



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y doctorado en ciencias de la salud y producción animal

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Departamento de genética y bioestadística

Laboratorio de genética molecular

***“Selección y caracterización de clonas inmunodominantes obtenidas por Phage Display como mimótopos candidatos de larva 3 de Haemonchus contortus”***

Tesis

Que para optar por el grado de maestría en ciencias de la producción y de la salud animal

***Presenta***

Jorge Enrique Vázquez Bucheli

**Tutor:** Dr. Rogelio A. Alonso Morales  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
México, Ciudad de México, Agosto 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Agradecimientos:**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia a las que les debo toda mi formación profesional.

Al laboratorio de Genética molecular de la Facultad de medicina Veterinaria y Zooecnia por proporcionarme todos ls recursos para realizar mi proyecto.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales por darme la oportunidad de trabajar con usted, siempre resolver mis dudas y ayudarme a desarrollar un pensamiento crítico pero sobre todo por siempre brindarme su amistad, conocimiento, apoyo y paciencia.

A la Biol. Amanda Gayosso Vázquez por siempre apoyarme en mi trabajo de laboratorio y por brindarme su gran amistad, comprensión y muchas veces su consejo.

A Amanda, Adri, Mario, Jess, Pablo, Lalo, Erika, Vianey, Luz, Alex, por ser los mejores compañeros de laboratorio que haya podido desear, por hacer más leves los momentos difíciles y hacer muy alegres los buenos momentos.

### **Dedicatoria:**

A mis padres por todo amor y apoyo, no habría logrado nunca esto sin su guía, no solo son unos buenos padres sino unos grandes consejeros, todo lo que he logrado es por ustedes, gracias por creer en mí con mis virtudes y defectos, les debo todo lo que soy ahora.

A mi hermana porque aunque siempre tenemos diferencias sabemos sobrellevarlas para apoyarnos el uno al otro, sé que nunca lo demuestro pero te quiero mucho mocosa, gracias por apoyarme siempre que te necesito.

A mi novia Cristina por aguantar mi carácter y niveles altos de estrés sobretodo en épocas de tutorales y exámenes. Por siempre creer en mí, apoyarme y escucharme cuando más lo necesitaba y por todos los grandes momentos que hemos pasado juntos tanto los buenos como los malos, eres la mejor novia, ¡te amo!

A todos mis amigos dentro y fuera del laboratorio cada uno ha influido mucho en mí. Cada momento con ustedes lo atesoraré por siempre.

## Contenido

Resumen .....	1
Índice de figuras .....	3
Índice de cuadros .....	5
Introducción .....	7
Justificación .....	21
Hipótesis .....	21
Objetivo general .....	22
Objetivos específicos .....	22
Material y métodos .....	22
Obtención y propagación de la fase L3 de <i>Haemonchus contortus</i> .....	22
Obtención de L3 de <i>Haemonchus contortus</i> .....	23
Técnica de Baermann para la concentración de las larvas de los cultivos. ....	24
Técnica de gradientes de densidad con sacarosa para la limpieza de L3 de <i>H. contortus</i> .....	25
Obtención de <i>H. contortus</i> adulto .....	26
Obtención antígeno de L3 y fase adulta de <i>H. contortus</i> .....	26
Cuantificación de antígeno de L3 y adulto por la técnica de Bradford .....	27
Inmunización de conejos con el antígeno obtenido de L3 de <i>H. contortus</i> .....	27
Titulación del antígeno de la fase L3, fase adulta de <i>H. contortus</i> y del suero hiperinmune de conejo contra L3 de <i>H. contortus</i> mediante ELISA indirecta .....	28
Caracterización del antígeno de la fase L3 y adulto mediante electroforesis y Western-Blot ....	30
Purificación, cuantificación y caracterización de IgG de sueros inmunes vs L3 .....	32
Titulación de las IgG de suero hiperinmune de conejo contra antígeno L3 de <i>H. contortus</i> mediante ELISA indirecta .....	33
Selección y amplificación de epítomos dominantes por afinidad de <i>H. contortus</i> .....	33
Tamizaje de clonas .....	33
Selección de clonas individuales .....	35

