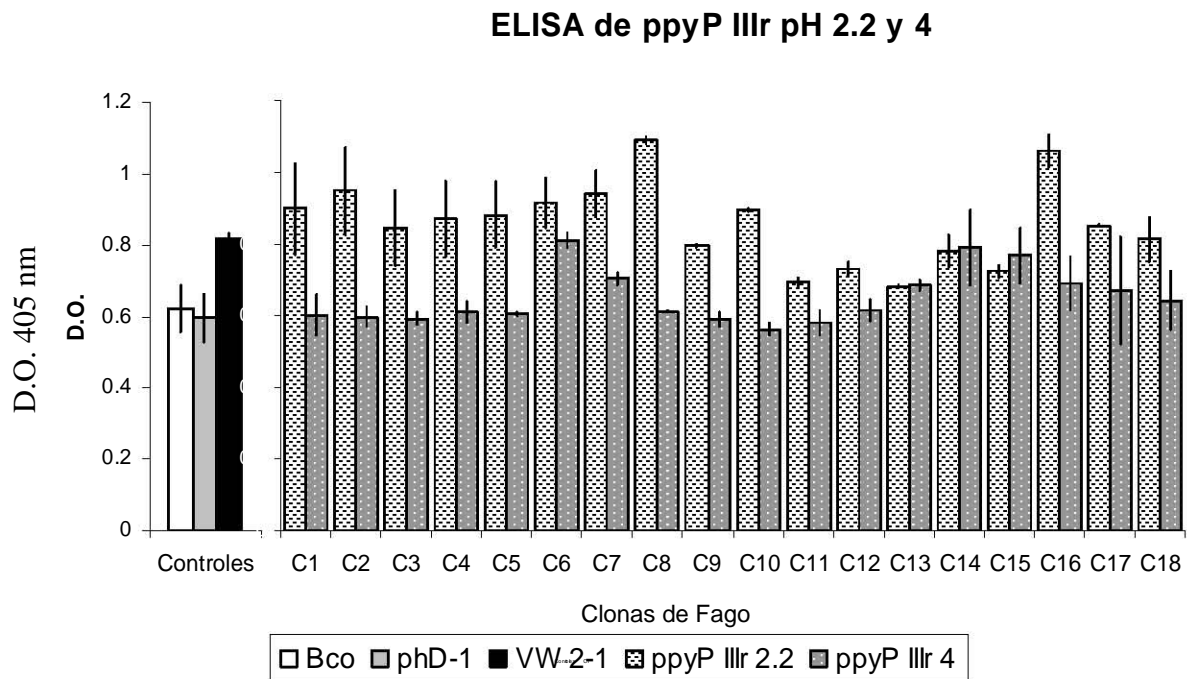


**Figura 5: ELISA de las Clonas Obtenidas de la IV Ronda de Panning en Fase Sólida Paralelos con ppy.** La placa se sensibilizó con amortiguador de carbonatos (Bco) y fago silvestre (pH-D-1) como controles negativos. VW 2-1 fue el control positivo y se probaron 18 clonas seleccionadas al azar de la IV ronda de panning del primero (ppy1) y el segundo (ppy2) experimento.

En la figura 11 se muestran los resultados del ELISA con las clonas de ppy, obtenidas de los eluatos de la cuarta ronda de panning de la biblioteca de fagos con el antisuero ASppy, de dos experimentos paralelos. La placa se sensibilizó con amortiguador de carbonatos y fago silvestre como controles negativos, VW 2-1 como control positivo y 18 clonas obtenidas aleatoriamente de cada uno de los eluatos de ppy1 y ppy2. Varias clonas, tanto de ppy1 como de ppy2 mostraron ser antigénicas (con  $DO > 1$ ) y candidatas para secuenciación.

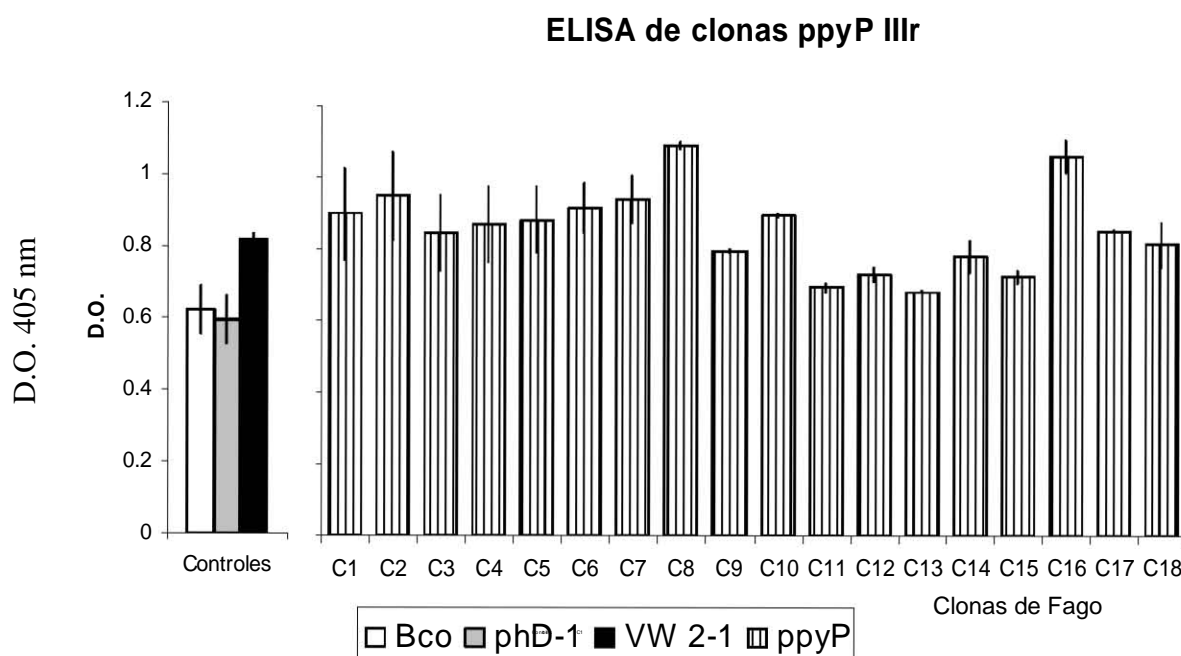


Las clonas aisladas del eluato de la tercera ronda de panning de la biblioteca de fago con ppyP fueron eluidas con una modificación: en la tercera ronda, antes de eluir el fago con amortiguador de glicina pH 2.2, se realizó una “pre-elución” de los fagos unidos con menor afinidad a ppyP con amortiguador de glicina a pH 4.0. Esto se hizo con la finalidad de enriquecer las clonas obtenidas con pH 2.2. Es decir, al ser extraídas previamente las clonas unidas con menor afinidad a ppyP, la probabilidad de que las clonas eluidas posteriormente a pH más ácido fuesen más inmunoreactivas aumentaría, ya que en el primer eluato serían “lavadas” a un pH más alto las clonas con menor unión a ppyP



**Figura 6: ELISA de las Clonas Obtenidas de la III Ronda de Panning en Fase Líquida con ppyP** La placa se sensibilizó con buffer de carbonatos (Bco) y fago silvestre (pHD-1) como controles negativos. VW 2-1 fue el control positivo y se probaron 18 clonas seleccionadas al azar de la III ronda de panning en fase líquida de ppyP eluidas a pH 4 (ppyP III r 4) y a pH 2.2 (ppyP IIIr 2.2).

