



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN DE MIMÓTOPOS DEL
ANTÍGENO P36 PARA DIAGNÓSTICO DE
LA TENIASIS CAUSADA POR *T. solium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :

MARCO ANTONIO ROMO LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Abel Gutiérrez Ramos
VOCAL:	Enrique Ortega Soto
SECRETARIO:	Abraham Landa Piedra
1er. SUPLENTE:	José Cordero Hernández
2° SUPLENTE:	Julio César Martínez Álvarez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BILOGÍA MOLECULAR DE *Taenia solium* DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA. ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE APOYADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) CON EL CONTRATO 80134-M (DESARROLLO DE FÁRMACOS BIOLÓGICOS CONTRA *Taenia solium*). ASÍ MISMO, DE LOS PROYECTOS DGAPA PAPIIT, CONTRATOS IN206708 (UTILIZACIÓN DE ENZIMAS GLICOLÍTICAS EN EL CONTROL DE CISTICERCOSIS). EL ALUMNO MARCO ANTONIO ROMO LÓPEZ RECIBIÓ BECA DEL PROYECTO PAPIITIN206708

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Abraham Landa Piedra

SUSTENTANTE:

Marco Antonio Romo López

***Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la
energía atómica: la voluntad***

Albert Einstein (1879-1955). Científico alemán nacionalizado estadounidense.

A Gabriela López Covarrubias, quien me dio la vida y me ha guiado a través de ella con infinito amor, comprensión y sabiduría, porque simplemente sin ella... yo no estaría aquí.

GRACIAS MAMÁ, esto es por ti y para ti.

Más dedicatorias...

A mi padre Marco Antonio Romo Gil, porque junto con mi madre me diste la vida y porque indirectamente hiciste que aquel niño vulnerable que yo era se convirtiera en hombre.

A mi hermana Sandra Romo López, porque después de 13 años de no vernos, la vida nos permitió volver a encontrarnos y nos permitirá seguir haciéndolo.

A mi primo Ricardo Baltazar Covarrubias, por ser como mi hermano y uno de mis ejemplos a seguir, porque cuando necesité de ayuda tú estuviste ahí para respaldarme.

A Ceci Medina-Mora, por haber llegado a mi vida y mostrarme algo que yo creía que jamás podría volver a hacer: Enamorarme.

Mis agradecimientos.

Al voleibol, que fue parte de mi vida durante 15 increíbles años, porque me guió hacia un camino sano y de provecho, y porque me dio uno de los más grandes tesoros de la vida: Amigos verdaderos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formar parte no sólo de su gran comunidad estudiantil, sino también de su ejemplar símil deportivo.

Al Dr. Abraham Landa Piedra, por haberme dado la oportunidad y la confianza para realizar este trabajo, además de su apoyo y sincera amistad.

A Alicia Ochoa Sánchez un agradecimiento especial por todo tu apoyo, tiempo, paciencia, enseñanzas y disponibilidad, ya que sin todos esos tips y consejos este trabajo no hubiera sido posible.

A mis sinodales Enrique Ortega Soto y Abel Gutiérrez Ramos por la revisión final y correcciones hechas a este trabajo.

A Odín Pérez Ruiz por haber estado ahí a pesar de todo, por su noble y sincera amistad.

A Víctor Sanabria Ayala por haberme enseñado que no se debe juzgar a las personas por su apariencia.

A Martha Lilia Robledo Maldonado, por su apoyo incondicional y por haber sido parte de mi vida durante casi 3 años, porque fue parte de mi aprendizaje, y porque sin ella esto no hubiera sido posible. Te deseo lo mejor de todo corazón y siempre te estaré infinitamente agradecido.

Al Dr. Marco Antonio Caballero Gómez por ser un excelente médico, amigo y confidente de mi familia.

A mi Tío Alfonso por todo el apoyo y cariño que me ha brindado.

A mis amigos, que digo amigos, mis hermanos del equipo Sioux: Edgar, Rubén (sé que Dios te tiene en su gloria carnal), Fernando, Horacio, Carlos, Nahum, Rafa, Sinhué y sus respectivas familias, con quienes viví una de las etapas más lindas de mi vida, por quererme y aceptarme tal y como soy.

Al profesor Jesus Alfredo Rodríguez Gálvez, por haber sido un ejemplo y guía en una de las etapas críticas de mi vida, por sus enseñanzas y consejos.

A Alejandro Castillo Peralta, por su hermandad y apoyo durante estos casi 7 años.

A Norma Angélica Camacho Jasso y su linda familia, porque siempre me trataron de una forma excepcional.

A mis compañeros de laboratorio: Richie, Oscar, Omar, Vera Teresa, Aramis y Julián.

A mis amigos de la Facultad de Química: Bisbi, Abril, Cangas, Ivette, Ricky, Alma Duarte, Omar (güero), Ran, Paola, Jocabed, Josué, Juan, Gaby, Arita, Amri y Ariadna.

A todo el equipo de voleibol de la UNAM (Tadeo, Renato, Diego, Pancho, Sansiel, Zamora, Buzz, Chino, Juanito, Emilio, Dany, Pablo, Vikingo, Juan Murillo y el coach Sergio Hernández), por todos esos momentos que vivimos juntos y sobre todo por enseñarme una de las virtudes más importantes en la vida: la humildad

A todos ustedes, sin importar si estuvieron en una etapa de mi vida o siguen presentes en ella, de todo corazón: **GRACIAS**.

Índice

Abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.2 <i>Taenia solium</i>	6
1.2.1 Generalidades del parásito.....	6
1.2.1.1 Morfología.....	6
1.2.1.1.1 Gusano adulto.....	6
1.2.1.1.2 Cisticerco.....	9
1.2.1.1.3 Huevo.....	11
1.2.1.2 Sistema reproductor.....	12
1.2.2 Ciclo de vida.....	13
1.2.3 Manifestaciones clínicas.....	16
1.2.3.1 Teniasis.....	16
1.2.3.2 Cisticercosis.....	16
1.2.4 Respuesta inmune del hospedero.....	17
1.2.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune.....	17
1.2.6 Diagnóstico.....	18
1.2.6.1. Teniasis.....	18
1.2.6.2 Cisticercosis.....	19
1.2.7. Tratamiento.....	20
1.2.7.1 Teniasis.....	20
1.2.7.2 Cisticercosis.....	21
1.2.8 Medidas de control.....	22
1.3 Antígenos de Excreción/Secreción.....	22
1.3.1. Antígeno diagnóstico P36.....	23
1.3.2 Mimótopos.....	23
1.4 Despliegue en fagos.....	24
1.4.1 Fagos filamentosos.....	24
1.4.1.1 Proteína III.....	25
1.4.1.2 Proteína VIII.....	25

1.5 Fago M13KE.....	27
2. Hipótesis.....	28
3. Objetivo general.....	28
3.1 Objetivos particulares.....	28
4. Materiales y Métodos.....	29
4.1 Reactivos químicos y equipos.....	29
4.1.2 Reactivos biológicos.....	29
4.1.3 <i>Escherichia coli</i> (Cepa TG1).....	29
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Obtención de los antígenos de Excreción – Secreción (AgE/S) del adulto de <i>Taenia solium</i>	30
4.2.2 Cuantificación de los antígenos de E/S por el método de Lowry.....	30
4.2.3 Producción de suero hiperinmune α – AgE/S.....	31
4.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (PAGE – SDS).....	31
4.2.5 Inmunoblot.....	31
4.2.6 Elución de anticuerpos específicos del suero α – P36.....	32
4.2.7 Titulación de la biblioteca de fagos PhD12.....	32
4.2.7 Selección de mimótopos.....	33
4.2.8 Amplificación de fagos.....	34
4.2.9 Selección de clonas de fagos.....	34
4.2.10 Preparación de ADN de fagos para secuencias.....	35
4.2.11 Inmunización de conejos para producción de sueros antimimótopos...	35
4.1.12 Ensayo de Inmunoblot con los sueros antimimótopos.....	36
5. Resultados.....	37
6. Discusión.....	44
7. Conclusiones.....	46
8. Anexos.....	47
9. Referencias.....	52

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
Aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
AND	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNcs	Ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla
Ag	Antígeno
AgE/S	Antígenos de Excreción/Secreción
BSA	Albúmina sérica bovina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
IET	Inmoelectrotransferencia
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mL	Mililitro
Mm	Milimetro
mM	Milimolar
NCC	Neurocisticercosis
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
PBS	Amortiguador salino de fosfatos pH 7.4
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
Pfu	Unidad formadora de placa
pH	Potencial de hidrógeno
Pmol	Picomoles
RM	Resonancia magnética
Rpm	revoluciones por minute
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS–PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
TBS	Amortiguador Tris/Ácido Bórico/EDTA/NaCl
TBST	TBS+Tween 20 0.1%
TC	Tomografía computarizada
TE	Amortiguador Tris-HCl/EDTA pH 7.4
TED	Amortiguador Trietanolamina/EDTA/ditiotreitol
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
V	Voltios
X – Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

Resumen

La teniasis y la cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son problemas de salud pública. El ciclo de vida de este parásito requiere de un hospedero intermediario, el cerdo, para la formación del cisticerco y un hospedero definitivo, el humano, para el desarrollo del adulto. La teniasis humana es una enfermedad intestinal adquirida por el consumo de carne infectada con cisticercos. El ciclo de vida se continúa cuando los cerdos ingieren heces humanas con huevos del adulto, lo que les causa la cisticercosis porcina. Los humanos pueden actuar en esta parte del ciclo como hospederos accidentales. La manifestación más grave de la cisticercosis humana es la neurocisticercosis que frecuentemente causa discapacidad física y en ocasiones la muerte. La detección de humanos portadores del adulto, se ha convertido en un elemento clave para el desarrollo de estrategias de control de la enfermedad. Clásicamente la teniasis ha sido identificada por exámenes parasitológicos que no son específicos ni sensibles, observando la materia fecal, para identificar huevos, proglótidos y escólex. Los antígenos de excreción/secreción (AgE/S) del adulto son una compleja mezcla de proteínas y otros compuestos provenientes del metabolismo del gusano, y los anticuerpos contra estos antígenos pueden ser considerados como un indicativo de la presencia de un parásito vivo.

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar mimótopos obtenidos con anticuerpos anti-P36 (antígeno de los Ag E/S del adulto de *T. solium*) de una biblioteca de péptidos de 12 aa desplegados en la proteína III de un bacteriófago tipo M13. La característica de estos péptidos es que no tienen identidad con la estructura primaria de la proteína P36, pero presentan mimetismo con epitopes de la proteína, es por ello que son referidos como mimótopos. En este trabajo se identificaron 3 mimótopos denominados 21, 49 y 52 con los cuales se produjeron sueros anti-mimótopos en conejo. Estos sueros mostraron que el suero anti-mimótopo 21 reconoce a la proteína 36, 24 y 48 y el suero anti-mimótopo 49 sólo a la proteína P36 en los Ag E/S del adulto de *T. solium*.

1. Introducción.

La teniasis y la cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son problemas de salud pública que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza. Se ha sugerido que la principal consecuencia de la teniasis en la salud es la desnutrición, aunque esto aún no se ha demostrado en forma concluyente como con otras parasitosis¹.

El término teniasis designa al parasitismo humano por cestodos o gusanos planos del género *Taenia*, conocidos comúnmente como solitarias. Existen dos cestodos que afectan al hombre, *Taenia solium* y *Taenia saginata*, mismos que requieren los hospederos intermediarios, el cerdo y la res respectivamente, para completar sus ciclos de vida. El hombre es el hospedero definitivo obligado para ambas taenias⁷. Recientemente se ha descrito otra *Taenia* que afecta a humanos⁹, la cual ha sido clasificada como una subespecie de *T. saginata* (*T. saginata asiática*) por algunos autores^{10, 11} y como una nueva especie (*T. asiática*) por otros^{12, 13}. La teniasis por lo general sigue un curso benigno y a menudo es asintomática; cuando se presentan síntomas, éstos pueden ser leves o moderados. Por lo general, el paciente afectado no recurre al médico, manteniendo la infección por años. La principal manifestación clínica es la eliminación frecuente de proglótidos, ya sea espontáneamente o con la defecación; además el paciente señala el antecedente de consumo frecuente de carne de bovino o de cerdo, algunas personas prefieren su gusto por consumirla con insuficiente cocción⁸.

Los huevos de *Taenia* son eliminados con las heces del portador, contaminando aguas y alimentos, y son ingeridos por cerdos o vacas donde evolucionan a cisticercos produciéndose la cisticercosis porcina o bovina. Cuando el hombre ingiere la carne de cerdo o vaca, contaminada con cisticercos viables, se desarrolla en él la teniasis. El hombre también puede, de forma accidental, adquirir cisticercosis al ingerir los huevos de *T. solium* a través de alimentos y aguas contaminadas. Estos huevos se desarrollan hasta cisticerco

en diferentes tejidos, principalmente sistema nervioso central (SNC), causando la neurocisticercosis (NCC). En la NCC se producen manifestaciones clínicas como convulsiones, mareos, cefaleas, desórdenes mentales, etc¹⁴. La contribución que tiene la cisticercosis humana en las tasas de morbilidad y mortalidad es resultado del desarrollo del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC), lo que frecuentemente causa discapacidad física y en ocasiones la muerte²⁻⁶.

Este parásito es endémico en Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, México, Perú, India, China, Nueva Guinea, África del Sur, África Occidental, Madagascar y Zimbabwe. Pero con la emigración y el turismo se ha difundido su presencia en Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Kuwait, Portugal, España y Australia. Se ha convertido incluso en enfermedad emergente en los Estados Unidos, donde la neurocisticercosis alcanza el 13.5% de las consultas por convulsiones¹⁵.

1.2 *Taenia solium*.