Obtención de fago.....	36
Purificación de ADN .....	37
Caracterización de epítomos por secuenciación de ADN .....	38
Caracterización de las clonas seleccionadas del 3° tamizaje mediante ELISA indirecto .....	39
Selección de clonas candidatas.....	40
Inmunización de conejos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) con clonas candidatas.....	40
Evaluación de la reactividad de las clonas candidatas mediante ELISA indirecto .....	41
Caracterización del suero anti clonas candidatas contra el antígeno de L3 y adulto de <i>H. contortus</i> mediante Western-Blot .....	42
<b>Resultados</b> .....	<b>44</b>
1º Infección, cultivo de larva 3.....	44
Cuantificación de antígeno L3 y adulto por la técnica de Bradford.....	45
Titulación del antígeno de la fase adulto y L3 de <i>H. contortus</i> mediante ELISA indirecta.....	45
Titulación del suero hiperinmune de conejo contra adulto y L3 de <i>H. contortus</i> mediante ELISA indirecta .....	46
Titulación del suero hiperinmune de conejo y ovino contra adulto y L3 de <i>H. contortus</i> mediante ELISA indirecta .....	47
Caracterización del antígeno de la fase L3 y adulto mediante Western-blot.....	49
Purificación y caracterización de IgG .....	51
Titulación de IgG de conejo específicas contra L3 y adulto de <i>H. contortus</i> mediante ELISA indirecta .....	53
Phage display .....	54
Purificación de ADN de las clonas seleccionadas.....	55
Análisis de secuencias.....	56
Caracterización de las clonas seleccionadas del 3° tamizaje de ambas bibliotecas mediante ELISA indirecto .....	57
Secuenciación clonas 4º Tamizaje .....	61
Selección de clonas candidatas.....	63

Análisis de secuencias de clonas seleccionadas .....	64
Titulación del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas mediante ELISA indirecta durante el periodo de inmunización.....	65
Titulación del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas contra Ag de L3 mediante ELISA indirecta .....	66
Titulación del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas contra las clonas candidatas mediante ELISA indirecta .....	67
Reactividad del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas contra Ag de L3 y adulto mediante Western-blot .....	68
<b>Discusión y conclusiones.....</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>74</b>

## Resumen

*Haemonchus contortus* es un parásito de gran importancia en México y el mundo debido a su virulencia e impacto económico. El uso indiscriminado de antihelmínticos ha provocado la selección de poblaciones resistentes, haciendo necesarios métodos alternativos para su control. Se ha reportado que el empleo de inmunógenos del parásito reduce significativamente la carga parasitaria en animales infectados, por lo que la investigación de antígenos con capacidad inmunoprotectora es un área promisorio para el control del patógeno. En este trabajo se empleó el tamizado de bibliotecas combinatorias de despliegue en fagos (Phage display) con anticuerpos heterólogos contra *H. contortus* en la selección de mimótupos inmunodominantes.

Se obtuvo antígeno de *H. contortus* de larva 3 (L3) infectando experimentalmente ovinos, este se empleó en la obtención de suero hiperinmune en conejos SPF. Adicionalmente, se obtuvo antígeno de la fase adulta. Los antígenos se caracterizaron mediante electroforesis en PAGE-SDS y se evaluó la reactividad de los antisueros por ELISA e inmunotransferencia. El antisuero obtenido contra L3 detectó antígenos tanto de la fase L3 como de la fase adulta, indicando que existen antígenos conservados a lo largo del desarrollo del parásito. Se purificaron las IgG de los antisueros contra L3 y se emplearon en el tamizado de bibliotecas



combinatorias de despliegue en fagos de 7 y 12 aminoácidos seleccionando 20 clonas por biblioteca. Las clonas se evaluaron en su reactividad antigénica por ELISA y por secuenciación de nucleótidos. Se encontraron clonas con diferentes niveles de reactividad a los anticuerpos contra L3. La secuencia de nucleótidos reveló clonas que se seleccionaron repetidamente. De 40 clonas seleccionadas se obtuvieron 18 secuencias de aa diferentes. En la biblioteca de 7 aminoácidos se obtuvieron secuencias que se repitieron 5, 3 y 2 veces. En la biblioteca de 12 aminoácidos se obtuvieron secuencias repetidas 7, 5, 3 y 2 veces. Con base en su nivel de repetición y reactividad antigénica se seleccionaron 5 clonas para ser inoculadas en conejos y obtener anticuerpos. Estos sueros se emplearon en ensayos ELISA e inmunotransferencia para evaluar su reactividad contra antígenos del parásito adulto y L3. La mayoría de los antisueros de conejos inoculados con las clonas seleccionadas reaccionaron con antígenos de L3 y adulto, indicando que los péptidos seleccionados corresponden efectivamente a mimótopos naturales del parásito, los cuales son conservados en las fases de desarrollo. Una tarea pendiente es identificar a que proteínas pertenecen estos mimótopos y probar su capacidad inmunoprotectora en un modelo ovino.