En la figura 12, se muestran los resultados del ELISA que se realizó con las 18 clonas seleccionadas aleatoriamente de ambos eluatos. La placa fue sensibilizada como la de la se describió previamente, sólo que en este caso las clonas con las que se sensibilizó fueron ppyP IIIr pH 2.2 y ppyP IIIr pH 4.0, indicando en la nomenclatura el pH al que fueron obtenidas. De estos resultados se concluye que las clonas aisladas de los fagos eluidos a pH 2.2 son inmunoreactivas y no así las del eluato a pH 4.0. Así se determinó que a pH 2.2 se eluyeron los fagos unidos a ppyP con mayor afinidad y estas clonas son las mejores candidatas para hacer la reacción de secuencia.



**Figura 7: ELISA de las Clonas Obtenidas de la III Ronda de Panning en Fase Líquida con ppyP.** La placa se sensibilizó con amortiguador de carbonatos (Bco) y fago silvestre (pH D-1) como controles negativos. VW 2-1 fue el control positivo y se probaron 18 clonas seleccionadas al azar de la III ronda de panning en fase líquida de ppyP eluidas a pH 2.2 (ppyP).

Como se decidió trabajar con las clonas ppyP IIIr 2.2, se hizo otro ELISA sólo con estas clonas y los resultados se muestran en la figura 15. Estas clonas fueron las definitivas y se

denominaron ppyP. La placa se manejó en las mismas condiciones que las dos anteriores y se observa que hay clonas bastante inmunoreactivas.

Como estos resultados muestran se obtuvieron clonas con buena actividad antigénica, tanto del panning realizado con ASppy como con ppyP. Debido a esto, se decidió secuenciarlas para ver si había una correlación entre la inmuneactividad de las clonas con alguna similitud en su secuencia con la de TPmy.

## V.3 Análisis y Comparación de Secuencias

### Comparación de Secuencias de ppy1.

Clonas de ppy1

Aminoácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
TPmy	Met	<u>Ser</u>	Glu	<u>Ser</u>	His	Val	Lys	Ile	Ser	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Ser	<u>Pro</u>	Ser	Thr		
Clona 2										Thr	His	Gln	His	Ser	Tyr	Pro	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	
Clona 4										Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Met	Ser	Pro	His	Gly	Ala	Thr	
Clona 5										Lys	His	Met	His	Trp	His	Pro	Pro	Ala	Leu	Asn	Thr	
Clona 16										Phe	Ser	Pro	Leu	His	Thr	Ser	Thr	Tyr	Arg	Leu	Leu	
Clona 14											<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	Lys	Leu	Thr	His	Pro	<u>Pro</u>	Thr	<u>Thr</u>	Gln	Ser
Clona 7		Leu	<u>Val</u>	Ala	<u>Lys</u>	Pro	His	Met	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	Asn	Leu									
Clonas 1, 11, 15								Ser	Tyr	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Thr</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ile	Thr			
Clona 8										Met	Asn	Asp	Pro	Ser	Pro	Trp	Leu	<u>Arg</u>	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Arg</u>	

**Tabla 1 : Comparación de Secuencias de ppy 1 con TPmy.** Las clonas de ppy1 elegidas al azar fueron secuenciadas y posteriormente comparadas con la secuencia de TPmy, utilizando el algoritmo Niedelman-Wunsch bajo condiciones estándar. Los aa resaltados son los que fueron conservados o sustituidos por otros de propiedades similares.

### Comparación de Secuencias de ppy2.

Clonas de ppy 2

Aminoácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
TPmy	Met	<u>Ser</u>	Glu	<u>Ser</u>	His	Val	Lys	Ile	Ser	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Ser	<u>Pro</u>	Ser	Thr			
Clona 7										Met	Lys	Pro	Ser	Pro	Pro	Gln	Ile	Ile	His	Arg	Val		
Clona 9										Met	Thr	Arg	His	His	Leu	Leu	Asn	His	Gln	Phe	Thr		
Clona 15							Val	Ile	His	Pro	Leu	Lys	Tyr	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr					
Clona 10												His	Asn	Trp	Tyr	Met	Trp	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	Phe	Leu	Arg	His
Clona 17							Tyr	Thr	Pro	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	Phe	<u>Pro</u>	Asp	Ala	Ala	<u>Pro</u>	Phe					
Clona 14		Gln	Ser	Leu	Pro	His	Pro	Asn	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ile	<u>Thr</u>										
Clona 4			Trp	His	Trp	Gln	Tyr	<u>Thr</u>	Pro	Trp	Trp	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Ser</u>									
Clona 3								Asn	Met	Phe	Gly	Ser	Leu	Thr	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Val</u>	Thr	Ala				
Clona 1		His	<u>Ser</u>	<u>His</u>	Thr	His	<u>Lys</u>	Ala	Leu	Ala	.....	.....	.....	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>							
Clonas 6, 8, 11, 13, 16, 18								Phe	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Ala	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	Gln	Phe	Tyr				
Clona 5							Leu	Ile	His	Phe	Pro	Val	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Asn</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	Val					

**Tabla 2 : Comparación de Secuencias de ppy 2 con TPmy.** Las clonas de ppy2 elegidas al azar fueron secuenciadas y posteriormente comparadas con la secuencia de TPmy, utilizando el algoritmo Niedelman-Wunsch bajo condiciones estándar. Los aa resaltados son los que fueron conservados o sustituidos por otros de propiedades similares.

Finalmente se purificó DNA de cadena sencilla (ssDNA) para realizar el análisis de secuencia de las clonas y compararlas la secuencia de paramiosina de *T. solium*. Se encontraron similitudes con la fracción correspondiente a los primeros 20 aminoácidos de ésta.