1.2.1 Generalidades del parásito.

Taenia solium pertenece al phylum *Platyhelminthes*, clase *Cestoda*, orden *Cyclophyllidae*, Subclase *Eucestoda*, Familia *Taeniidae*, Género *Taenia*, Especie *solium* (Linneaus, 1758). *Taenia solium* es un endoparásito hermafrodita que mide entre 1 y 15 metros de largo, es aplanado y alargado dorso ventralmente tiene simetría bilateral. Carece de tubo digestivo y presenta pseudometamerización: cuerpo dividido en segmentos llamados proglótidos. Los ciclofilideos están dentro de un grupo de cestodos que se caracterizan por tener glándulas o células vitelógenas compactas y un escólex con cuatro ventosas¹⁵.

1.2.1.1 Morfología

1.2.1.1.1 Gusano adulto

En su forma adulta (figura 1A), la “solitaria” presenta un cuerpo largo y aplanado cuya longitud puede superar los dos metros. Habita en el intestino delgado del hombre. Provista de un tegumento o epitelio que le permite absorber

los nutrientes del medio, la taenia carece de tubo digestivo interno, aunque desciende, desde un punto de vista evolutivo, de otros vermes aplanados que sí lo tienen.

Presenta un escólex (figura 1B) del tamaño de la cabeza de un alfiler que tiene cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos (varían entre 20 a 32 pares de ganchos); con los ganchos se prende del intestino y con las ventosas se adhiere al mismo. El estróbilo, que es el cuerpo de la taenia, está segmentado. Los segmentos o proglótidos, inician de una región germinal situada en la parte inferior del escólex siendo estos los más cercanos al cuello o inmaduros, es decir, sin órganos sexuales desarrollados; van mostrando un grado creciente de desarrollo y diferenciación a medida que se alejan del escólex hasta llegar a ser segmentos maduros en la parte media del estróbilo. Cada proglótido maduro posee órganos genitales masculinos y femeninos, que lo convierten en una auténtica unidad de reproducción: la taenia es un parásito hermafrodita. Los proglótidos más alejados del escólex muestran un útero "grávido" ramificado lleno de huevos (~50 000 en cada uno). Cada proglótido mide entre de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho, los grávidos son liberados espontáneamente por la solitaria con las heces. Conforme se van expulsando proglótidos grávidos, van gestándose otros nuevos en el cuello¹⁴. Estos proglótidos están recubiertos por un tegumento con microtricas en su superficie exterior, constituyendo un tejido sincitial con funciones de secreción y absorción. El parénquima de los proglótidos inmaduros cuenta con abundantes fibras musculares lisas y bolsas de glucógeno. La presencia del tejido muscular explica los constantes movimientos de contracción y relajación. La presencia de abundantes partículas de glucógeno distribuidas entre todas las estructuras, sugiera que la glucosa es la fuente de energía más importante para el cestodo¹⁷.



Figura 1A. Esquema del gusano adulto en la cual se representan las diferentes secciones que lo componen. El cuerpo del gusano recibe el nombre de estróbilo. Está formado por proglótidos que se originan en el cuello o región germinal. *Taenia solium* es un parásito hermafrodita. Los proglótidos maduros poseen órganos sexuales masculinos y femeninos. Los proglótidos más alejados del escólex son grávidos y se encuentran repletos de huevos¹⁴.

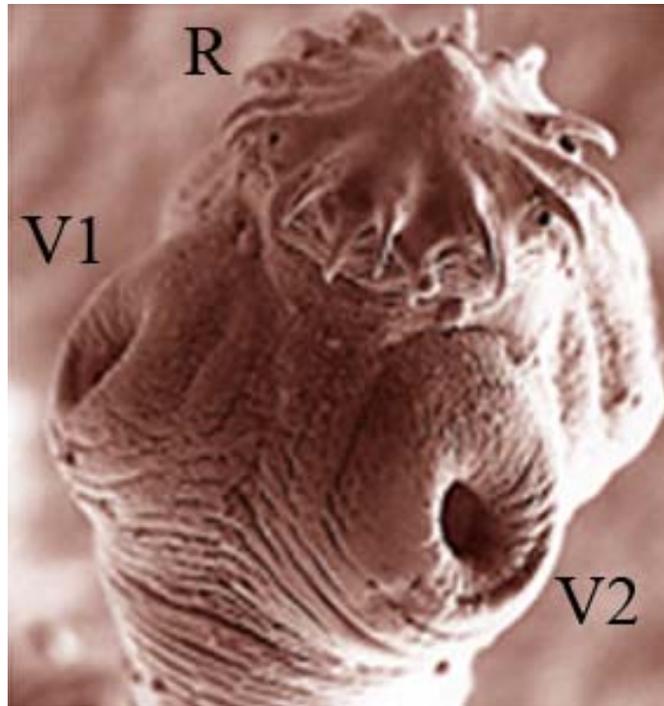


Figura 1B. Escólex *Taenia solium*. Pueden observarse los órganos de fijación, dos de las cuatro ventosas (V1 y V2) y el rostelo armado con la doble corona de ganchos (R). Tomada de <http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/ganaderia/porcinos/parasitos-internos/cestodes-taenia-solium.htm>

1.2.1.1.2 Cisticerco.

El cisticerco o metacéstodo (forma larvaria) de *T. solium* es una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, mide de 0.5 a 2 centímetros de diámetro, dotada de un pequeño escólex en su interior. Al igual que el escólex de la taenia adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rostelo armado con dos hileras de ganchos. Al carecer de tracto digestivo las larvas obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumental. La superficie externa aparece aumentada por proyecciones digitiformes denominadas microtricas, que son estructuras parecidas a las microvellosidades del intestino y otros epitelios de vertebrados e invertebrados¹⁴.

El cisticerco puede presentar dos formas: recemosa y celulosa o monovesicular (cerebro)¹⁶. La forma recemosa es grande, con una vesícula multilobulada, a menudo con forma de racimo de uvas (figura 2A) y el escólex en

general no es visible. Por su parte, la forma celulosa o monovesicular (figura 2B) es pequeña, esférica u ovalada, con una vesícula translúcida a través de la cual se puede observar el escólex. Miden unos 5 - 10 mm de longitud, están formados por un compartimiento interno, que engloba al escólex y al canal espiral, y uno externo, que contiene el líquido vesicular (0.5 ml) además de una cubierta externa. Se aprecian como vesículas blanco-amarillentas, de forma ovalada o redondeada, con el escólex visible en su interior, con apariencia de un pequeño gránulo blanquecino. La superficie que presenta el cisticerco a su hospedero humano o porcino es un tegumento citoplasmático, sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Puesto que el cestodo carece de tracto digestivo, obtiene sus nutrientes y excreta sus desechos a través de la superficie tegumental. La superficie externa del tegumento está cubierta por una membrana plasmática que es aumentada por proyecciones digitiformes denominadas microtricas. El tegumento está formado por vesículas y mitocondria. Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de tejido muscular liso, así como los citones subtegumentales. Estas células sintetizan activamente proteínas y otros componentes que posteriormente son transportados hacia el tegumento a través de puentes citoplasmáticos. A mayor distancia de la superficie se encuentran una serie de conductos o canales formados por las llamadas células flama, que constituyen un sistema protonefridial. *Taenia solium* produce unas concreciones minerales denominadas corpúsculos calcáreos que se forman en el lumen de los ductos protonefridiales¹⁷.

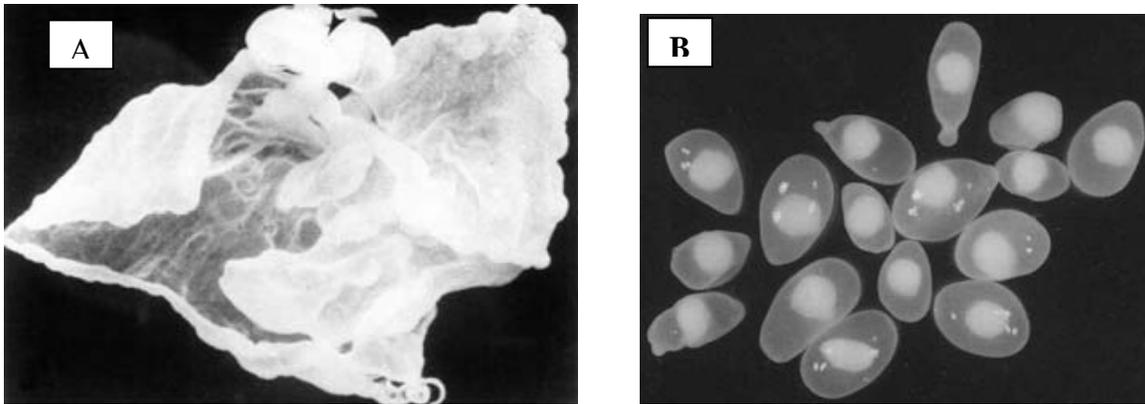


Figura 2. A) Forma racemosa del cisticerco de *Taenia solium*, obtenida por cirugía de un paciente con neurocisticercosis. B) Cisticercos en su forma celulosa extraídos de músculo esquelético de un cerdo infectado naturalmente.

1.2.1.1.3 Huevo.

En 1835 Karl Theodor Ernst von Siebold descubrió que los huevos de *Taenia* son esféricos y con apariencia radial cuando se observan a través de un microscopio óptico, contienen una oncosfera con un embrión con seis ganchos pequeños. Los huevos de *T. solium* son esféricos, miden entre 20 – 40 μm de diámetro. Son morfológicamente similares a los de otras especies de ténidos e idénticos a los de *T. saginata* incluyendo la subespecie *T. saginata asiática*. Poseen varias envolturas siendo la más externa el vitelio o cápsula, constituido por un grupo de células que forman un sincicio. La siguiente envoltura es el embrióforo, formado por pequeños bloques proteicos unidos entre sí por una sustancia cementante. Esta envoltura, además de ser la más importante en la protección de la oncosfera, confiere a los huevos su apariencia estriada característica. El embrióforo es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embrioforal¹⁷. Tiene una serie de características contrastantes ya que por un lado es impermeable y muy resistente, lo que posibilita la supervivencia en un ambiente desfavorable; por otro lado, la sustancia cementante que une a los bloques proteicos es sensible a la digestión enzimática. Así, cuando los huevos son ingeridos por el hospedero intermedio, el embrióforo se desbarata de inmediato liberando las

oncosferas¹⁴. Finalmente la membrana oncosferal rodea directamente al embrión hexacanto¹⁷.

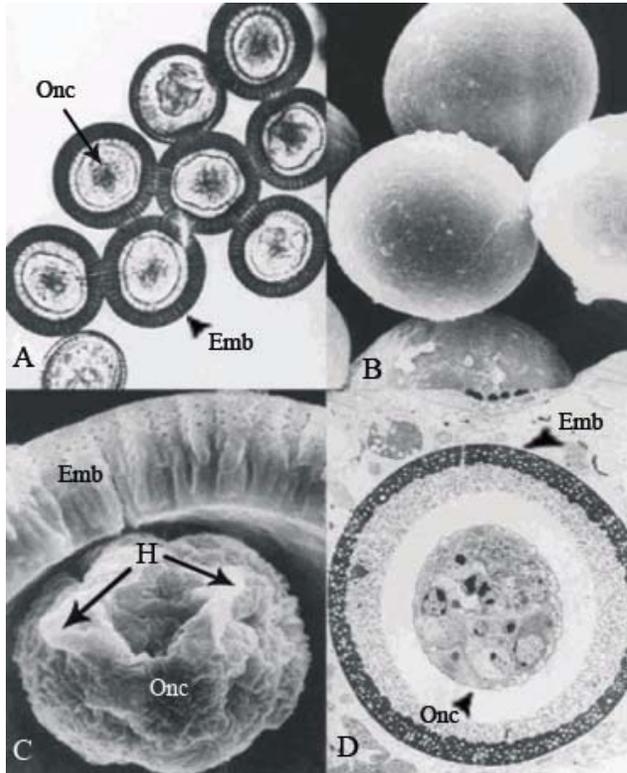


Figura 3. Huevos de *Taenia solium* A) huevos en fresco observados en el microscopio de luz; B) huevos intactos observados en el microscopio electrónico de barrido; C) corte de un huevo inmaduro observado en el microscopio electrónico de barrido; D) corte de un huevo observado en el microscopio electrónico de transmisión. Onc: Oncosfera; Emb: embrióforo; H: ganchos oncosferales¹⁸. (Fotografías tomadas de Aguilar-Díaz et al., 2006)

1.2.1.2 Sistema reproductor.

Como se mencionó anteriormente, cada proglótido es una unidad reproductora independiente puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos haciendo a *T. solium* un organismo hermafrodita. Los genitales masculinos se desarrollan primero y están constituidos por un gran número de testículos (275 a 575) que confluyen en ducto genital que a su vez desemboca por un costado del proglótido en el atrio genital¹⁷. El proceso de espermatogénesis comprende meiosis y maduración de espermatozoides filiformes (sin cabeza), con un solo axonema, alrededor del cual se encuentra el

núcleo enrollado en firma helicoidal, y una capa de microtúbulos helicoidales externos¹⁹.

Los genitales femeninos están constituidos por un ovario trilobulado situado en la base del útero en el extremo posterior del proglótido. El ovario desemboca a través de la vagina en el atrio genital. Los proglótidos grávidos muestran de siete a quince ramas laterales repletas de huevos. Cada una de las ramas puede presentar subramificaciones. El número de ramas uterinas permite diferenciar morfológicamente a *T. solium* y *T. saginata* (figura 4).