**Palabras clave:** Phage display, vacuna, mimótopo, ovino, nemátodo, *Haemonchus contortus*

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo evolutivo de <i>H. contortus</i> .....	9
<b>Figura 2.</b> Genes activados y desactivados entre las diferentes fases del ciclo de vida .....	10
<b>Figura 3.</b> Proceso de tamizaje de fagos de una biblioteca de péptidos .....	19
<b>Figura 4.</b> Reactividad por ELISA indirecto del Ag de L3 y adulto contra suero anti L3 de conejo .....	46
<b>Figura 5.</b> Reactividad por ELISA indirecta del suero antiL3 contra Ag de L3 y adulto .....	47
<b>Figura 6.</b> Reactividad por ELISA indirecta del suero antiL3 del conejo y ovino contra Ag de L3 y adulto .....	48
<b>Figura 7.</b> Gel de acrilamida al 12% con proteína de L3 y adulto de <i>H. contortus</i> ..	49
<b>Figura 8.</b> Reactividad de sueros anti-L3 de <i>H. contortus</i> de conejo vs proteínas de L3 y <i>H. contortus</i> adulto. Ag de L3 y adulto se separaron en geles PAGE-SDS al 12%.....	50
<b>Figura 9.</b> Reactividad de anti-sueros L3 de ovino resistente y susceptible a <i>H. contortus</i> vs proteínas de L3 y parásito adulto. ....	51
<b>Figura 10.</b> Gel de acrilamida al 12 % con IgG purificadas del suero hiperinmune del conejo 5 y 6.....	52
<b>Figura 11.</b> Reactividad por ELISA indirecto del Ag de L3 y adulto contra IgG antiL3 purificadas del conejo 6 .....	53
<b>Figura 12.</b> Gel de agarosa al 1% con ADN de las clonas del 1 al 10 de la biblioteca de 12 péptidos .....	55
<b>Figura 13.</b> Reactividad por ELISA indirecto de las clonas obtenidas de la 3° ronda de tamizaje de la biblioteca Ph.D. C7C contra suero antiL3 .....	58

<b>Figura 14.</b> Reactividad por ELISA indirecto de las clonas obtenidas de la 3° ronda de tamizaje de la biblioteca Ph.D. 12 contra suero antiL3 .....	60
<b>Figura 15.</b> Reactividad ELISA indirecto de cada fecha de inmunización de los conejos vs las clonas candidatas reaccionando contra Ag de L3. ....	65
<b>Figura 16.</b> Reactividad ELISA indirecto de antisuero vs las clonas candidatas reaccionando contra 10 µg de antígeno de L3 y adulto. ....	66
<b>Figura 17.</b> Reactividad de ELISA indirecto de antisuero vs las clonas candidatas reaccionando contra 1x10 <sup>9</sup> de las clonas candidatas. ....	67
<b>Figura 18.</b> Reactividad de 30 µg de antígeno de L3 y adulto contra los sueros anticlonas candidatas .....	68