### Comparación de Secuencias de ppyP con TPmy

Clonas de ppyP

Aminoácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TPmy	Met	<u>Ser</u>	Glu	<u>Ser</u>	His	Val	Lys	Ile	Ser	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	Thr	Ser	<u>Pro</u>	Ser	Thr
Clona 14					Met	Lys	Glu	Thr	His	Ser	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	His	Gln	Pro					
Clonas 11 y 13								Asn	Glu	Met	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	Met	Asn	Met	Ala	Ala	
Clonas 8 y 16							Ala	Trp	Thr	His	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Pro</u>	Asp			
Clona 17								Leu	Glu	Pro	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Pro</u>	Gln	Thr	Leu	
Clonas 1, 3, 6, 10							Ser	Leu	Ser	<u>Arg</u>	<u>Met</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Leu	His	<u>Pro</u>	
Clona 2								Asp	Ile	<u>Arg</u>	<u>Gln</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Leu	His	<u>Pro</u>	
Clona 18									His	<u>Arg</u>	<u>Val</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Ser	Ala		
Clona 4							His	Ile	Ala	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Asn	Leu		
Clona 12							Phe	<u>Pro</u>	Asn	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Thr	Trp		

**Tabla 3 : Comparación de Secuencias de ppyP con TPmy.** Las clonas de ppyP elegidas al azar fueron secuenciadas y posteriormente comparadas con la secuencia de TPmy, utilizando el algoritmo Niedelman-Wunsch bajo condiciones Standard. Los aa resaltados son los que fueron conservados o sustituidos por otros de propiedades similares.

## VI Discusión

Tanto el antisuero obtenido a partir del péptido sintético de 20 aa (ASppy), como su fracción IgG purificada (ppyP), utilizados para seleccionar péptidos a partir de una biblioteca de fagos de dodecámeros, mostraron títulos significativos de reconocimiento de anticuerpos contra TPmy.

### Grupo 1.

Aminoácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
TPmy	Met	<u>Ser</u>	Glu	<u>Ser</u>	His	Val	Lys	Ile	Ser	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Ser	<u>Pro</u>	Ser	Thr				
Clonas																								
ppy1/ 14											<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	Lys	Leu	Thr	His	Pro	<u>Pro</u>	Thr	<u>Thr</u>	Gln	Ser		
ppy1/ 7			Leu	<u>Val</u>	Ala	<u>Lys</u>	Pro	His	Met	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	Asn	Leu										
ppy2/ 10													His	Asn	Trp	Tyr	Met	Trp	<u>Pro</u>	<u>Ser</u>	Phe	Leu	Arg	His
ppy2/ 17								Tyr	The	Pro	<u>Thr</u>	<u>Ser</u>	Phe	<u>Pro</u>	Asp	Ala	Ala	<u>Pro</u>	Phe					
ppy2/ 14		Gln	Ser	Leu	Pro	His	Pro	Asn	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ile	<u>Thr</u>											
ppy2/ 4				Trp	His	Trp	Gln	Tyr	<u>Thr</u>	Pro	Trp	Trp	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Ser</u>									
ppy2/ 3								Asn	Met	Phe	Gly	Ser	Leu	Thr	<u>Ser</u>	<u>His</u>	<u>Val</u>	Thr	Ala					
ppy2/ 1		His	<u>Ser</u>	<u>His</u>	Thr	His	<u>Lys</u>	Ala	Leu	Ala	.....	.....	.....	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>								
ppy2/ 5								Leu	Ile	His	Phe	Pro	Val	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Asn</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	Val					
ppyP 14				Met	Lys	Glu	Thr	His	Ser	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	His	Gln	Pro										
ppyP 11 y 13								Asn	Glu	Met	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	Met	Asn	Met	Ala	Ala					
ppyP 8 y 16						Ala	Trp	Thr	His	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Pro</u>	Asp								
ppyP 17								Leu	Glu	Pro	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	Leu	<u>Pro</u>	Gln	Thr	Leu					

**Tabla 4 :** Se presentan las clonas del grupo 1; es decir las clonas de ppy1, ppy2 y ppyP que presentan cierta homología con la fracción de los primeros 20 aa. de TPmy, pero carentes de ciertos residuos importantes.

El análisis de inmunoreactividad de las clonas de ppy 1, ppy 2 y ppyP reveló que éstas fueron bien seleccionadas por ASppy y por ppyP, ya que algunas reaccionaron tanto como el extremo amino terminal del Ag B y el VW 2-1, utilizado como control positivo, lo que sugiere que hubo una reactividad específica entre los péptidos expresados en su superficie y los anticuerpos previamente generados contra TPmy (figuras 11 y 13).

Al realizar la secuenciación se observó que las clonas fágicas seleccionadas muestran homología alta o parcial con la fracción más inmunogénica del péptido (Arg 10 – Thr 16) (Gazarian, y cols. 2000)<sup>Error! No se encuentra el origen de la referencia.</sup> a partir del cual fueron obtenidas. Debido a esto y para facilitar su análisis se decidió dividir las en dos grupos. El grupo 1 presenta las clonas con homología hacia la fracción de los primeros 20 aa de TPmy, pero carentes de ciertos residuos importantes (Tabla 4). En el grupo 2 se muestran las clonas cuyos péptidos presentaron mayor homología con el motivo Arg10-Thr16 y en los que las sustituciones de los residuos en la secuencia peptídica fueron conservativas en la mayoría de los casos (Tabla 5).

## Grupo 2.

### Grupo 2

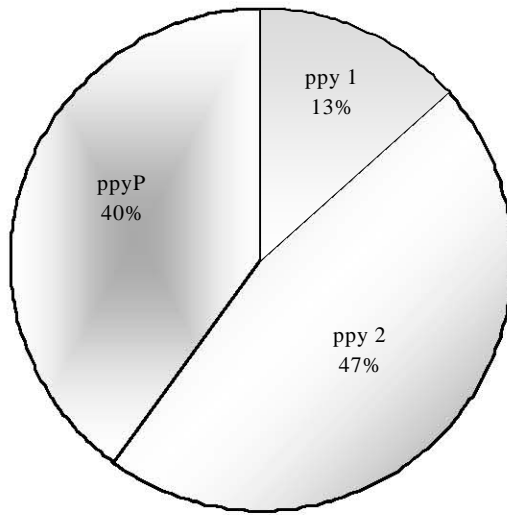
Aminoácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TPmy	Met	<u>Ser</u>	Glu	<u>Ser</u>	His	Val	Lys	Ile	Ser	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Arg</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Ser	<u>Pro</u>	Ser	Thr
Clonas																				
ppy 1/ 1, 11, 15								Ser	Tyr	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Thr</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Leu	Ile	Thr	
ppy 2/ 6, 8, 11, 13, 16, 18									Phe	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Ala	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	Gln	Phe	Tyr
ppyP1, 3, 6, 10							Ser	Leu	Ser	<u>Arg</u>	<u>Met</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Leu	His	<u>Pro</u>	
ppyP 2								Asp	Ile	<u>Arg</u>	<u>Gln</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ile</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Leu	His	<u>Pro</u>	
ppyP 18									His	<u>Arg</u>	<u>Val</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Ser	Ala		
ppyP 4							His	Ile	Ala	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ala</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Asn	Leu		
ppyP 12							Phe	<u>Pro</u>	Asn	<u>Arg</u>	<u>Thr</u>	Pro	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Gly</u>	<u>Thr</u>	Thr	Trp		

**Tabla 5 :** Se presentan las clonas del grupo 2; es decir las clonas de ppy1, ppy2 y ppyP que presentan mayor homología con la fracción de los primeros 20 aa. de TPmy que las del grupo 1.