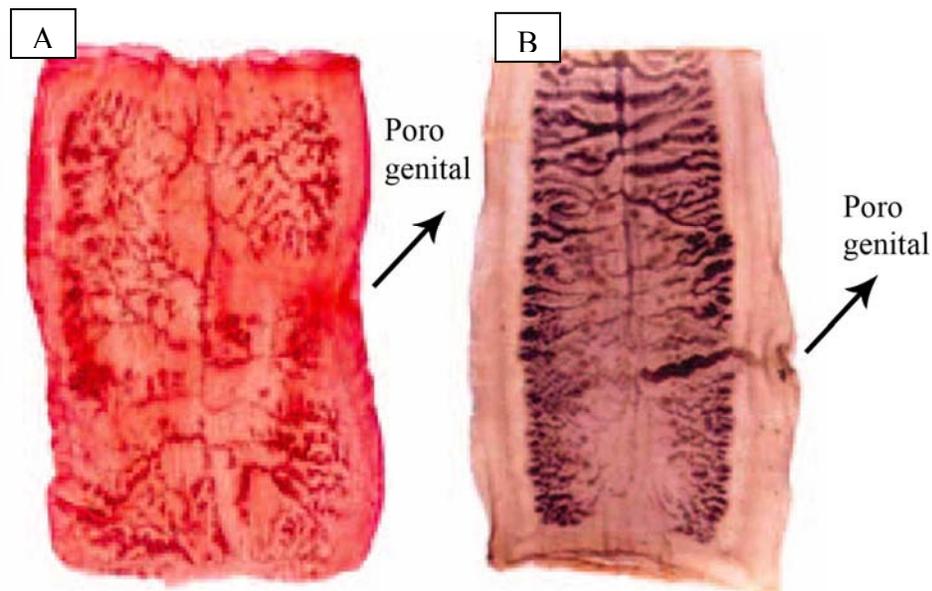


Figura 4. A) Proglótido grávido de *Taenia solium*. Se aprecia el conducto uterino central del que se desprenden las ramas en un número menor a 12. B) Proglótido grávido de *T. saginata* (tinción con tinta china). El útero ramificado presenta 12-30 ramas. Los conductos terminales de los sistemas genitales femenino y masculino se unen en el poro genital indicado en ambas imágenes¹⁷.

1.2.2 Ciclo de Vida

En condiciones naturales, la *T. solium* o solitaria habita en el intestino delgado del ser humano. Su nombre común alude a que en la mayor parte de los casos se encuentra un solo gusano en cada portador. Está constituida por un escólex o cabeza, que en su parte inferior se adelgaza para formar un cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos²⁰. El conjunto de

proglótidos unidos entre sí en forma de cadena se denomina estróbilo. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados. Los más distantes están totalmente diferenciados y contienen un gran número de huevos (~50,000) por lo que se dice que se encuentran grávidos. Los proglótidos grávidos desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (en promedio de cuatro a cinco por día), son evacuados hacia el exterior de las heces del huésped¹⁷. La primera expulsión de proglótidos de la *T. solium* generalmente ocurre de dos a tres meses después de la infección²¹.

La cisticercosis se adquiere por ingestión de huevos de *T. solium*. Una vez en el tubo digestivo del hospedero intermediario (el cerdo), las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación del embrión hexacanto u oncósfera contenido en el huevo. Los embriones activados penetran la pared intestinal del hospedero hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos. Se sabe que se requiere por lo menos de diez semanas para que el huevo se convierta en cisticerco y éste puede sobrevivir por varios años en los tejidos del hospedero intermediario. El ciclo se completa cuando el ser humano ingiere carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida infectada con cisticercos vivos. Las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares del hospedero, participan en la activación del cisticerco induciendo la evaginación del escólex para su fijación en la pared del intestino. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos.

Los cisticercos se mueren a temperaturas de 45 – 50 °C, por lo que pueden sobrevivir en trozos gruesos de carne si el centro no es cocido adecuadamente²². Los cisticercos pueden sobrevivir de 26 a 30 días a 4 °C, lo cual indica que la infección puede darse por la ingesta de carne mal cocida o cruda después de haber sido refrigerada a 4 °C en un lapso menor a un mes²³

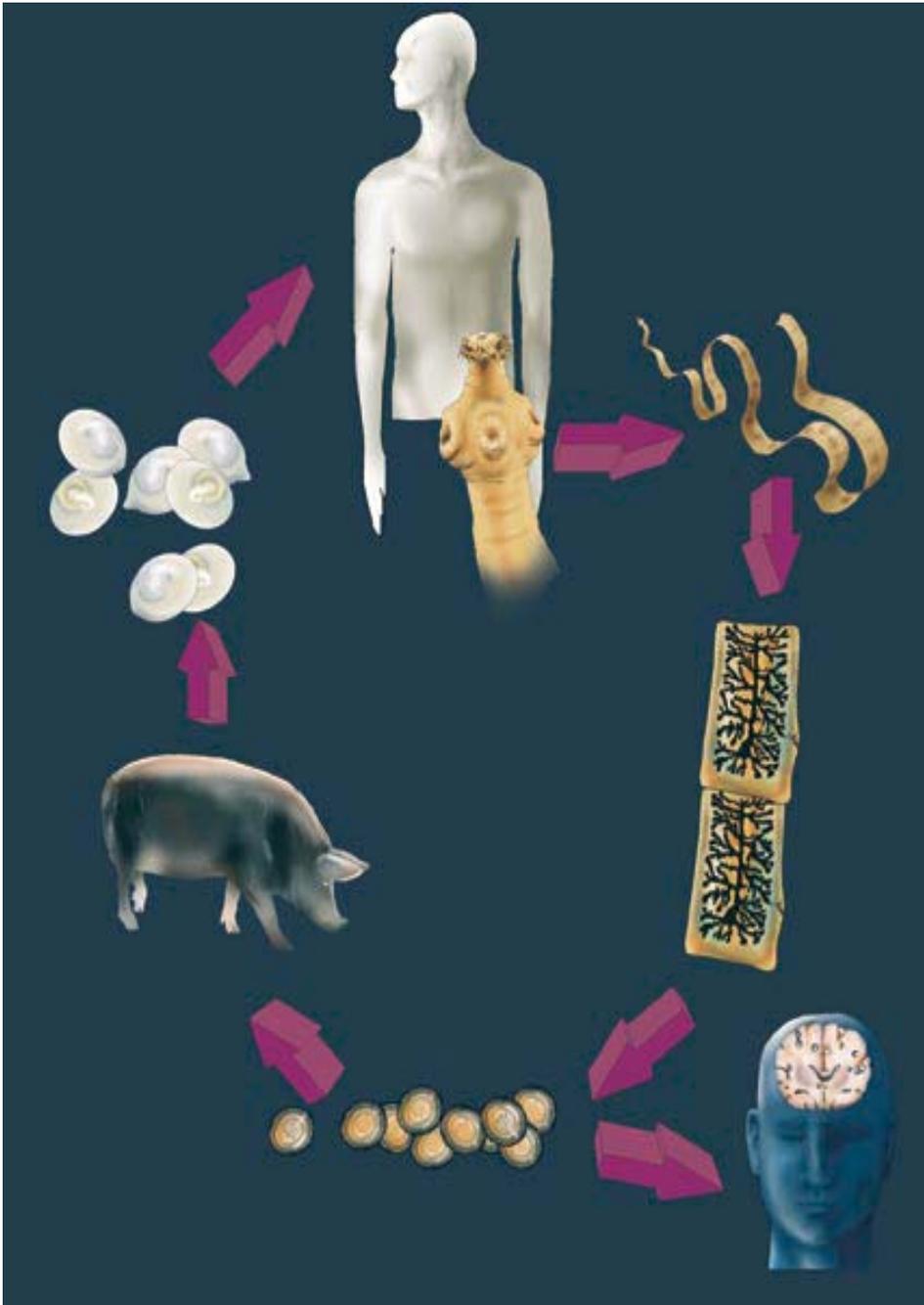


Figura 5. Ciclo biológico de *Taenia solium*. Alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como huésped intermediario. En su estadio adulto, el platelminto habita en el intestino humano. Su presencia ocasiona la teniosis. La tenia produce miles de huevos, que se expulsan en las heces. El cerdo se infecta al ingerir heces con huevos o segmentos del parásito adulto. Cada huevo puede convertirse en un cisticerco. El cisticerco ocasiona la cisticercosis porcina. El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos vivos. El escólex se fijan en las paredes del intestino humano donde se convierte en adulto. La falta de higiene y la convivencia con un teniásico pueden ocasionar la ingestión de huevos, desarrollándose la cisticercosis humana.

1.2.3 Manifestaciones clínicas

1.2.3.1 Teniasis

La infestación por el gusano adulto del género *Taenia* produce el cuadro clínico denominado teniasis intestinal. Los síntomas pueden estar causados por la producción de sustancias tóxicas por parte del cestodo, por la irritación mecánica intestinal, por anemias y por síndromes de malabsorción intestinal. En general, la mayoría de las infecciones por *T. solium* son asintomáticas, aunque puede aparecer malestar abdominal (meteorismo y plenitud intestinal), sensación de hambre, náuseas y diarrea. Es bastante frecuente detectar una eosinofilia moderada en sangre periférica, mayor del 13%²⁴.

1.2.3.2 Cisticercosis.

En el hombre, los cisticercos se desarrollan en el sistema nervioso central (SNC), el ojo, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo. Por su gravedad destacan la neurocisticercosis y la cisticercosis ocular. La neurocisticercosis constituye una enfermedad compleja, cuyos síntomas dependen en buena medida del número y localización de los parásitos en el SNC y las meninges, así como el grado de la reacción inflamatoria inducida por el parásito y las condiciones del hospedero¹⁴. El desarrollo de cisticercos en el SNC se atribuye a un fenómeno denominado tropismo, derivado de los aspectos mecánicos de la circulación junto al alto grado de concentración de glucosa o glucógeno en el tejido²⁵.

La cisticercosis del parénquima cerebral genera crisis convulsivas en el 70% de los pacientes con neurocisticercosis. En los países donde la enfermedad es prevalente, uno de cada dos casos de epilepsia se debe a neurocisticercosis. El aumento de la presión intracraneal es otra de las complicaciones frecuentes. En Iberoamérica la tasa de neurocisticercosis supera la de cisticercosis muscular y subcutánea; en los países asiáticos predomina la cisticercosis muscular diseminada¹⁴.

1.2.4 Respuesta inmune del hospedero.

Ante la invasión parasitaria, el cuerpo reacciona con una doble respuesta inmunitaria: humoral y celular. La humoral se caracteriza por la presencia de anticuerpos, proteínas que se unen a su antígeno correspondiente. De la respuesta celular se encargan los leucocitos. Se han detectado inmunoglobulinas IgG en contra de los cisticercos en el suero sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo. La presencia de IgG, que es el anticuerpo más longevo, corrobora que la enfermedad constituye un proceso crónico y de larga evolución. Existe, además, una correlación entre anticuerpos del hospedero y características de los parásitos: los anticuerpos abundan en pacientes cuyos cisticercos están vivos o en proceso de destrucción, para disminuir en presencia de parásitos calcificados¹⁴.

En la respuesta inmune celular, los linfocitos T son de dos tipos: T coadyuvantes (Th) subdivididos en Th1 y Th2, y linfocitos T citotóxicos (Tc). La proporción entre ambos tipos de linfocitos está asociada con la funcionalidad del sistema inmunitario, una proporción que parece anormal en los pacientes con cisticercosis: se da un aumento en la subpoblación de células citotóxicas que sugiere una respuesta inmunitaria disminuida. Sin embargo, no se sabe si la parasitosis es la causa o el efecto de la inmunodepresión. Se han detectado citocinas en líquido cefalorraquídeo y en la sangre de pacientes con neurocisticercosis. Las citocinas reflejan una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (asociadas a protección). No obstante, la reacción inflamatoria crónica que rodea a cisticercos en el cerebro sugiere la participación tanto de linfocitos Th1 como Th2¹⁴.

1.2.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Para sobrevivir a una respuesta inmunitaria activa, el parásito desarrolla diversos mecanismos de evasión y depresión de la respuesta inmunitaria: establecimiento en sitios inmunológicamente privilegiados, como el ojo y el cerebro; enmascaramiento de la respuesta inmunitaria al cubrirse con

anticuerpos del hospedero; producción de moléculas que suprimen o desvían la respuesta inmunitaria y procesos de mutagénesis¹⁴.

Existen algunas evidencias que sugieren posibles estrategias de adaptación del parásito en un hospedero inmunocompetente. Entre ellas cabe mencionar la secreción del antígeno B, capaz de fijar el complemento en complejos solubles o lejos del parásito, una propiedad que podría prevenir el daño del parásito por fijación del complemento sobre su superficie²⁶, la presencia de una gran cantidad de inmunoglobulinas en la superficie del parásito que enmascararan su presencia ante el sistema inmunológico²⁷.

1.2.6 Diagnóstico

1.2.6.1 Teniasis

El diagnóstico convencional de teniasis se basa en la identificación de proglótidos grávidos, mediante tamizaje de heces, o por encuentro casual en las heces del paciente. Los proglótidos de *T. solium* tiene menos de quince ramas uterinas, mientras que las de *T. saginata* presentan más de quince²⁸, sin embargo, muchas veces los proglótidos están deteriorados por lo que la identificación es difícil²⁹. La observación de huevos mediante técnicas coprológicas, sólo puede indicar teniasis, pero no puede distinguir la especie ya que los huevos son morfológicamente iguales²⁸. Se han desarrollado técnicas de detección de coproantígenos de *Taenia* mediante el uso de anticuerpos policlonales^{30, 31} o monoclonales³², obteniéndose buena sensibilidad, pero no permiten distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*. Además, se han desarrollado técnicas para la detección de anticuerpos en sueros de individuos con teniasis, la mayoría con baja sensibilidad y especificidad, a excepción de un ensayo utilizando un antígeno de excreción/secreción de *T. solium* mediante EITB (Enzyme–Linked Immuno-electrotransfer Blot Assay), con el que se obtuvo 95% de sensibilidad y especificidad para la identificación de portadores del ténido³³.