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Eficiencia de las Inmunizaciones con los 2 principales Ag contra <i>H. contortus</i> .....	14
<b>Cuadro 2.</b> Calendario de inmunización de conejos SPF con Ag de L3 para producción de suero hiperinmune contra <i>H. contortus</i> .....	28
<b>Cuadro 3.</b> Número de identificación y secuencia de cada clona con la que se inmunizará a cada grupo de conejos. ....	41
<b>Cuadro 4.</b> Título de fagos observados durante cada ronda, sin amplificar y amplificados .....	54
<b>Cuadro 5.</b> Título obtenido de la amplificación de cada clona seleccionada durante el tercer tamizaje de la biblioteca Ph.D. C7C.....	54
<b>Cuadro 6.</b> Título obtenido de la amplificación de cada clona seleccionada durante el tercer tamizaje de la biblioteca Ph.D. 12.....	55
<b>Cuadro 7.</b> Resultado del alineamiento de la secuencia expresada de las clonas de la biblioteca Ph.D. C7C contra <i>Haemonchus contortus</i> .....	56
<b>Cuadro 8.</b> Resultado del alineamiento de la secuencia expresada de las clonas de la biblioteca Ph.D. 12 contra <i>Haemonchus contortus</i> .....	57
<b>Cuadro 9.</b> Frecuencia identificada de las 20 clonas seleccionadas mediante phage display de la biblioteca de C7C aa.....	59
<b>Cuadro 10.</b> Frecuencia identificada de las 20 clonas seleccionadas mediante phage display de la biblioteca de 12 aa.....	60
<b>Cuadro 11.</b> Comparación de la frecuencia observada de las secuencias identificadas en el tercer y cuarto tamizaje de la biblioteca Ph.D.12 .....	61
<b>Cuadro 12.</b> Comparación de la frecuencia observada de las secuencias identificadas en el tercer y cuarto tamizaje de la biblioteca Ph.D.C7C. ....	62
<b>Cuadro 13.</b> Número de identificación y secuencia de cada clona con la que se inmunizó a cada grupo de conejos .....	63

<b>Cuadro 14.</b> Análisis de secuencias de clonas seleccionadas. ....	64
<b>Cuadro 15.</b> Peso molecular de las proteínas de referencia usadas para la predicción epítomos.....	69

## Introducción

Los parásitos gastrointestinales causan grandes pérdidas económicas a nivel mundial, repercutiendo negativamente en la eficiencia productiva de los animales en explotaciones de ovinos, se estima que las pérdidas oscilan entre el 10 y 15% del valor total de la población (Radostits, 2002).

La ovinocultura en Australia y Pakistán registra pérdidas de \$369 y \$31.43 millones de dólares (MDD) respectivamente, mientras que los costos por tratamientos anuales de los países que se tiene registro son los siguientes: Kenia \$26 MDD, Sudáfrica \$46 MDD e India \$130 MDD (Cuéllar, 2002; Muhammad, 2011). Por su alta virulencia y su amplia distribución, el nemátodo *Haemonchus contortus* es considerado como uno de los nemátodos gastroentéricos (NGE) más importantes en México (Alba, 2013).

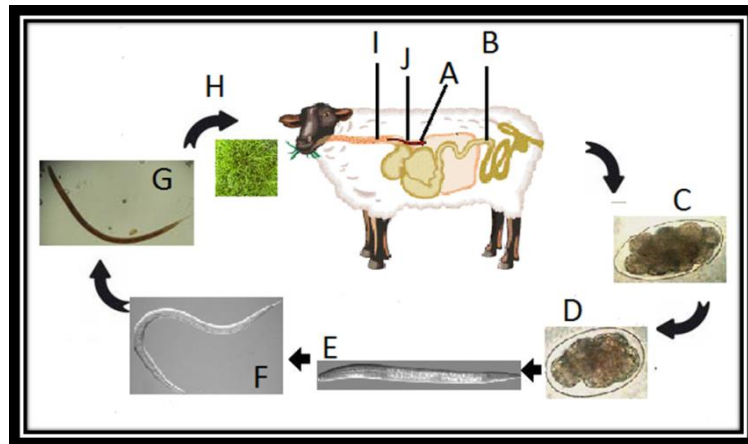
*Haemonchus contortus* es un NGE del orden *Strongylida*, se aloja en el abomaso de rumiantes, su distribución es mundial y se observa principalmente en regiones tropicales y subtropicales; sin embargo se ha encontrado en regiones con clima templado y zonas montañosas (Quiroz, 1984; Roberts, 2000; Troell, 2005).

Recibe el nombre de gusano de “palo de barbería” debido a la coloración rojiza que obtiene por su naturaleza hematófaga junto con la coloración blanquecina de los

ovarios de las hembras que serpentean el intestino del parásito (Quiroz, 1984; Roberts, 2000).