En las figuras 14 y 15, se muestran los porcentajes de las clonas pertenecientes a cada set de experimentos en los grupos 1 y 2 que presentaron homología con la secuencia de TPmy.

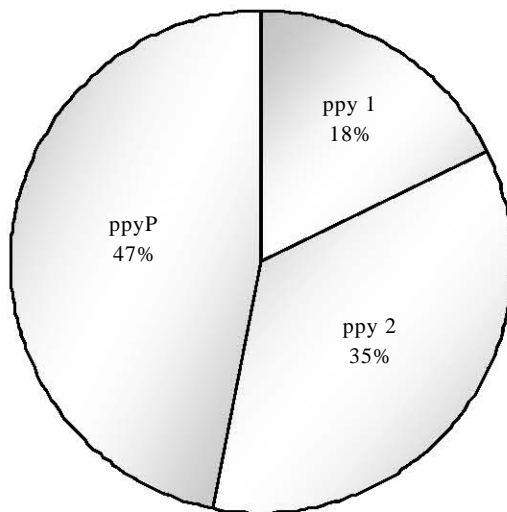
Los péptidos del grupo 2 que presentan mayor homología con la secuencia a comparar son de las clonas ppyP (47%).

**Grupo 1**



**Figura 14** : Porcentaje de las clonas inmunoreactivas de cada set de experimentos, que presentaron cierta homología con la secuencia de TPmy

**Grupo 2**



**Figura 15** : Porcentaje de las clonas inmunoreactivas de cada set de experimentos, que presentaron mayor homología con la secuencia de TPmy



El análisis anterior parece proveer suficiente información estructural para mapear en la región Arg10 a Thr16 (o hasta Pro18) de TPmy el epítipo específico a los anticuerpos que los péptidos seleccionados describen. El epítipo mapeado es una estructura lineal que contiene un extremo amino terminal hidrofílico (arginina 10), seguido por una tira hidrofóbica.

Se cree que los epítipos lineales son escasos o nulos en las proteínas (Geysen y cols. 1986)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>. Sin embargo, los anticuerpos son capaces de seleccionar péptidos miméticos que contienen sólo partes lineales de epítipos discontinuos (Beatti, y cols. 1996. Orlandi y cols. 1997)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>, <sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>. La región revelada de TPmy homóloga a los péptidos seleccionados también puede representar parte de un epítipo discontinuo.

De estas observaciones se infiere una relación con estos resultados y el hecho de haber realizado una pre-elución con amortiguador de glicina pH 4.0, ya que en la fracción eluída a este pH debieron quedar los fagos que expresaban péptidos de mediana afinidad a ppyP (figura 12). Ya que con ASppy se hicieron cuatro rondas de panning y con ppyP sólo tres y fue la única diferencia entre ambos procesos de selección porque la última ronda con ASppy también se realizó en fase líquida, pero sin la modificación de la pre elución.

Otra explicación para esto es que con ASppy es el antisuero contra TPmy directamente obtenido del conejo, en él se pueden encontrar muchos más anticuerpos que reaccionen contra todos los inmunógenos a los que estuvo expuesto el animal. Al utilizar ppyP se trata únicamente de la fracción IgG purificada del suero del conejo inmunizado contra el Ag B, lo que reduce considerablemente el número de moléculas de anticuerpos que puedan tener actividad contra otros inmunógeno; ya que en el isotipo IgG se ha encontrado la mayor

reactividad contra la paramiosina de *T. solium* (Vázquez Talavera y cols. 2001)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup>

Los péptidos revelados en las secuencias del grupo 2 son de gran importancia ya que no sólo muestran mimetismo con la molécula, sino, también homología.

Basándose en este trabajo y en la literatura (Oshima y cols. 1997. Tani y cols.1997)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup><sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> se deduce que tanto los fagos seleccionados a través de este proceso como los péptidos sintéticos con las secuencias del grupo 2 pueden funcionar como buenos antígenos inmunodominantes contra el Ag B y contra *T. solium* (Laclette y cols. 1990. Laclette y cols. 1991)<sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> <sup>*Error! No se encuentra el origen de la referencia.*</sup> y servir en la eventual producción de una vacuna contra este parásito.

Lo anterior puede ser llevado a cabo utilizando los péptidos sintéticos y/o las clonas a razón de inmunógenos sabiendo de antemano los paratopos de los anticuerpos generados en este proceso, sin la necesidad de utilizar anticuerpos monoclonales, que desde la introducción se presentan como moléculas difíciles de obtener y de mantener en un laboratorio, mientras que las clonas y péptidos son de muy fácil obtención y almacenaje, siendo igualmente sencillo y más económico reproducirlos en caso de que se requirieran más de los inicialmente obtenidos para estudios posteriores como muestra esta investigación



## VII Conclusiones

1. El fragmento amino terminal de Ag B contiene un epítipo de alta inmunodominancia, ya que produjo anticuerpos de alta afinidad capaces de seleccionar una biblioteca de  $2 \times 10^9$  péptidos diferentes expresados de manera aleatoria en fagos, un grupo de péptidos con alta homología.
2. La secuencia de los péptidos seleccionados presenta similitudes y homología con el sitio amino terminal de Ag B, de los aminoácidos 10 a 18.
3. Tanto los fagos expresando los péptidos del grupo 2, como los péptidos expresados en éstos presentaron buena reacción antigénica y tienen buena oportunidad de ser utilizados como inmunógenos en trabajos posteriores en la búsqueda de una vacuna contra *T. solium*.