1.2.6.2 Cisticercosis

El diagnóstico convencional de cisticercosis se lleva a cabo generalmente por técnicas de imágenes y una amplia variedad de ensayos inmunológicos, ya que la identificación del agente causal pocas veces puede hacerse debido a la localización de los cisticercos principalmente en el SNC³⁴. Las técnicas de neuro imágenes, tales como la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), son útiles para el diagnóstico, pero la infección puede pasar desapercibida cuando el número de cisticercos es bajo o las imágenes no son concluyentes. Por otro lado, estas técnicas son muy costosas y de difícil acceso a la mayoría de la población que vive en las áreas donde la cisticercosis es endémica¹³.

Las técnicas de inmunodiagnóstico se basan en la detección de antígenos circulantes del parásito y de anticuerpos anti-cisticerco tanto en suero como en líquido cefalorraquídeo (LCR). Se han estandarizado sistemas de captura de anticuerpos policlonales de conejo, rindiendo buena sensibilidad y especificidad^{35, 36}, sin embargo, los mejores índices diagnósticos se han obtenido utilizando anticuerpos monoclonales^{37,38}. En las últimas décadas se han realizado esfuerzos para caracterizar y purificar antígenos que puedan mejorar la especificidad de los ensayos. Los mejores resultados se han obtenido con paramiosina de *T. solium*^{39, 40}, antígenos de bajo peso molecular (8 – 30 KDa) de cisticercos de *T. solium*^{41, 42, 43}, los antígenos de excreción/secreción^{44, 45} y las glicoproteínas⁴⁶. Con respecto a estas últimas se han identificado siete glicoproteínas específicas (GP13, GP14, GP18, GP21, GP24, GP39-42, GP50) de cisticercos de *T. solium*, las cuales empleándolas en la técnica de inmunoblot (EITB45), han sido reconocidas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como el método inmunológico de elección para el diagnóstico de neurocisticercosis⁴⁷.

1.2.7 Tratamiento

1.2.7.1 Teniasis

Hasta hace algunos años, el fármaco de elección para el tratamiento de la teniasis era la niclosamida, que actúa directamente sobre los proglótidos haciéndolos susceptibles a las enzimas proteolíticas del hospedero. Sin embargo, se ha sugerido que el medicamento puede exponer al paciente al riesgo de contraer cisticercosis pues destruye los proglótidos y libera los huevos del parásito dentro de la luz intestinal, por lo que la administración de un laxante una o dos horas después del tratamiento es obligada así como la disposición adecuada de las excretas⁴⁸⁻⁵². Este fármaco ya no se produce.

El prazicuantel es el segundo fármaco de elección. Su mecanismo de acción; es que lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva por medio de interferir con los canales iónicos de calcio. Es un fármaco bien tolerado, tiene una toxicidad baja y mínimos efectos secundarios con una eficacia del 100%. La dosis para el tratamiento de la teniasis es de 5 – 25 mg/Kg por vía oral en una sola toma. Este medicamento si está disponible en México⁵³⁻⁵⁹.

El albendazol es el tercer fármaco de elección, sobre todo en menores de cinco años de edad. Es bien tolerado y produce efectos secundarios mínimos. La ventaja de este fármaco es que no sólo actúa contra *Taenia sp.*, sino también contra la mayor parte de otros helmintos y nematodos frecuentes. Este fármaco causa daños en el tegumento del parásito, uniéndose a la tubulina inhibiendo la polimerización y ensamblaje de los microtúbulos. La dosis recomendada para el tratamiento de la teniasis es una sola dosis de 400 mg por vía oral aunque también se han presentado esquemas con dosis de 400 mg cada 24 horas durante 3 días.⁶⁰⁻⁶³.

1.2.7.2 Cisticercosis

Hasta hace pocos años el tratamiento de la neurocisticercosis se circunscribía al control sintomático, tanto con medicamentos como por medio de una cirugía para resolver principalmente la hipertensión endocraneana. La aparición de fármacos cestocidas abrió la posibilidad de curar la enfermedad en forma no invasiva.

En la actualidad, se cuenta con dos medicamentos de administración oral disponibles en el mercado: el praziquantel y el albendazol. A partir de los primeros informes de pacientes tratados con estos fármacos se ha venido obteniendo experiencia principalmente en el tratamiento de cisticercosis parenquimatosa, seguida de la subaracnoidea. Su utilidad en otras variantes como las intraventriculares no ha sido establecida por la intensa reacción inflamatoria que ocurre durante la destrucción del parásito^{64,65}.

Praziquantel. Se ha demostrado que dosis bajas de 5 – 10 mg/Kg/día han tenido algún efecto sobre los cisticercos y que dosis altas de hasta 50 – 70 mg/Kg/día han sido bien toleradas⁶⁹.

Albendazol. El albendazol ha demostrado ser un medicamento altamente efectivo para el tratamiento de la cisticercosis, con una alta efectividad en el caso de NCC ya que ha mostrado una mayor penetración en el fluido cerebrospinal que el praziquantel. Se ha determinado que una dosis de 15 mg/Kg/día ha sido efectiva ya que no conlleva a efectos secundarios marcados. Este medicamento tiene menor costo que el praziquantel.

Esteroides. Entre el segundo y quinto día de la terapia antiparasitaria, generalmente se observa un aumento en los síntomas neurológicos, atribuidos a la muerte del parásito y a la reacción inflamatoria que hay en la zona de alojamiento del cisticerco. Así, la administración de esteroides tiene la finalidad de disminuir la inflamación, el edema y la hipertensión intracraneal causada por los antiparasitarios. Los esteroides más utilizados son la dexametasona en dosis entre 4.5 y 12 mg/Kg/día y la prednisona en dosis de 1 mg/Kg/día. En algunos

casos también se utiliza el manitol para disminuir la hipertensión intracraneal aguda en dosis de 2 g/Kg/día. En muchos casos de NCC se presentan episodios epilépticos debido a la calcificación del cisticerco en el cerebro. Para tratar los episodios epilépticos se utilizan los antiepilépticos obteniendo resultados favorables cuando se presentan crisis epilépticas causadas por NCC.

Cirugía. Anteriormente, la cirugía para extraer los cisticercos del cerebro y de los ventrículos era el método más utilizado como tratamiento, aunque con la aparición de los antihelmínticos mencionados, la práctica de éste método fue disminuyendo y actualmente está indicado sólo para los casos en los que el parásito se encuentra en los ventrículos del cerebro, considerando que actualmente se cuenta con la cirugía neuroendoscópica para la recesión de los cisticercos ventriculares la cual es menos invasiva.

1.2.8 Medidas de control

Para el control del binomio teniasis/cisticercosis se han puesto a prueba diversas estrategias, desde el tratamiento masivo con drogas cestocidas y campañas de educación en salud hasta el desarrollo de vacunas. En un estudio amplio realizado en el estado de Morelos, el grupo de Flisser demostró la gran eficacia de la educación para la salud, centrada en la prevención de la cisticercosis porcina y la convivencia de dar tratamiento dirigido contra la teniosis intestinal¹⁴.

Otra alternativa para el control de la cisticercosis es la vacunación de cerdos. Dos vacunas recombinantes TSOL18 y TSOL45 de antígenos de oncosferas de *T. solium*, generaron 99.5% 97.1% de protección, respectivamente, contra la cisticercosis porcina, sin embargo, la vacuna es cara y faltan por realizar estudios de campo.

1.3 Antígenos de Excreción/Secreción

Tanto en la larva como el adulto de *T. solium* presentan antígenos los cuales se pueden clasificar de varias maneras, algunos son específicos para el género

pero no para la especie, se han encontrado antígenos que son específicos para los cestodos y algunos que son específicos para los estadios de *T. solium*⁶⁸. Los antígenos de excreción/Secreción (AgE/S), son antígenos derivados del metabolismo del parásito que por su naturaleza misma son liberados al medio donde éste se encuentra. Se han encontrado varios AgE/S los cuáles se han investigado para determinar si pueden utilizarse como buenos antígenos para la identificación específica del parásito. Dentro de estos antígenos se encuentran el AgB, la proteína 29 (P29), ES38, ES33 y los AgE/S 72, 48, 36 y 24⁶⁸. Estos antígenos han sido estudiados utilizando diferentes métodos como son las pruebas de ELISA y la Inmunoelectrotransferencia (IET) para conocer su sensibilidad y especificidad.

1.3.1 Antígeno diagnóstico P36

El antígeno P36 obtenido a partir de los AgE/S de la forma adulta de *Taenia solium*, ha demostrado ser un antígeno específico y con potencial para ser utilizado como un antígeno diagnóstico teniasis, ya que sólo ha sido detectado en los AgE/S del adulto y no en los AgE/S de la forma larvaria del parásito. También se ha encontrado que este antígeno no presenta reacción cruzada con otros cestodos, características que le otorgan propiedades particulares y de interés para su investigación en el diagnóstico de la teniasis causada por *T. solium*⁶⁸.

1.3.2 Mimótopos

Los mimótopos son secuencias cortas de aminoácidos (7–15) que mimetizan secuencias de aminoácidos en proteínas. Estas regiones en las proteínas si son antigénicas se denominan epítomos. Por lo tanto, podría decirse que un mimótopo es una secuencia de aminoácidos que mimetiza un epítomo de un antígeno.

1.4 Despliegue en fagos (PhD)

El despliegue en fagos, técnica descrita por primera vez por G. Smith en 1985, es una técnica que permite la expresión de péptidos en la superficie de fagos filamentosos. El despliegue en fagos permite la selección de péptidos y proteínas, incluyendo anticuerpos, con alta afinidad y especificidad para casi cualquier molécula blanco. Esta técnica involucra la expresión de proteínas, incluyendo anticuerpos, o péptidos en la superficie de un fago filamentosos. La secuencia de DNA de interés es insertada dentro de una ubicación en el genoma del bacteriófago filamentosos, en el cual la proteína codificada es expresada o desplegada en la superficie del fago filamentosos como producto de fusión de una de las proteínas de la cápside⁶⁶.

1.4.1 Fagos filamentosos

Bacteriófagos, o simplemente fagos, son virus que infectan una gran variedad de bacterias Gram negativas utilizando el pili. Las partículas Ff de fagos filamentosos (cepas M13, f1 y fd) que infectan *E. coli* vía pili F, consisten en una cadena sencilla de DNA (ss) que está encerrado en una cubierta proteica. El genoma entero del fago consiste en 11 genes. Un fago viable expresa alrededor de 2700 copias del gen de la proteína 8 (pVIII), proteína de 50 aa que también se sabe es la principal proteína de la cápside y de 3 a 5 copias del gen III (pIII), una proteína de 406 aa que es una de las 3 proteínas de la cápside de fagos filamentosos⁶⁶. (Figura 6⁶⁶)

Ph.D.-12



Figura 6. Representación esquemática de la proteína III de un fago filamentosos con un péptido de 12 aa desplegado, en donde X_{12} representa dicho péptido. La pIII es una de las proteínas de menor proporción del fago.

Los fagos filamentosos no producen una infección lítica en *E. coli*, sino que producen un estado en donde la bacteria infectada produce y secreta partículas virales sin sufrir lisis. La infección se inicia por la unión de la proteína III al pili F de *E. coli* (ejemplo. Cepa TG1). La unión induce la retracción del pili y por ende la inyección del ADN circular del fago, el cual es convertido por la maquinaria de replicación del hospedero en la forma replicativa (RF). La RF experimenta replicación para generar ADN de cadena sencilla y también sirve como templado para la expresión de las proteínas III y VIII. La progenie del fago es ensamblada por empaquetamiento del ADN de cadena sencilla dentro de las cubiertas proteicas, y expulsada al medio a través de la membrana bacteriana⁶⁶.

1.4.1.1 Proteína III

Está constituida por 406 residuos de aa, es la proteína de cubierta que se encuentra en menor proporción ya que sólo está presente en 3 a 5 copias del fago. La proteína puede ser dividida en dos dominios: el C-Terminal, que interactúa con la pVIII para mantenerse unida a la cubierta del fago; y el N-terminal, dos tercios de la proteína forman una estructura abultada que median la unión al pili F, esencial para la infección. La inserción de péptidos en el dominio N-terminal regularmente no interfiere con la capacidad infectiva. Por manipulación genética han sido insertados espaciadores flexibles o el flanqueo con cisteínas que al plegarse forman puentes disulfuro, los cuales mantienen separado el péptido desplegado del resto de las proteínas de cubierta, haciéndolo más accesible para interactuar con el receptor de interés⁶⁷.

1.4.1.2 Proteína VIII

Es la proteína principal de la cubierta, es un polipéptido de 50 aa y forma el cuerpo del fago. El número de copias de esta proteína depende la longitud de la partícula del fago, la cual depende a su vez del tamaño del genoma. Generalmente, una molécula de la pVIII es requerida para envolver 2.3 nucleótidos, lo cual corresponde a 2800 copias para un genoma de 6.5 kb. Al igual que la pIII, pueden ser clonados oligonucleótidos en el gen para la pVIII y

expresados como un péptido de fusión al dominio N-terminal que es proyectado hacia el exterior de la superficie del fago. Debido a que la pVIII compone casi en su totalidad a la cubierta del fago, las proteínas de fusión deben de ser distribuidas a lo largo de la longitud del cuerpo del fago. La adición de más de cinco aminoácidos en el dominio N-terminal se vuelve tóxico para le ensamblaje de la cápside del fago, disminuyendo así su infectividad⁶⁷.