## VIII Bibliografía

1. Aluja, A. S., Villalobos A. N. M., Plancarte, A., Rodarte, L. F., Hernández, M., Sciutto, E. 1996. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet. Parasitol.*, 61: 49-59.
2. Baily, G. G., Mason, P. R., Trijssenar, F. E., Lyons, N. F. 1988. Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Trans R Soc Trop. Med. Hyg.* 82(2):295-299.
3. Barret, R. W., Cwirla, S. E., Ackerman, M. S., Olson, A. M., Peters, E. A., Dower, W. J. 1992. Selective enrichment and characterization of high affinity ligands from collections of random peptides on filamentous phage. *Anal. Biochem.* 204:357-364.
4. Beatti, J. Shand, J. H., Flint D. J, 1996 An immobilised peptide array identifies antibodies to a discontinuous epitope in the extracellular domain of the bovine growth hormone receptor. *Eur. J. Biochem.* 239: 479-486.
5. Bell, S., Kamm, M. 2000. The clinical role of anti-TNF $\alpha$  antibody treatment in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14, 501–514.
6. Bergquist, R., M. Al-Sherbiny, R. Barakat, and R. Olds. 2002. Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop.* 82:183-192.
7. Berman JD, Beaver PC, Cheever AW, Quindlen EA. 1981. Cysticercus of 60-milliliter in human brain. *Am J Trop Med Hyg.*30:616-19.
8. Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., Horwitz, A. H. 1988. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science.* 240, 1041–1043
9. Boulianne, G. L., Hozumi, N., Shulman, M. J. 1984. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature.* 312, 643–646
10. Bueno E. C., Vaz, A. J., Machado, L. D., Livramento, J. A., Mielle, S. R. 2000. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *J. Clin Microbiol.* 38(1):146-51.
11. Castillo, M., Salgado, P., Rojas, R., Sotelo, J., Sanches, J., Mukherji, S. K. 1996. Unusual imaging manifestations of Neurocysticercosis. *Intern. J. Neuroradiol.* 2:168-175. Ahan
12. Chan K. W., Lim P. L., Tam F. C., Li E. T., Lim B. L. 2000. Isolation of leptin-binding peptides from a random peptide phage library. *J Pept Res.* 55(4):318-324.
13. Chang, C.,C.; Hernandez-Guzman, F. G. ; Wei, L.; Xinhui, W., Ferrone, S.; Ghosh, D. 2005. Structural basis of antigen mimicry in a clinically relevant melanoma antigen system. *J. biol. Chem.* 280,(50):41546-41552.

14. Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodezky C, Flisser A 1985. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J Parasitol.* 71(5):535-41.
15. Correa, D., Sandoval, M. A., Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E., Plancarte, A., Meza-Lucas, A., Flisser, A. 1989. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:814-816.
16. Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barret, R. W., Dower, W. J. 1990. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying the ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 87: 6378-6382.
17. Davies, A., and P. J. Lachmann. 1993. Membrane defence against complement lysis: the structure and biological properties of CD59. *Immunol. Res.* 12:258-275.
18. Davies, A., D. L. Simmons, G. Hale, R. A. Harrison, H. Tighe, P. J. Lachmann, and H. Waldmann. 1989. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J. Exp. Med.* 170:637-654.
19. Del Brutto, O. H., Sotelo, J. 1987. Neurocysticercosis. *Medicina de hoy.* 6:21-40.
20. Del Brutto, O. H., Sotelo, J. 1988. Neurocysticercosis: an update. *Rev. Infect. Dis.,* 10:1075-1087.
21. Del Brutto, O. H. 1997. Neurocysticercosis. *Curr. Op. Neurol.* 10:268-272.
22. Dempster, R. P., Robinson, C. M., Harrison, G. B .L. 1996. Parasite vaccine development: A large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45(B/X) from *Escherichia coli* inclusion bodies . *Parasitol. Res.* 82:291-296.
23. Deng, J., Gold, D., Lo Verde, P., Fishelson, Z. 2003. Inhibition of complement membrana attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. *Infection ad Immunity* (71) 11:6402-6410.
24. Díaz-Camacho, S., Candil-Ruiz, A., Suate-Peraza, V., Zazueta-Ramoz, M. L., Felix-Medina, M., Lozabo, R., Willms, K., 1991. Epidemiological study control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:522-531.
25. Dixon HBF, Hargreaves WH. 1944. Cysticercosis (*Taenia solium*): a further ten years' clinical study covering 284 cases. *Q J Med.*13:107-21.
26. Dooley J.R.. 1980. Health precautions in Mexico. *The Journal of the American Medical Association* 243 : 1524.
27. Doorbar, J., Winter, G. 1994. Isolation of a peptide antagonist to the thrombin receptor using phage display. *J. Mol. Biol.* 244: 361-369.

28. Dower, W., J., Cwirla, S., E. 1994. Epitope mapping using libraries of random peptides displayed on phage. *Peptide Antigens, a Practical Approach*. Wisdom, G., B. (Ed.). IRL Press (Oxford University Press). 219-243.
29. Dower W J. 1998. Targeting growth factor and cytokine receptors with recombinant peptide libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(3):328-34.
30. Du Plessis, D. H., Wang, L., Jordaan, F. A., Eaton, B. T. 1994. Fine mapping of a continuous epitope on VP7 of bluetongue virus using overlapping synthetic peptides. *Virology* 198:346-349.
31. Dybwad, A., Forre O., Kjeldsen-Kragh J., Jacob B., Natvig, J. B, Sioud M. 1993 Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur. J. Immunol.* 23: 3189-3193.
32. Dybwad, A., Bogen, B., Natvig, J. B., Forre, O., Sioud, M. 1995. Peptide phage libraries can be an efficient tool for identifying antibody ligands for polyclonal antisera. *Clin. Exper. Immunol.* 102:438- 442.
33. Dybwad, A., Forre, O., Natvig, J.B., Sioud, M. 1995. Structural characterization of peptides that bind synovial fluid antibodies from RA patients: a novel strategy for identification of disease-related epitopes using a random peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 75(1): 45-50.
34. Escobedo, F., 1988. Tratamiento de neurocisticercosis humana con albendazole evaluación controlada con tomografía computarizada y con resonancia magnética. *Rev. Asoc. Guatemalteca Parasitol Med. Trop.* 3:24-26.
35. Espinoza, B., Ruiz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M., Plancarte, A., Flisser, A. 1986. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral response in patients with neurocysticercosis and its applications in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24:536-41.
36. Feldman, M., Plancarte, A., Sandoval, M., Wilson, M., Flisser, A. 1990. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:559-62.
37. Felici, F., Castegnoli, L., Musachio, A., Jappelli, R., Cesarebi, G. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* 222:301-310.
38. Felici, F., Luzzago, A., Folgiori, A., Cortese, R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries. *Genes* 128:21-27.
39. Felleisen, R., Muller, N., Yamage, M., Gottstein, B. 1996. Diagnostic PCR in veterinary parasitology: tritrichomonosis, neosporosis/toxoplasmosis echinococcosis/cysticercosis. *Schweiz-Arch-Tierheilkd.* 138(3): 144-51.