1.5 Fago M13KE

En el despliegue en fagos, la biblioteca de péptidos Ph.D.12 está expresada en fagos M13KE los cuales se diferencian del fago silvestre M13. Las dos principales diferencias son que se le han insertado dos sitios de clonación (Acc65I) en el extremo 5' al final del gen III para expresar secuencias cortas de péptidos fusionados al extremo N – terminal de la pIII y la presencia del gen LacZ α con el objetivo de poder llevar a cabo una reacción llamada α -complementación lo que permite seleccionar clonas azules al utilizar el compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal). El genoma del fago M13Ke está contenido en una secuencia de 7,222 nucleótidos formando una cadena sencilla de ADN, su genoma se muestra en la figura 7.

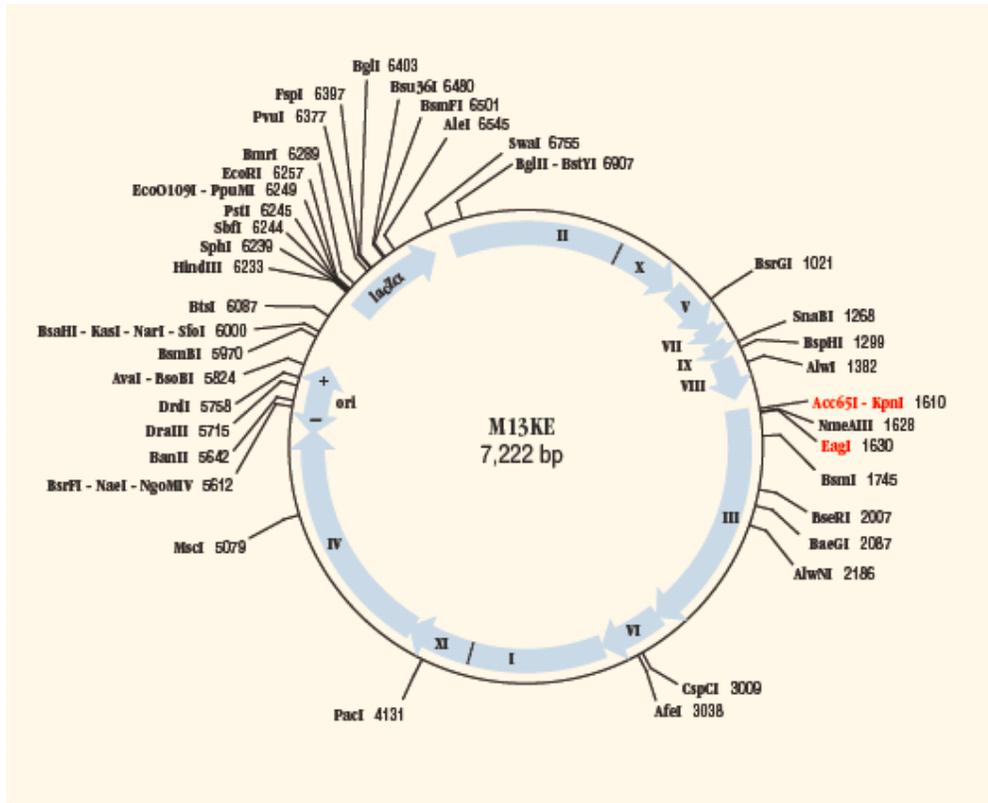


Figura 7. Genoma del fago M13KE. Se observa en rojo la inserción del sitio de unión en el cual se introduce la secuencia de aminoácidos que será expresada en el extremo N-terminal de la pIII. También se observa el gen LacZα que ha sido insertado para que se pueda llevar a cabo la α-complementación.

2. Hipótesis

Los anticuerpos desarrollados en contra de mimótopos de la proteína P36 del extracto de E/S de adulto de *T. solium* serán capaces de reconocer a dicha proteína en un ensayo de inmunoblot.

3. Objetivo General.

Aislamiento y caracterización de mimótopos obtenidos a partir de anticuerpos en contra del antígeno P36 del extracto de antígenos de Excreción/Secreción (AgE/S) del adulto de *Taenia solium*.

3.1 Objetivos particulares.

- 1.- Obtención de antígenos de Excreción-Secreción (AgE/S) del adulto de *Taenia solium*.
- 2.- Producción de suero hiperinmune en contra de los AgE/S
- 3.- Purificación de anticuerpos específicos contra P36.
- 4.- Aislamiento y análisis de clonas de mimótopos.
- 5.-Producción y caracterización de anticuerpos anti-mimótopos.

4. Materiales y Métodos.

4.1 Reactivos químicos y equipos

Todos los materiales y métodos empleados en esta tesis, así como sus especificaciones han sido incluidos en la descripción del método e que fueron requeridos. Los animales empleados para las inmunizaciones fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Las centrifugaciones menores a 3,700 rpm se hicieron en una centrífugo modelo Centra CL2 de IEC, y las mayores a 10,000 rpm en una microcentrífuga modelo 5415C de eppendorf.

4.1.2 Animales de laboratorio.

Se utilizaron hámsters dorados *Mesocricetus auratus* hembras de 8 semanas de edad y conejos hembras de 3 meses de edad de la cepa Nueva Zelanda, los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM

4.1.3 *Escherichia coli* (cepa TG1)

Las bacterias utilizadas en este trabajo fueron de la cepa *E. coli* TG1 pues es la recomendada para el despliegue en fagos. Se recomienda esta cepa debido a sus características genéticas. En primera instancia es una bacteria que tiene la presencia del plásmido F que le da la característica de pili a las bacterias. Esto es necesario ya que el fago M13KE, para lograr la infección, se une al pili F de la bacteria por medio de la interacción de la pIII del fago y el receptor TolA del pili de la bacteria. Otra característica fundamental es que se le ha deletado la parte que codifica para el fragmento alfa del gen LacZ, por lo que la β -galactosidasa no se forma por completo siendo disfuncional al no estar las dos subunidades presentes. El fago M13KE en el que está expresada la biblioteca de péptidos tiene el gen lacZ α por lo que al llevarse a cabo la infección de la bacteria por parte del fago este gen es transferido a la bacteria en un proceso llamada α -complementación y la otra subunidad LacZ α es transcrita y traducida a partir del

gen lacZ α y la β -galactosidasa es formada de manera correcta siendo así funcional.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtención de los antígenos de Excreción/Secreción (AgE/S) del adulto de *T. solium*

Cinco gusanos fueron colocados a 37 °C en cajas petri estériles con medio RPMI complementado con antibióticos (1X10⁶ U/L de penicilina y 2 g/L de estreptomina, Sigma). El medio RPMI fue cambiado cada ocho horas durante el primer día de incubación y cada doce horas durante los siguientes tres a cuatro días. Los medios recolectados durante la incubación de los parásitos se juntaron, dializaron con PBS y se concentraron aproximadamente 10 veces con una unidad AMICON utilizando membranas de PM 3,000 (Millipore). Finalizada la concentración, se le agregaron a la muestra inhibidores de proteasas (TLCK, PMSF, EDTA) y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

4.2.2 Cuantificación de los antígenos de E/S por el método Lowry.

La muestra a cuantificar deberá de estar diluida en PBS en un volumen final de 1 mL. Para la preparación de la curva patrón se coloca 1 mL de la concentración correspondiente en cada tubo.

Solución Lowry:

Na ₂ CO ₃ anhidro al 2% en NaOH 0.1M	9.8mL
Tartrato de sodio y potasio al 2%	0.1 mL
Sulfato cúprico al 1%	0.1 mL

Agregar 4 mL de solución de Lowry a cada tubo, agitar e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente agregar 0.4 mL de reactivo de Folin & Ciocalteu (Sigma) diluido 1:1 en agua, agitar e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Leer el contenido de los tubos a una longitud de

onda de 600 nm ajustando a cero con un blanco de PBS, solución Lowry y reactivo de Folin sin contener muestra de proteína. La curva patrón es una dilución seriada de BSA iniciando con una concentración de 1000 µg/mL.

4.2.3 Producción de suero hiperinmune α AgE/S

Para la producción de suero α -AgE/S, se inmunizaron por vía intramuscular hámsteres hembras de 8 semanas de edad. Previamente se tomó una muestra de sangre para obtener suero preinmune o suero normal que sirviera como control negativo en el análisis de inmunoblot. Las dosis antigénicas utilizadas fueron de 100 µg. Se realizaron tres inmunizaciones, una cada quince días por vía subcutánea. 5 días después de la última inmunización se valoró el título del suero de los animales por IET y ELISA. Posteriormente los animales fueron sangrados a blanco y el suero fue recuperado por centrifugación a 735xg/15 min y guardado en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

4.2.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

Se preparó un gel preparativo al 12.5 % (ver anexos), en el cual fue cargada una cantidad de 10 ug de proteína/pozo. Previo al cargado, se diluyó la proteína (1:1) en amortiguador de cargado (Tris-HCl 100 mM pH= 6.8, SDS 4%, azul de bromofenol 0.2% y glicerol 20%) y se incubó a 100 °C durante 5 minutos. El proceso de electroforesis se llevó a cabo a 100 mV, dando tiempo suficiente para que el azul de bromofenol llegara a 1.0 cm antes del final del gel. El gel fue teñido con azul brillante de Coomassie para observar el patrón de bandas de los AgE/S.

4.2.5 Inmunoblot.

Se corrieron geles preparativos al 10% utilizando 2 µg de proteína/mm lineal de membrana. Se utilizó un marcador de peso molecular preteñido (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Accesolab). Al finalizar la electroforesis las proteínas contenidas en el PAGE-SDS fueron transferidas a membranas de

nitrocelulosa (Amersham Biosciencias) en una cámara de inmunoelectrotransferencia (BioRad) a una diferencia de potencial de 100 V durante una hora. Se trabajó a temperatura ambiente con amortiguador de transferencia frío. Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron guardadas a -20°C entre dos papeles filtro humedecidos con PBS en una bolsa de plástico.

4.2.6 Elución de anticuerpos específicos del suero α -P36.

Se prepararon membranas de nitrocelulosa con los AgE/S. Posteriormente se recortó con un bisturí la región de interés (36 kDa) y se bloqueó con Blotto (leche descremada) 5% en PBS-TWEEN 0.05% durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados a la membrana con PBS-TWEEN 0.05% durante 10 minutos c/u. Para la adsorción de los anticuerpos α -P36, se incubó la membrana con el suero híper inmune α AgE/S diluido 1:50 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados con PBS-TWEEN 0.05% durante 10 minutos cada uno.

La elución de los anticuerpos α P36 previamente identificados en la membrana por inmunoblot, se llevó a cabo con una disolución de glicina ácida (Glicina 0.1M, NaCl 0.15M, pH= 2.6) que se incubó durante 3 minutos con la membrana. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó amortiguador de neutralización Tris – HCl [1 M], pH = 9.0. Una vez neutralizada se dializó contra PBS y concentró en un equipo AMICON utilizando membranas de PM3000. El eluido (anticuerpos) fue cuantificado por el método Lowry y probado en un inmunoblot con los AgE/S.

4.2.7 Titulación de biblioteca de fagos PhD12

La titulación de los fagos se realizó con diluciones seriadas en TBS pH = 7.5 (10^6 a 10^{-10} , ver anexos) realizadas de una biblioteca de fagos (PhD12, New England Biolabs). Se tomaron 10 μ L de las diluciones y con ellas se infectaron 300 μ L de un cultivo de *E. coli* cepa TG1 (D.O._{600nm} = 0.8), a 37 °C durante 30 minutos y sin agitación. Posteriormente fueron diluidos en 4 mL de medio de

cultivo Top LB (45°C) y vertidos en placas con medio LB. Finalmente, las cajas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de placas para determinar el título de la biblioteca. (Fuente Manual PhD12 Biolabs)

4.2.8 Selección de Mimótopos.

Se unieron en una placa con 8 pozos (Costar) anticuerpos α -P36 [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] elaborada en búffer de carbonatos [0.1 M], pH = 8.6 agregando 100 μL de ésta solución en cada pozo de la placa e incubando en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente fue retirado el exceso de anticuerpos y se lavó la placa por triplicado con 100 μL de una disolución TBS–Tween 20 (0.3%). Posteriormente se bloqueó la placa con 100 μL de BLOTTO (leche descremada 10% y NaN_3 0.2% en TBS–Tween 20 0.1%) incubando durante 45 minutos a 37 °C. La disolución bloqueadora fue descartada e inmediatamente se lavó la placa por triplicado con una disolución de TBS – Tween 0.3%. Posteriormente se agregaron 125 μL a cada pozo de la biblioteca de péptidos de 12 aa desplegados en el fago M13KE (PhD12, New England Biolabs) [1×10^{11} UFC/mL] hecha en TBS y se incubó durante toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, el exceso de fagos fue recuperado y se lavó la placa por triplicado con una disolución TBS–Tween 20 0.3%. Después se agregaron a cada pozo 75 μL de un amortiguador de elución de glicina [0.1 M], pH = 2.0 y se incubó la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperó el volumen de cada pozo y se transfirió a un tubo eppendorf al cual previamente se le agregaron 400 μL de un amortiguador de Tris – HCl [1 M], pH = 9.0 para lograr un volumen final de 1 mL de eluido. Los fagos recuperados en esta ronda fueron amplificados y titulados. Posteriormente, se realizó una segunda y tercera ronda de selección pero utilizando 10^{11} fagos por pozo y una disolución de lavado de TBS–Tween 20 0.6% y 1.0% respectivamente.