40. Flisser, A., Woodhouse, E., Larralde, C. 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39:27-37.
41. Flisser, A. 1985. Cysticercosis: a major threat to human health and livestock production. *Food technol.* 39:61-64 .
42. Flisser, A., Madrazo, I., Gonzalez, D., Sandoval, M., Rodriguez-Carbajal, J. 1988. Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 739-742.
43. Flisser, A., Plancarte, A., Correa, D. 1991. *Taenia solium* Cysticercosis: a review. *Res. Rev. Parasitol.* 51:17-23.
44. Flisser, A. 1994. Teniosis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Tsieh Sun (Ed.), *Progress in Clinical Parasitology*, v.4. CRC Press, Boca Raton. 77-116.
45. Flisser, A., Plancarte, A., Avila, G., 1994. III. Aplicación de Métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniosis a estudios epidemiológicos. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 37(2):21-38.
46. Folgori, A., Tafi, R., Meola, A., Felici, F., Galfré, G., Cortese, R., Monaci, P., Nicosia, A. 1994. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J.* 13:22-36.
47. García, H. H., Gilman, R. H., Horton, J. J., 1997. Albendazole therapy for neurocysticercosis: A prospective double blind trial comparing 7 versus 14 days of treatment. *Neurology.* 48- 1421-7.
48. García, H. H., Gilman, R. H., Martínez, M., 1993. Cisticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. *Lancet.* 341:197-200.
49. García, H. H., Herrera, H., Gilman, R. H., Tsang, V. C. W., Pilcher, J. B., Díaz, J. F., Candy, E. J., Miranda, E., Naranjo, J., 1994. The cysticercosis Working Group in Peru. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50:152-157.
50. Gazarian, K. G., Gazarian T. G., Solis, C. F., Hernández, R., Shoemaker, C. B., Lacleite, J. P. 2000. Epitope mapping on N- terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Imm. Letters (72)* 191-195.
51. Gazarian. K. G. Rowleyb, T. G. Gazarian T. G., J. Sotelo, J. García-Mendoza. E and Hernández. A. R. 2001. Post-Panning Computer-Aided Analysis of Phagotope Collections Selected with Neurocysticercosis Patient Polyclonal Antibodies: Separation of Disease-Relevant and Irrelevant Peptide Sequences. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening: 4 (3).* 221-235
52. Gemmel, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E.JL., Larralde, C., Nelson, GS., Rosick, B. 1983. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. *VPII/83.49.* World Health Organization, Geneva 1-207.



53. Gevorkian G., Manoutcharian, K., Larralde, C., Hernández, M., Almagro, J. C., Viveros, M., M., Sotelo, J., Garcia, E., Sciutto, E. 1996 Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Letters*. 49:185-189.
54. Gevorkian G, Manoutcharian K, Almagro J. C, Govezensky T, Dominguez V. 1998. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86(3):305-9.
55. Geysen, H. M., Rodda, S. J., Mason, T. J. 1986. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol. Immunol.* 23:709-715.
56. Green, L. L. 1999. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 231, 11–23.
57. Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L., Laclette, JP. 1982. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium* Cysticercosis, Present state of knowledge and perspectives, New York academic Press. 437-51.
58. Hammond F, Cavanagh A, Morton H, Hillyard N, Papaioannou A, Clark M, Wanigesekera D, Swanton M, Ward R. 2000. Isolation of antibodies which neutralise the activity of early pregnancy factor. *J. Immunol. Methods.* 20;244(1-2):175-84.
59. Hodits, R. A., Nimpf, J., Pfistermueller, D. M., Hiesberger, T., Schneider, W. J., Vaughan, T. J., Johnson, K. S., Haumer, M., Kuechler, E., Winter, G., Blaas, D. 1995. An antibody fragment from a phage display library competes for ligand binding to the low density lipoprotein receptor family and inhibits rhinovirus infection. *J.B.C.* 270:24078-24085.
60. Jellis, C. L., Gradic, T. J., Rennert, P., Salinas, P., Boyd, J., Amirault, T., Gray, G.S. 1993. Defining critical residues in the epitope for a HIV-neutralizing monoclonal antibody using phage display and peptide array technologies. *Gene.* 137:63-68.
61. Johnson, K. S., Chiswell, D. J. 1993. Human antibody engineering. *Curr. Op. Struct. Biol.* 3:564-571.
62. Kay, B. K., Adey, N. B., He, Y.-S., Manfredi, J. P., Mataragnon, A. H., Fowlkes, D. M. 1993. An M13 phage library displaying random 38-amino- acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene.* 128:59-65.
63. Keilbach, N., Aluja, A. S., de; Sarti-Gutiér, E., Rez, E. 1989. A program to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*): experiences in a Mexican village. *Acta Leiden.* 57:181-189.
64. Keller, P. M., Arnold, B. A., Shaw, A. R., Tolman, R. L., Middlesworth Van, F., Bondy, S., Rusicki, V. K., Koenig, S., Zolla-Pazner, S., Konard, P., Emini, E. A.,

- Conley, A. J. 1993. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. *Virology*. 193:709-716.
65. Kennedy, P. G. E., Johnson, R. T. (Eds). 1987. *Infections of the nervous system*. Butterworths, London. 145-155.
66. Khazaeli, M. B., Conry, R. M. LoBuglio A. F. 1994. Human response to monoclonal antibody. *J. Immunother.* 15, 42-52.
67. Ko, R. C., Ng, T. F. 1998. Specificity of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis. *Parasitol. res.* 84:565-569.
68. Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 7;256(5517):495-7.
69. Koivunen, E., Wang, B., Ruoslahti, E. 1994. Isolation of a highly specific ligand for the  $\alpha 5\beta 1$  integrin from a phage display library. *J. Cell Biol.* 124:373-380.
70. Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Plückthun, A., 1995. Co-selection of cognate antibody-antigen pairs by selectively-infective phages. *FEBS Letters.* 377:227-231.
71. Kunz, J., Kalinna, B., Watschake, V., Geyer, E. 1989. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralbl. Bacteriol.* 272:510-516.
72. Laclette, J. P., Merchant, M. T., Wilms. K. 1987. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J Parasitol.* 73(1):121-9.
73. Laclette J. .P., Alagon A, Willms K, Torre-Blanco A. 1990. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol.* 76(2):273-5.
74. Laclette J. P., Landa A, Arcos L, Willms K, Davis A.E., Shoemaker C. B.. 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol.* 44(2):287-95.
75. Laclette J. P., Shoemaker C. B., Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol.* 1;148(1):124-8.
76. Lanar, D. E., E. J. Pearce, S. L. James, and A. Sher. 1986. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 234:593-596.
77. Landa. A., Merchant, H., Willms, K., Laclette, J. P. 1994. Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *taenia solium* (cestoda) cysticerci. *Int. J. Parasitol.* 24:265-269.