4.2.9 Amplificación de fagos

Se infectaron 500 μL de un cultivo (D.O. $600_{\text{nm}} = 0.8$) de *E. coli* cepa TG1 (ver Anexos) con 10 μL de los fagos del eluido incubando durante 30 minutos a 37° C sin agitación. Posteriormente se transfirió el volumen de infección a un matraz erlenmeyer con 50 mL de medio LB y se incubó por toda la noche a 37°C y 200 rpm. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 3700 rpm durante 30 minutos, al sobrenadante recuperado se le agregaron 8 mL de una disolución de PEG 20%/NaCl 2.5 M y se guardaron a 4 °C durante toda la noche. Los fagos fueron concentrados centrifugando a 4000 rpm durante 30 minutos y resuspendidos en 1 mL de TBS pH = 7.5 (Stock 1er ronda). El remanente de bacterias fue retirado centrifugando durante 10 minutos a 14000 rpm. Estos fagos volvieron a ser titulados de acuerdo al numeral 4.2.1 para entrar a un nuevo ciclo de tamizaje.

Se alternó el bloqueo de la placa de ELISA de la siguiente forma:

Ronda 1: BLOTTO (leche descremada 10% y NaN_3 0.2% en TBS – Tween 20 0.1%). Ronda 2: Disolución BSA 0.1% en TBS – Tween 20 0.1%. Ronda 3: BLOTTO (leche descremada 10% y NaN_3 0.2% en TBS – Tween 20 0.1%).

4.2.10 Selección de clonas de fagos.

Después de la realización de la tercer ronda de selección, los fagos se reamplificaron y titularon siguiendo el procedimiento previamente descrito, utilizando una variante que permitió seleccionar las clonas de fagos que tiene el inserto de interés. Antes de sembrar las bacterias con los fagos se agregaron 30 μL de una disolución de IPTG [1 M] (Invitrogen), 40 μL de una disolución de X-Gal [20 mg/mL] (Invitrogen) en dimetilformamida (Sigma). Las clonas que tienen inserto llevan a cabo un proceso denominado α -complementación, y se muestran azules debido a la hidrólisis del X-Gal. Con ayuda de una pipeta Pasteur las clonas azules fueron recuperadas y se almacenaron en 100 μL de TBS pH= 7.5 a 4 °C. Posteriormente estas clonas fueron amplificadas para la preparación del ADN para secuenciación.

4.2.11 Preparación del ADN de fagos para secuencias

Para la preparación de los templados se utilizaron 1.1 mL del amplificado de fagos y se centrifugaron a 14000 rpm en una centrifuga Eppendorff Centrifuge 5415 C durante 1 minuto. El sobrenadante (1 mL) se transfirió a un tubo nuevo al cual se le agregaron 300 μ L de una disolución de PEG 20%/NaCl 2.5 M y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los fagos fueron recuperados centrifugando a 14000 rpm durante 10 minutos y descartando el sobrenadante. El botón se resuspendió en 100 μ L de un amortiguador de Ioduro, posteriormente se le agregaron 250 μ L de etanol absoluto y la mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 14000 rpm en una centrifuga Eppendorff Centrifuge 5415 C a 4 °C durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El botón se lavó con etanol al 70% (almacenado a -20 °C), se centrifugó con un breve pulso y se desechó el sobrenadante. El remanente de etanol fue eliminado secando el botón al vacío en un aparato Speed Vac DNA 120 Thermo Savant. El botón fue resuspendido en 50 μ L agua estéril. Estos ADN fueron secuenciados con el método de secuenciación capilar por el método de Sanger, en un secuenciador ABI PRISM 310 “310 Genetic Analyzer” (Applied Biosystem). Los análisis de las secuencias de aminoácidos de las clonas se realizaron con el programa PCGENE (Análisis de nucleótidos y Clustal X). Con estos resultados se hizo una agrupación de clonas por similitud entre los aminoácidos y posteriormente se seleccionaron 3 clonas para la inmunización de conejos.

4.2.12 Inmunización de conejos para producción de sueros antimimótopos

Se inocularon 3 conejos cepa Nueva Zelanda (uno para cada clona seleccionada) de 12 semanas de edad. Cada conejo se inoculó con 10^{12} fagos en 200 μ L de PBS estéril. Se realizaron cuatro inmunizaciones subcutáneas a intervalos de 2 semanas. Una semana después del último refuerzo los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardiaca.

4.2.13 Ensayo de Inmunoblot con los sueros anti-mimótopos

Para comprobar que el suero antimimótopo producido reconoce la proteína de 36kDa (P36) en el extracto de AgE/S, se enfrentó una membrana que contiene éstos últimos (2 mm de ancho) con cada uno de los sueros antimimótopos obtenido de los conejos. Se utilizó como control positivo suero hiperimmune α -AgE/S producido en hámster y suero preimmune de hámster y conejo como control negativo. Los sueros α -mimótopos fueron diluidos 1:100 en PBS-Tween 0.3% - leche descremada Svelty al 5% e incubados con la membrana de nitrocelulosa por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. Después de este tiempo se realizaron tres lavados con PBS - Tween 0.3% de 5 minutos cada uno. Como segundo anticuerpo se utilizó α -IgG de hámster para el control positivo, y α -IgG de conejo para el resto de .las muestras, ambos peroxidados (Zymed) a una dilución 1:2000. Este segundo anticuerpo se incubó por una hora en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron de igual forma y se procedió el revelado de la reacción utilizando diaminobencidina (DAB). Esta reacción se llevó a cabo durante dos minutos y se detuvo realizando tres lavados rápidos con PBS y un lavado de cinco minutos con agua destilada. Las bandas obtenidas en las membranas del inmunoblot fueron analizadas en el software 1D Image Analysis de *Kodak Digital Science*.

5. Resultados

Después de haber recolectado el medio de cultivo en donde se mantuvieron las tenias, éste se concentró para así obtener los AgE/S los cuáles fueron utilizados para realizar una SDS-PAGE para apreciar su composición y el patrón de separación de proteínas de acuerdo a sus pesos moleculares. En la figura 9 se observa en el carril 1 con los pesos moleculares utilizados, en el carril 2 los AgE/S, en donde se aprecian bandas en el rango de 10 a 200 kDa y bandas de aproximadamente 24, 36, 48 y 72 kDa, las cuáles han sido propuestas como diagnósticas para la teniasis causadas por *T. solium*⁶⁸.

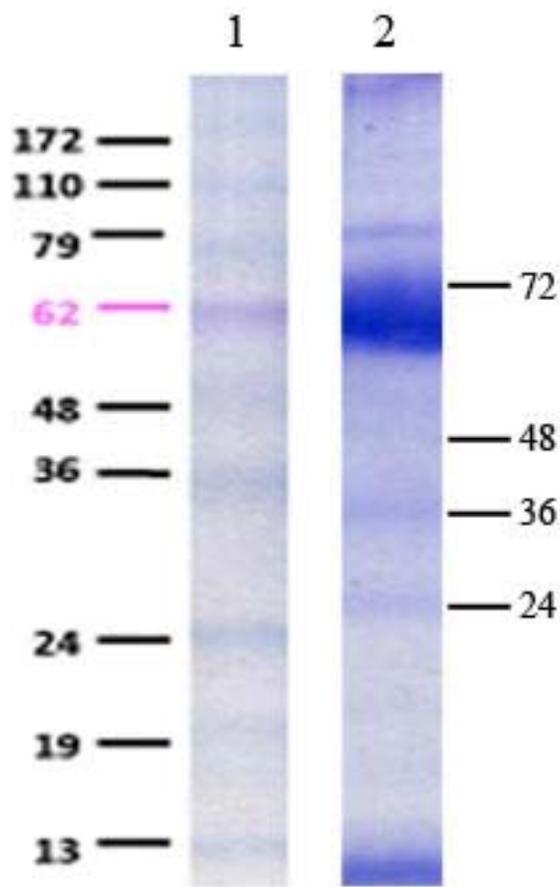


Figura 8: SDS-PAGE donde se observa: 1. Marcadores de peso molecular y 2. AgE/S del adulto de *Taenia solium*.

Estos AgE/S fueron transferidos del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Esta membrana fue utilizada para realizar la adsorción de anticuerpos del suero hiperinmune de hámster α -AgE/S. Después de la adsorción de anticuerpos, se cortó la zona correspondiente a la proteína de 36 kDa, para posteriormente eluir los anticuerpos α -P36 con glicina ácida que se utilizaron para la selección de mimótopos. En la figura 9, se muestra un inmunoblot realizado con la membrana de nitrocelulosa que contiene los AgE/S enfrentado contra suero hiperinmune de hámster α -AgE/S (carril 2) y los anticuerpos α -P36 (carril 3). En el carril 2 se muestra el mismo patrón de bandas que en la figura 8. Esto nos confirma que la transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana se realizó con éxito. En el carril 3 se muestra una banda de color intenso en la zona de los 36 kDa, lo que nos confirma que los anticuerpos eluidos reconocen sólo a la P36, que es la proteína diagnóstica de interés en este trabajo.

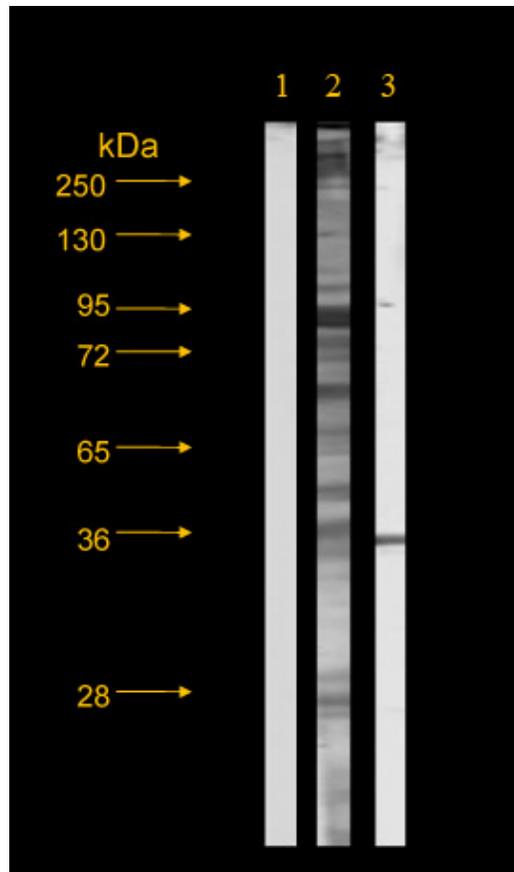


Figura 9: Inmunoblot de AgE/S del adulto de *Taenia solium* enfrentado contra: 1. Suero normal de hámster (control negativo) 2. α -AgE/S del adulto de *T. solium* (control positivo) y 3. Anticuerpos eluidos α -P36.

Una vez purificado el anticuerpo α -P36, se realizó la selección de mimótopos para P36 mediante el tamizaje de una biblioteca de fagos que contenían péptidos de 12 aa desplegados en la pIII de su cápside. Se aislaron 32 clonas y se preparó su ADN para secuenciación. El análisis de la traducción de las secuencias nucleotídicas se llevó a cabo con el programa PC/GENE y se muestra a continuación en la tabla 1.

Clona	Secuencia										Clona	Secuencia													
20	T	H	A	V	A	F	P	P	P	Y	L	T	38	M	Q	M	E	Y	I	R	L	S	S	S	S
21	T	H	L	T	G	T	L	Y	P	T	R	P	39	S	H	N	S	L	S	R	I	L	D	N	M
22	L	H	K	L	S	S	A	A	L	S	F	-	40	N	A	K	I	K	P	P	L	W	I	G	P
23	L	P	Y	T	S	V	T	A	Q	Q	Q	L	41	T	P	P	P	R	E	P	H	F	A	P	V
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42	I	N	N	S	P	Y	I	P	S	S	R	A
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43	S	H	T	N	F	L	L	T	Q	L	N	A
28	L	S	V	S	P	N	D	G	T	I	R	P	44	H	L	H	S	S	A	S	S	S	V	S	N
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	S	P	Y	Q	H	P	K	T	L	F	L	P
30	T	S	T	N	Y	P	P	P	T	E	G	A	46	A	L	N	H	S	T	A	Y	H	N	R	I
31	Y	P	T	V	L	N	F	T	P	A	H	L	47	V	V	T	P	A	P	I	A	L	A	V	Q
32	T	V	P	V	S	N	R	A	H	V	F	S	48	N	L	Q	P	S	E	P	F	S	T	T	M
33	L	P	P	K	Q	T	I	L	N	S	H	G	49	L	S	Y	P	A	R	N	S	L	P	M	S
34	Y	A	P	R	A	A	P	L	L	H	Y	N	50	A	K	Q	P	L	H	A	S	S	P	L	M
35	A	P	S	S	H	P	G	G	-	V	V	S	51	T	F	S	Q	H	L	Y	G	A	H	A	P
36	G	N	S	F	V	L	H	M	S	R	P	L	52	N	M	Q	G	L	G	S	T	R	T	G	V
37	F	T	L	P	L	N	Y	S	H	K	A	V	53	N	P	M	V	Y	F	P	R	T	T	F	E

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos obtenidas de cada clona a partir de su secuencia nucleotídica.

Asimismo las secuencias y alineaciones se realizaron con clustal X, incluido del programa PCGENE. Las alineaciones finales para ajustes finos se realizaron de forma manual. Se formaron grupos de clonas de acuerdo a la similitud entre las secuencias de aa, para así poder formar consensos para seleccionar las clonas que se utilizarían en la inmunización de lo conejos para la producción de sueros anti-mimótopos. En la tabla 2 se muestran los resultados de la alineación y agrupamiento de las secuencias de aa de las clonas.

20		T	H	A	V	A	F	P	P	P	Y	L	N	43	S	H	T	N	F	L	L	T	Q	L	N	A												
21		T	H	L	T	G	T	L	Y	P	T	R	P	45	S	P	Y	Q	H	P	K	T	L	F	L	P												
44				H	L	H	S	S	A	S	S	S	V	S	N	46			A	L	N	H	S	T	A	Y	H	N	R	I								
38	M	Q	M	E	Y	I	R	L	S	S	S	S	28	L	S	V	S	P	N	D	G	T	I	R	P													
42	I	N	N	S	P	Y	I	P	S	S	R	A	22	L	H	K	L	S	S	A	A	L	S	F	-													
40						N	A	K	I	K	P	P	L	W	I	G	P	23	L	P	Y	T	S	V	T	A	Q	Q	Q	L								
50									A	K	Q	P	L	H	A	S	S	P	L	M	33	L	P	P	K	Q	T	I	L	N	S	H	G					
37									F	T	L	P	L	N	Y	S	H	K	A	V	34	Y	A	P	R	A	A	P	L	L	H	Y	N					
36						G	N	S	F	V	L	H	M	S	R	P	L	35																				
49						L	S	Y	P	A	R	N	S	L	P	M	S	47	V	V	T	P	A	P	I	A	L	A	V	Q								
28						L	S	V	S	P	N	D	G	T	I	R	P	52	N	M	Q	G	L	G	S	T	R	T	G	V								
39	S	H	N	S	L	S	R	I	L	D	N	M	48	N	L	Q	P	S	E	P	F	S	T	T	M													
40									N	A	K	I	K	P	P	L	W	I	G	P	51	T	F	S	Q	H	L	Y	G	A	H	A	P					
50														A	K	Q	P	L	H	A	S	S	P	L	M	53	N	P	M	V	Y	F	P	R	T	T	F	E
37									F	T	L	P	L	N	Y	S	H	K	A	V																		
41						T	P	P	P	R	E	P	H	F	A	P	V																					
30	T	S	T	N	Y	P	P	P	T	E	G	A																										
31					Y	P	T	V	L	N	F	T	P	A	H	L																						
32						T	V	P	V	S	N	R	A	H	V	F	S																					

Tabla 2. Agrupación de las secuencias de péptidos de las clonas antimimótopos obtenidas. Se muestran los consensos que existen entre las clonas. Las que están sombreadas de color verde con aquellas que se seleccionaron para la producción de sueros anti-mimótopos en conejos.

Después de haber realizado el análisis antes mencionado, se seleccionaron tres clonas para inmunizar conejos y así producir los anticuerpos anti-mimótopos. Las clonas que fueron seleccionadas son las que tenían el mayor número de aminoácidos comunes dentro del grupo al que pertenecían, éstas se muestran en la tabla 3.

Clonas	Secuencia	Conejo
21	THLTGTLYPTRP	1
49	LSYPARNSLPMS	3
52	NMQGLGSTRTRGV	4

Tabla 3. Secuencias de los mimótopos seleccionados para la producción de sueros anti-mimótopos en conejo.

Los conejos fueron inmunizados de acuerdo al esquema de inmunización descrito con anterioridad. Una vez que se obtuvieron los sueros en contra de cada uno de los mimótopos seleccionados, se realizó un inmunoblot con los AgE/S con el objetivo de observar la especificidad en el reconocimiento de cada suero α -mimótopo producido. En la figura 10 se puede apreciar que el suero anti-mimótopo para la P36 de la clona 21 reconoció fuertemente una banda en la región de 24 kDa y también de forma más débil, dos bandas en la región de 36 y 48 kDa. Así mismo, se puede apreciar que el suero anti-mimótopo de la clona 49 reconoció una banda en la zona de 36 kDa. Por último, se aprecia que el suero anti-mimótopo de la clona 52 no tuvo éxito para detectar alguna banda en los AgE/S.

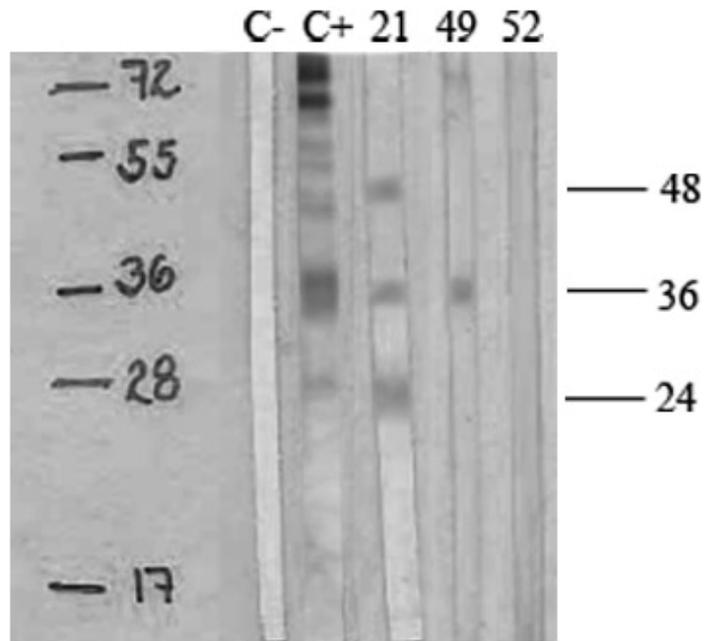


Figura 10. Inmunoblot con los AgE/S del adulto de *Taenia solium* enfrentados con sueros α -mimótopos 21, 49 y 52. Se muestra el control negativo (suero normal de conejo) y el control positivo (suero hiperinmune anti-AgE/S de conejo).

6. Discusión

La composición de los AgE/S obtenidos a partir del cultivo de adultos de *T. solium* en medio RPMI + antibióticos fue verificada en un PAGE-SDS, el cual mostró que tiene una composición compleja de diferentes antígenos. Con esta mezcla compleja de antígenos, se produjo un suero hiperinmune en contra de las proteínas presentes en los AgE/S, lo que confirma la complejidad de los antígenos en esta fracción. Considerando el trabajo de Ochoa-Sánchez, se decidió purificar los anticuerpos específicos para P36 debido a que esta proteína demostró tener un gran potencial como antígeno diagnóstico para la teniasis causada por *T. solium*⁶⁸. El procedimiento de adsorción/elución de anticuerpos que se llevó a cabo fue clave en este trabajo, ya que esto nos permitiría obtener anticuerpos específicos en contra la proteína P36 de los AgE/S. Así mismo, nos habilitó para llevar a cabo el proceso de selección y aislamiento de mimótopos para la P36 mediante el tamizaje de una biblioteca de fagos que contenían péptidos de 12 aa desplegados en la proteína 3 de su cápside. Otro punto clave en este trabajo, fue que en el tamizaje realizado, la astringencia de los lavados de las placas con PBS-Tween 20 fue incrementando desde 0.3 % hasta 1 % para que así, obtuviéramos sólo aquellos péptidos mimótopos que interaccionaban de manera más específica con el anticuerpo utilizado. Aquellos péptidos que se unieran de forma débil al anticuerpo serían separados del mismo por efecto de la astringencia que genera el detergente Tween-20.

Esto llevó al aislamiento de 32 clonas de mimótopos potenciales para P36, se extrajo el ADN del fago, se obtuvieron las secuencias de los 12 aa que componen a los diferentes mimótopos contenidos en los fagos. Estas secuencias fueron agrupadas de acuerdo a la similitud y repetición entre sus aa, logrando así un patrón de similitud entre las diferentes clonas aisladas. De los 10 grupos formados se seleccionaron 3 clonas, siendo éstas las más representativas de cada uno. Con estas 3 clonas se inmunizaron conejos para la producción de sueros anti-mimótopos los cuáles fueron analizados posteriormente por inmunoblot. Es importante resaltar que sólo los sueros de las

clonas 21 y 49 reconocieron bandas en los 24, 48 y 36 kDa, mientras que el suero de clona 52 no reconoció ninguna banda en los AgE/S. El reconocimiento por el suero anti-mimótopo 21 de las bandas 24, 48 y 36 kDa en los AgE/S podría explicarse mencionando que posiblemente todos estos antígenos son productos de degradación de la proteína de 48 kDa que se aprecia en el PAGE-SDS de los AgE/S y que comparten el epítipo reconocido por el suero anti-mimótopo 21. Esta propuesta se ha considerado ya que inclusive los pesos moleculares de los diferentes antígenos presentan una relación aritmética al ser múltiplos de 12 kDa. En el caso del suero anti-mimótopo 49 el cual reconoció una única banda en la región de 36 kDa, se puede afirmar que es un mimótopo específico de la proteína P36 de los AgE/S del adulto de *T. solium*.

Respecto al suero anti-52 el cual no reconoció ninguna banda en los AgE/S pudiera deberse a que el mimótopo es de índole conformacional, es decir, que el péptido que contenía el fago fue reconocido por el anticuerpo con la estructura que tenía dicho péptido al estar unido a la pIII de la cápside del fago y que, al ser desnaturalizada la proteína en el inmunoblot, el suero anti-mimótopo ya no fue capaz de reconocerla. Los péptidos que están desplegados en la pIII de la cápside del fago M13KE tienen una conformación estructural que depende de la secuencia de los 12 aa y sus interacciones que existen entre ellos y los aa de la p3 generando así estructuras diferentes entre cada uno de los péptidos desplegados en el fago.

De acuerdo a los hallazgos de este trabajo, podemos decir que se obtuvieron 2 mimótopos para la P36, uno específico y uno más que reconoce también a los antígenos P24 y P48, los cuales tienen potencial para ser utilizados en el diagnóstico de la teniasis causada por *Taenia solium*. Futuros estudios se realizarán para demostrar la factibilidad de esta aseveración.

7. Conclusiones

- Se obtuvieron los antígenos de Excreción/Secreción (AgE/S) a partir de la forma adulta de *Taenia solium*.
- Se produjo un suero hiperinmune contra los AgE/S en hámster.
- Mediante la técnica de adsorción/elución se purificó el anticuerpo específico para la P36.
- Se aislaron 3 clonas de mimótopos de P36 a partir de una biblioteca de fagos (M13KE).
- Se produjeron dos sueros anti-mimótopos de las clonas 21 y 49, los cuáles reconocieron con éxito antígenos potenciales para el diagnóstico de la teniasis causada por *T. solium*.

8. Anexos

Preparación de disoluciones.

PBS

Para un litro:

NaCl	8.00 g.
KCl	0.20 g.
Na ₂ HPO ₄	1.44 g.
KH ₂ PO ₄	0.24 g.

Posteriormente ajustar pH a 7.4 y aforar.

TE

Para un litro:

Tris HCl	10 mM
EDTA	1 mM

PEG 20% / NaCl 2.5 M

Para un litro:

Polietilenglicol 8000	200.0 g.
NaCl	146.1 g.

TBS

Para un litro:

Tris – HCl	12.11 g.
------------	----------

NaCl	60.0 mL
------	---------

IPTG 200 mM / X – gal 100 mM

Para 25 mL:

IPTG	1.25 g.
------	---------

X – gal	1.0 g.
---------	--------

Disolver en 25 mL de dimetilformamida, proteger de la luz y almacenar a -20 °C.

Amortiguador para electroforesis de proteínas.

Para un litro:

Tris – Base	15.1 g.
-------------	---------

Glicina	94.0 g.
---------	---------

SDS 10%	50.0 mL.
---------	----------

Amortiguador para transferencia de proteínas.

Para un litro:

Tris – Base	3.08 g.
-------------	---------

Glicina	14.48 g.
---------	----------

Metanol abs.	200 mL.
--------------	---------

Preparación de medios.

Medio LB

Para un litro:

Triptona	20.0 g.
----------	---------

Extracto de levadura	5.0 g.
----------------------	--------

NaCl	10.0 g.
------	---------

SOB

Para un litro:

Tryptona	20.0 g.
----------	---------

Extracto de levadura	5.0 g.
----------------------	--------

NaCl	0.5 g.
------	--------

KCl 20 mM	10.0 mL
-----------	---------

Agar	15.0 g.
------	---------

Sulfato de magnesio 2M	5.0 mL
------------------------	--------

Para hacer medio Top SOB agregar sólo 10.5 g de agar

Medio Mínimo (M9)

Para un litro:

Sales 5x M9	200 mL
-------------	--------

Glucosa 20%	20 mL
-------------	-------

Sulfato de magnesio 1M	2 mL
------------------------	------

CaCl ₂ 1 M	0.1 mL
-----------------------	--------

***Escherichia coli* cepa TG1**

Genotipo *supe hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacIq lacZΔM15]*

Para inducir la formación del pili F debe de ser cultivada en cajas de medio adicionado con vitamina B1 al 0.5%

Preparación de gel de acrilamida para electroforesis de proteínas (12.5%)

Cantidades para dos geles:

Gel separador:

Mezclar perfectamente 4.2 mL de acrilamida 30% / bi-acrilamida 0.8%, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 2.4 mL de H₂O, 200 µL de SDS 10%, 66 µL de persulfato de amonio 10%, 6.6 µL de TEMED y cargar en los vidrios de preparación. Adicionar H₂O hasta el límite superior de los vidrios y esperar hasta su polimerización.

Gel concentrador

Mezclar perfectamente 1.3 mL de acrilamida 30% / bis acrilamida 0.8%, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 2.4 mL de H₂O, 60 µL de SDS 10%. 20 µL de persulfato de amonio 10%, 3 µL de TEMED y cargar encima del gel separador ya polimerizado. Colocar el peine.