78. Lane, D. P., Stephen, C. W. 1993. Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries. *Curr. Opin. Immunol.* 5:268-271.
79. Larralde, C., Montoya, R. M., Sciutto, E., Díaz, M. L., Govézensky, T., Coltorti, E. 1989. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:284-292.
80. Larralde C., Sotelo, J., Montoya, R. M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz M. L. Sciutto, E. 1990. Antigens from murine *Taenia crassiceps* effectively substitute those from porcine *Taenia solium* in immunodiagnosis for human neurocysticercosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114:926-928.
81. Larrick, J. W., Fry, K. E. 1991. Recombinant antibodies. *Hum Antibodies Hybridomas* 2: 172- 189.
82. Loukas, A., M. K. Jones, L. T. King, P. J. Brindley, and D. P. McManus. 2001. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infect. Immun.* 69:3646-3651.
83. Lu J, Sloan S. R. 1999. An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies. *J. Immunol. Methods* 31;228(1-2):109-119.
84. Luo A. M., Fox J. W., Chen L, Bolton W. K.. 2002. Synthetic peptides of Goodpasture's antigen in antiglomerular basement membrane nephritis in rats. *J Lab Clin Med.* 139(5):303-310
85. Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A., Cortese, R. 1993. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene.* 128:51-57.
86. Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. F., Sciutto, E. 1996. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82:250-254.
87. Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Govezensky T. 1998. Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunol. Lett.* 62(3):131-136.
88. Manoutcharian K, Sotelo J, Garcia E, Cano A, Gevorkian G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. *Clin Immunol* 1999 Apr;91(1):117-121.
89. Manoutcharian K, Terrazas L. I, Gevorkian G, Acero G, Petrossian P, Rodriguez M, Govezensky T. 1999. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 67(9):4764-4770.

90. Manoutcharian K, Terrazas L. I, Gevorkian G, Govezensky T. 1999. DNA pulsed macrophage-mediated cDNA expression library immunization in vaccine development. *Vaccine*. 14;18(5-6):389-391.
91. Markwalder K, Hess K, Valavanis A,. 1984. Cerebral cysticercosis: treatment with praziquantel. *Am J Trop Med Hyg* 33:273-280, 1984.
92. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., Chiswell, D. J. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552–554.
93. McLafferty, M. A., Kent, R. B., Ladner, R. C., Markland, W. 1993. M13 Bacteriophage displaying disulfide-constrained microproteins. *Gene*. 128:29-36.
94. Medina M. T., Rosas, E. Rubio-Donnadieu, F., Sotelo, J. 1990. Neurocysticercosis as the main cause of late onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern. Med*. 150:323-325.
95. Meola A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R., Galfre, G. 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. *J. Immunol*. 154:3162-3172.
96. Meri, S., B. P. Morgan, A. Davies, R. H. Daniels, M. G. Olavesen, H. Waldmann, and P. J. Lachmann. 1990. Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology* 71:1-9
97. Miceli, R. M., DeGraaf, M. E., Fischer, H. D. 1994. Two-stage selection of sequences from a random phage display library delineates both core residues and permitted structural range within an epitope. *J. Immunol. Methods*.167:279-287.
98. Molinary, J. L., Soto, R., Tato, P., Rodrigez, D., Retana, A., Sepúlveda, J., Palet, A. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 49:502-512.
99. Montero, R., Ostrosky, P. 1997. Genotoxic activity of Praziquantel. *Mut. Res*. 387:123-139.
100. Mora, Rubio, Vergara, J., Toro, G. 1978. Neurocisticercosis en infecciones del sistema nervioso central. Edit. Fondo Educativo Interamericano: 267-283.
101. Morrison S. L., Johnson M. J., Herzenberg, L. A., Oi, V. T. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 21, 6851–6855.
102. Moses, Winberg, 1911, citado por Mora y cols. (Ref. 0.)
103. Nascimento E, Tavares C. A, Lopes J. D.1987. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*. 25(7):1181-1185.

104. Noble, E. R. (Ed.), 1989, The Biology of animal parasites, 6th edition. Lea & Febiger, Philadelphia, London.
105. Nogales-Gaete, J., Arriagada, R. C., Salinas, R. R. 2006. Treatment of neurocysticercosis: A review. Rev. Méd. Chile; 134: 789-796.
106. Ordoñez, G., Medina, M. T., Sotelo, J. 1996. Immunoblot analysis of serum and CSF from patients with various forms of neurocysticercosis. Neurological Infections and Epidemiol. 1:57-61.
107. Orlandi, R., Ménard, S., Colnagi, M., Boyer, C. M., Felici, F. 1994. Antigenic and immunogenic mimicry of the HER2/neu oncoprotein by phage displayed peptides. Eur. J. Immunol. 24:2868-2873.
108. Orlandi, R., Formantici, C., Ménard, S., Boyer, C. M., Wiener, J. R., Colnagi, M. 1997 A linear region of a monoclonal antibody conformational epitope mapped on p185HER2 oncoprotein. Biol. Chem. 378 (11): 1387-1392.
109. Oshima M., Hayakari M., Middlebrook J.L., Atassi M.Z. 1997 Immune recognition of botulinum neurotoxin type A: regions recognized by T cells and antibodies against the protective H(C) fragment (residues 855-1296) of the toxin. Mol Immunol. 34(14):1031-40.
110. Parizade, M., R. Arnon, .P. J. Lachmann, and Z. Fishelson. 1994. Functional and antigenic similarities between a 94-kD protein of *Schistosoma mansoni* (SCIP-1) and human CD59. J. Exp. Med. 179:1625-1636
111. Parmley, S. F., Smith, G. P. 1988. Antibody selectable fd phage vectors: affinity purification of target genes. Genes. 73:305-318.
112. Parmley S. F, Smith G. P. 1989. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218.
113. Petersen, G., Song, D., Hügle-Dörr, B., Oldenburg, I., Bautz, R. K. F. 1995. Mapping of Linear epitopes recognized by monoclonal antibodies with gene-fragment phage display libraries. Mol. Gen. Genet. 249:425-431.
114. Pinilla, C., Appel, J. R., Houghten, R. A. 1993. Functional importance of amino acid residues making up peptide antigenic determinants. Molecular Immunol., 30(6): 577-585.
115. Plancarte A, Flisser A, Larralde C. 1983. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. Cytobios. 1983;36(142):83-93.
116. Plancarte, A., Espinoza, B., Flisser, A. 1987. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Child's Nerv. Syst. 3:203-205.