Preparación de gel de agarosa al 1.5% + bromuro de etidio

Para cuatro geles:

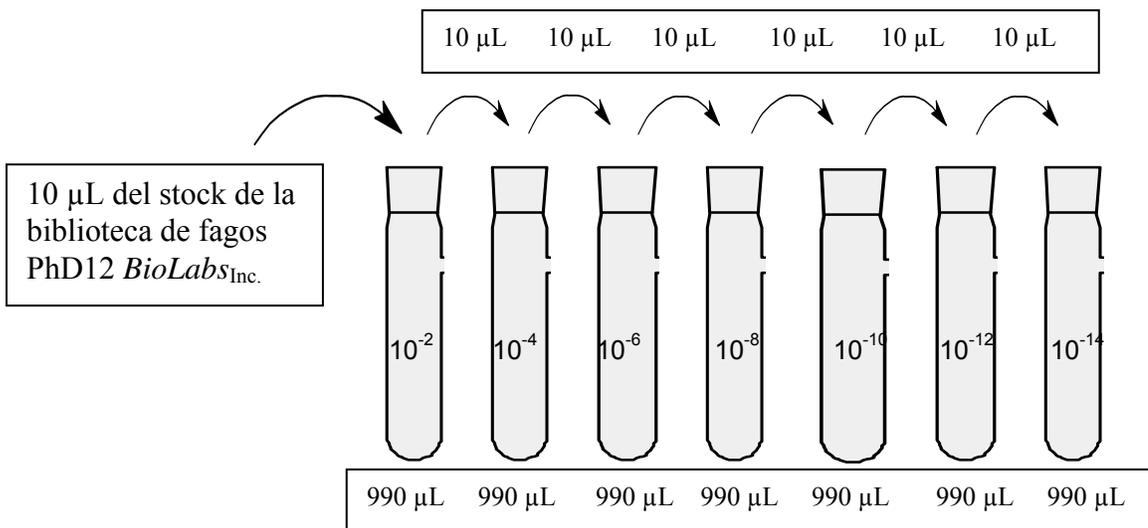
Dosilver 2.4 g. de agarosa en 160 mL de TAE 1X, adicionar 36 µL de bromuro de etidio, mezclar bien y verter en los moldes. Dejar solidificando a 4 °C.

IET

1. Bloquear las tiras de la transferencia con 600 µL de BLOTTO (leche descremada 10% NaN₃ 0.2%) en PBS – Tween 0.3%. Incubar a temperatura ambiente y agitación durante 15 minutos.
2. Adicionar el suero a probar, haciendo los cálculos pertinentes para que la dilución sea la adecuada, generalmente se usa una dilución 1:500. Incubar durante 1 hora.

3. Hacer 3 lavados con PBS – Tween 0.3% dando agitación de 5 minutos entre cada uno de ellos.
4. Adicionar 600 μL del 2º anticuerpo (ditigado contra el primero y acoplado a peroxidasa) diluido 1:2000 en PBS – Tween 0.3%. Incubar durante 45 minutos. Al término de la incubación., hacer tres lavados igual que en el paso 3, y un último lavado con PBS 1X.
5. Adicionar 600 μL de una disolución reveladora de diaminobencidina 0.02% y H_2O_2 0.001% en PBS 1X. Incubar de tres a cinco minutos y detener la reacción con agua destilada.

Dilución de fagos para titulación y cálculos para la obtención del título.



Cálculo de del título de fagos:

de placas * Vol. De Infección * factor de conversión * Inverso de la dilución.

Ejemplo: Se inoculó el medio de cultivo con 10 μL de bacterias infectadas y se seleccionó la dilución de 10^{-12} para realizar el conteo de placas, y el número de placas fueron 90, el título de fagos es el siguiente:

$$90 \text{ placas} * 10 \mu\text{L} * (1 \text{ ml}/1000 \mu\text{L}) * 10^{12} = 9 \times 10^{12} \text{ fagos/mL}$$

Nota: Se asume que cada placa es generada por un fago viable en el cultivo.

9. Referencias

1. Sartí, E. "La teniosis y cisticercosis en México por *Taenia solium*" Salud Pública de México, 1997 39(3):225-231
2. Sarti E. "La taeniasis y cisticercosis en México" (revisión bibliográfica). Salud Pública Mex 1986; 28:556-563.
3. Flisser A. Teniosis and cysticercosis due to *T. solium*. "Progress in clinical parasitology". Boca Ratón (FL): CRC Press Inc., 1994; 4:77-116.
4. Schantz P, Sarti E. "Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection". Acta Leiden 1989; 57:153-163.
5. Schantz P, Moore A, Muñoz J, Hartman B, Shaefer J, Aron A et al "Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City". N Eng J Med 1992; 327:692-695.
6. Malagón F. "Elementos del binomio taeniasis/cisticercosis. Una síntesis. En: Flisser A, Malagón F, ed. Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México". México, D.F.: Limusa Noriega, 1989:3-7.
7. Lucas Meza, Antonio, Aguilar Rebolledo, Francisco. "Teniasis humana por *Taenia solium*". Revista Mexicana de Patología Clínica, 2002 49(2):92-99
8. Fan PC. "Taiwan *Taenia* and taeniasis". Parasitol Today 1988;4:86-8.
9. Bowles JR, McManus DP. "Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans". Am J Trop Med Hyg 1994;50: 33-44.
10. Fan PC, Lin CY, Chen CC, Chung WC. "Morphological description of *Taenia saginata asiatica* (Cyclophyllidea: Taeniidae) from man in Asia". J Helminthol 1995; 69:299-303.
11. de Queiroz A, Alkire NL. "The phylogenetic placement of *Taenia* cestodes that parasitize humans". J Parasitol 1998;84:379-83.
12. Hoberg EP. "*Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance". Microbes Infect 2002; 4:859-66.

13. Del Brutto OH, Wadia NH, Dumas M, Cruz M, Tsang VC, Schant PM. "Proposal of diagnostic criteria for human neurocysticercosis". J Neurol Sci 1996;42:1-6
14. Flisser, A., Vargas – Parada, L., Laclette J.P. "Taenia Solium: un parásito cosmopolita". Investigación y Ciencia 2006: 24-33
15. Roberts L., Janovy J. 2000. "Foundations of Parasitology", McGraw Hill, Boston. pp 299-323
16. Rabiela – Cervantes, M., Hernández – Rivas, A., Rodríguez – Ibarra, J., Medina Castillo, S. y Cancino, F. "Anatomopathological Aspects of Human Brain Cysticercosis", en Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. "Cysticercosis: Present state of Knowledge and Perspectives", Academic Press, Nueva York 1982, pp. 179 – 200.
17. Cisticercosis "Guía para profesionales de la salud" Carlos Larralde, Aline S. Aluja, Biblioteca de la salud, Lecturas, 2006
18. Aguilar – Díaz H et al. "The Genome Project of *Taenia solium*" 2006, Parasitology International 51 (supl.1):127 – 130.
19. Justine, J.L. (1998) "Spermatozoa as phylogenic characters for the Eucestoda", Journal of Parasitology, 84(2):385 – 408.
20. Smith, J.(1969) "The physiology of cestodes", Oliver and Boyd, Edimburgo, pp. 279
21. Silverman, P.H. (1954), "Studies of the biology in some tapeworms of the genus *Taenia*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 48(4):88 – 92.
22. Roberts, L., Janovy, J. (2000). Foundations of parasitology, McGraw Hill, Boston. pp. 299 – 323.
23. Fan, PC, Ma YX, Kuo CH, Chung, WC (1998). "Survival of *T. solium* cysticerci in carcasses of pigs kept at 4 °C. J Parasitology; 84(1):174 – 175.
24. Orta, N., Guna, M., Pérez, J.L. y Gimeno, C. (2000) "Diagnóstico de las teniasis intestinales", Programa de Control de Calidad de SEIMC, Hospital San Dureta, Palma de Mallorca, España, pp. 1 – 9.

25. Alarcón, G. (ed) et. al. (1999). Cisticercosis del Sistema Nervioso, Instituto Ecuatoriano de Salud Pública y Universidad de Guayaquil, Ecuador. Pp.21 – 26.
26. Laclette, J.P., M. Rodríguez, A. Ianda, L. Arcos, O. de Alba, R. Mancilla y K. Willms (1989), “The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B”, Acta Leidensia 57(2):115 -122.
27. Flisser, A., B. Espinoza, A. Tovar, A. Plancarte y D. Correa (1986), “Host – parasite relationship in cisticercosis: immunologic study in different compartments of the host”, Veterinary Parasitology 20:95 – 102.
28. Ferrer, E. (2007) “Teniasis/Cisticercosis: del diagnóstico convencional al diagnóstico molecular”, Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, 11(supl. 1): 57 – 61.
29. Mayta H, Talley A, Gilman RH, Jiménez L, Verastegui M, Ruiz M, et al. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple Hematoxylin-Eosin Staining and PCR Restriction Enzyme Analysis. J Clin Microbiol 2000;38:133-7.
30. Alla, JC, Ávila G, García-Noval J, Flisser A, Craig PS. (1990), “Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. Parasitology;101:473 – 477.
31. Machnicka B, Dziemian E, Zwierz C. Detection of *Taenia saginata* antigens in faeces by ELISA. Appl Parasitol 1996;37:106-10.
32. Montenegro TC, Miranda EA, Gilman R. Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*. Ann Trop Med Parasitol 1996;90:145-55.
33. Wilkins PP, Allan JC, Verastegui M, Acosta M, Eason AG, García HH, et al. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. Am J Trop Med Hyg 1999;60:199-204.
34. Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, et al. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. N Engl J Med 1992;327:692-95.

35. Pardini AX, Vaz AJ, Dos Ramos Machado L, Livramento JA. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *J Clin Microbiol* 2001;39: 3368-72.
36. Wagner A. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis: ensayos de detección de anticuerpos y de antígenos circulantes. Trabajo especial de grado presentado en la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Magíster Scientiarum 2001.
37. Harrison LJS, Joshua GW, Wright SH, Parkhouse RME. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1989;11:351-70.
38. Wang CY, Zhang HH, Ge LY. A Mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma*. 1992;11: 825-27.
39. Diwan AR, Coker - Vann M, Brown P, Subianto DB, Yolken R, Escobar A, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am J Trop Med Hyg* 1982;20:775-79.
40. Larralde C, Laclette J, Owen C, Madrazo I, Sandoval M, Bojalil R, et al. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:965-73.
41. Ev L.V., Maia A.A., Pianetti G., Nascimento E. (1999). Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 85: 98-102.
42. Park SK, Yun DH, Chung JY, Kong Y, Cho SY. The 10 kDa protein of *Taenia solium* metacestodes shows genus specific antigenicity. *Korean J Parasitol* 2000;38:191-94.
43. Gottstein B, Zini D, Schantz PM. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop Med Parasitol* 1987;38:299-303.

44. Ng TF, Ko RC. Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:421-22.
45. Molinari JL, García-Mendoza E, de la Garza Y, Ramírez JA, Sotelo J, Tato P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:777-81.
46. Tsang V, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 1989;159: 50-9.
47. Ito A, Plancarte A, Ma L. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:291-94.
48. Bundy Dap. New initiatives in the control of helminths. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990;84:467-468.
49. Garattini S, Goldin A, Hawking F, Kopin IJ. Chemotherapy of human intestinal helminthiasis: A review, with particular reference to community treatment. *Adv Pharmacol Chem* 1982;19:128-154.
50. Botero D, Tanowitz H, Weiss L, Wittner M. Taeniasis and cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am* 1993;7:683-697.
51. Lara AR. Las geohelmintiasis en México y perspectivas de su control. *Salud Publica Mex* 1984;26:573-578.
52. Navarro A, Mazzotti L. Tratamientos colectivos de la parasitosis intestinal. *Rev Inst Salub Enf Trop* 1961;30:311-322.
53. Botero D, Ocampo NE. Tratamiento de teniasis y de himenolepiasis con praziquantel. *Colombia Med* 1982;13:131-134.
54. Canzonieri CJ, Rodríguez RR, Castillo HE, Ibáñez-de Balella C, Lucena M. Ensayos terapéuticos con praziquantel en infecciones con *T. solium* e *Hymenolepis nana*. *Bol Chil Parasitol* 1977;32:41-42.
55. Pearson RD, Guerrant RL. Praziquantel: A major advance in anthelmintic therapy. *Ann Intern Med* 1983;99:195-198.

56. Groll E. Panorama general del tratamiento de las infecciones humanas por céstodos con Praziquantel. Bol Chil Parasitol 1977;30:27-31.
57. King CH, Mahmoud AF. Drugs five years later: Praziquantel. Ann Intern Med 1989;110:290-296.
58. Huang SW. A clinical approach to a patient with praziquantel hypersensitivity. J Allergy Clin Immunol 1992;90:867.
59. Pawlowski Z. Control of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis by focus oriented chemotherapy of taeniasis. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991;suppl 48:284-286.
60. Chung WC, Fan PC, Lin CY, Wu CC. Poor efficacy of albendazole for the treatment of human taeniasis. Int J Parasitol 1991;21:269-270
61. De Kaminsky RG. Albendazole treatment in human taeniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991;85:648-650.
62. Girard de Kaminsky R. Albendazol en taeniasis. Investig Med Intern 1984;1:15-19.
63. Kobayashi A. Programa japonés para el control de las geohelmintiasis. Salud Publica Mex 1984;26:579-588.
64. Sotelo J, Del Brutto O, Penagos P, Escobedo F, Torres B. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. J Neurol 1990;11:69-72.
65. Sotelo J, Del Brutto OH, Román GC. Current therapy in neurology diseases. Curr Clin Top Infect Dis 1996;16:240-259.
66. Hassan M. E. Azzazy, W. Edward Highsmith, Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. Clinical Biochemistry 35 (2002) 425 – 445.
67. Sachdev S. Sidhu . Engineering M13 for phage display. Biomolecular Engineering 18 (2001) 57–63
68. Ochoa – Sánchez A. Identificación de Antígenos específicos de *Taenia solium* adulto, utilizando el modelo de taeniasis en hámster (*Mesocricetus aureatus*). México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007

69. Baranski M.C., Gomes N.R., de Godoy O.F., da Silva A.F., Kotaka P.I., Giavannoni M., Carneiro Filho M. "Treatment of taeniasis and hymenolepis nana with a single oral dose of praziquantel. Study of therapeutic efficacy, tolerance and safety. *Materia Medica Polona Polish Journal of Medicine and Pharmacy*. 1984 Apr – Dec; 16(2 – 4):129 – 33.