117. Plancarte, A., Fexas, M., Flisser, A., 1994. Reactivity in ELISA and Dot Blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 24:733-738.
118. Preux, P. M., Melaku, Z., Druet-Cabanac, M., Avode, G., Grunitzky, E., K., Bouteille, Cruz, M., Durnas, M. 1996. Cysticercosis and neurocysticercosis in Africa: current status. *Neurol. Infect. Epidemiol.* 1:63-68.
119. Ramanujam P, Tan WS, Nathan S, Yusoff K. 2002. Novel peptides that inhibit the propagation of Newcastle disease virus. *Arch Virol.* 147(5):981-993.
120. Ramirez, B. L., J. D. Kurtis, P. M. Wiest, P. Arias, F. Aligui, L. Acosta, P. Peters, and G. R. Olds. 1996. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol.* 18:49-52.
121. Ramírez S. O. 1998. Detección de epítomos de *Taenia solium* por medio de "Phage Display". Tesis para obtener el grado académico de L.I.B.B.
122. Ramon-Kuri, M., Montoya, R. M., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M. L., Sciutto, E., Sotelo, J., Larralde, C. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 49:633-636.
123. Rodríguez-del-Rosal, E., Correa, D., Flisser, A. 1989. Swine cysticercosis: Detection of parasite products in serum. *Vet. Rec.* 124: 488.
124. Rollins, S. A., J. Zhao, H. Ninomiya, and P. J. Sims. 1991. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J. Immunol.* 146:2345-2351.
125. Rosas, N., Sotelo, J., Nieto, D. 1986. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 43(4):353-356.
126. Salazar, A., Sotelo, J., Martinez, H., Escobedo, F. 1983. Differential diagnosis between ventriculitis and fourth ventricle cyst in neurocysticercosis. *J. Neurosurg.* 59:660-663.
127. Schmidt, G. D., Roberts, L. S. 1989. *Foundations of Parasitology*. 4<sup>th</sup> Edition. 313-378.
128. Sciutto, E. Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L. F., Hernandez, M., Villalobos, M. N., Padilla, A., Kelbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S., Larralde, C. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60:53-67.
129. Sciutto, E., Hernández, M., Garcia, G., de Aluja, A. S., Villalobos, A. N. M., Rodaste, L. F., Parkhouse, M., Harrison, L. 1998. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.* 14:1-10.

130. Scott, J. K., Smith, G. P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 249:386-390.
131. Sela, M. (Ed.), 1974. *The antigens Vol. II*. Academic Press. New York.
132. Sioud, M., Dybwad, A., Jespersen, L., Suleyman, S Natvig, J. B., Forre, O. 1994. Characterization of naturally occurring autoantibodies against tumour necrosis factor-alpha (TNF-a): in vitro function and precise epitope mapping by phage epitope library. *Clin. Exper. Immunol.* 98:520-525.
133. Skerra, A., Plückthun, A. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038–1041.
134. Smith G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 14; 228(4705):1315-1317.
135. Sompuram S. R., Kodela V, Ramanathan H, Wescott C, Radcliffe G, Bogen S. A. 2002. Synthetic peptides identified from phage-displayed combinatorial libraries as immunodiagnostic assay surrogate quality-control targets. *Clin Chem.* 48(3):410-420.
136. Sotelo J, Escobedo F, Rodriguez-Carbajal J, Torres B, Rubio-Donnadieu F. 1984. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N Engl J Med.* 310(16):1001-1007.
137. Sotelo, J., Del Brutto, O. H. 1987. Therapy of neurocysticercosis. *Child's Nerv. Syst.* 3:208-211.
138. Sotelo, J., Guerrero, V., Rubio, F. 1985. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. *Archives of Internal Medicine* 145:442-445.
139. Sotelo, J., Marin, C. 1987 Hydrocephalus secondary to cysticercosis arachnoiditis. *J. Neurosurg.* 66:686-689.
140. Sotelo, J., Torres, B., Rubio-Donnadieu, F., Escobedo, F., Rodríguez-Carbajal, J. 1985. Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. *Neurology.* 35:752-755.
141. Stephen, C. W., Helminen, P., Lane, D. P. 1995. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *JMB.* 248:58-78.
142. Tani, Y., Tiwana, H., Hukuda, S., Nishioka, J., Fielder, M., Wilson, C., Bansal, S., Ebringer, A. 1997. Antibodies to *Klebsiella*, *Proteus*, and HLA-B27 peptides in Japanese patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24, 109-114.
143. Teixeira, F., Flisser, A., Plancarte, A., Madrazo, I., Flores, I., Aguilera, M. C., Tornel, O. 1990. Inflammatory reaction induced by antigen B from *Taenia solium*

- cysticercus in the subarachnoid space of mice. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 32:285-289.
144. Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K, Hernandez, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Garfias, C. K., Vazquez, R., Terrazas, I., Sciutto, E. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67(5):2522-2530.
  145. Tsang, C. W. V., Brand, J. A., Boyer, A. E. 1989. An Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Inf. Dis.* 1:50-59.
  146. Valdez, F., Hernández, M, Govezensky, T., Fragoso, G., Sciutto, E. 1994. Immunization against *T. crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. of Parasitol.* 80:931-936.
  147. Vázquez-Talavera, J., Solis, C. F., Terrazas, L. I., Laclette, J. P. 2001. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Inf. and Imm.* 9 (69) 5412-5416.
  148. Veronese, F. D. M., Willis, A. E., Boyer-Thompson, C., Appella, E., Perham, R. N. 1994. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V loop of HIV-1 gp120. *J. Mol. Biol.* 243:167-172.
  149. Villanueva, M., Alcocer, J., Martínez J., Horna, A., 2004. Cisticercosis Intramedular *Arch. Neurocién.* 9(2):110-113
  150. Waterhouse, P., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Winter, G. 1993. Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acid Res.* 21:2265-2266.
  151. Willis, A. E., Perham, R. N., Wraith, D. 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Genes.* 128:79-83.
  152. Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455.
  153. Yip Y. L, Ward R. L. 1999. Epitope discovery using monoclonal antibodies and phage peptide libraries. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2(3):125-138.
  154. Young, R. A., Bloom, B. R., Grosskinsky, C. M., Ivany, J., Thomas, D., Davis, R. W. 1985. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:2583-2587
  155. Zwick M. B, Shen J, Scott J K. 1998. Phage-displayed peptide libraries. *Curr Opin. Biotechnol.* 9(4):427-436.