El ciclo de *H. contortus* es directo (Fig. 1). Las condiciones climatológicas del trópico favorecen la presencia e incidencia del parásito, potencializando su efecto sobre la salud animal y disminuyendo su producción. La hembra deposita diariamente en el abomaso de animales afectados entre 5,000 a 10,000 huevos que salen en las heces del huésped. Las larvas eclosionan de los huevos a los 7 a 35 días dependiendo de las condiciones climáticas y se alimentarán durante su fase como larva 1 (L1) y larva 2 (L2) de bacterias que se encuentren en el estiércol. La larva 3 (L3) migra a las hojas del pasto donde es consumida por el huésped durante el pastoreo (Quiroz, 1984; Roberts, 2000; Vázquez, 2004).

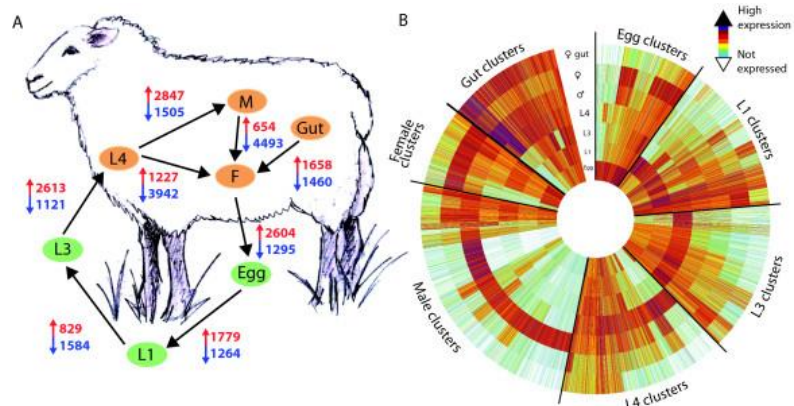
Las L3 migran al abomaso, donde se adhieren a la mucosa. En el abomaso mudan a la fase de larva 4 (L4), las cuales migran al lumen del abomaso, donde se alimentan y mudan a larva 5 (L5) y posteriormente a adultos donde se alimentarán de sangre. Toma entre 21-28 días para que huevos de *H. contortus* aparezcan en las heces, después de que el huésped consume las L3 (Quiroz, 1984; Roberts, 2000; White, 2001; Vázquez, 2004; García, 2008).



**Figura 1. Ciclo evolutivo de *H. contortus*.** (A) Adultos en el estómago. (B) Huevo. (C) Huevo blastomerado en el suelo. (D) Huevo con Larva 1. (E) Larva 1. (F) Larva 2. (G) Larva 3. (H) Infestación vía oral. (I) Larva 3 en migración. (J) Larva 4 y larva 5

La longitud del genoma de *Haemonchus contortus* es de 370 Mb, es el genoma más grande secuenciado de un nemátodo hasta la fecha, contiene 23,610 genes que codifican para proteínas (Laing, 2013). A través de su ciclo de vida, debe adaptarse a diversos ambientes con diferentes fuentes de alimentos (Fig. 2). Esto se refleja en la expresión génica de cada fase (Laing, 2013; Schwarz, 2013).





**Figura 2. (A) Número de genes activados (Rojo) y desactivados (azul) entre las diferentes fases del ciclo de vida. (B) Perfiles de expresión de determinados genes entre cualquier par de etapas, se muestran en agrupaciones ordenadas por la etapa en la que están más altamente expresado.** El círculo del centro muestra los niveles de expresión durante la etapa de huevo siguiendo los círculos que muestra la expresión de genes de las etapas L1, L3, L4, machos adultos, hembras adultas y muestras de intestino de hembra (Tomado de Laing, 2013).

Cada nemátodo consume alrededor de 0.05 ml de sangre por día, dependiendo de factores como raza, edad, respuesta inmune, número de nemátodos en el huésped, etc. Esta parasitosis puede provocar anemia en los animales afectados reflejándose en debilidad, diarrea y mucosas pálidas (Quiroz, 1984; Roberts, 2000; White, 2001; Vázquez, 2004; García, 2008).

La presencia de este parásito también repercute en los parámetros productivos, una infección subclínica puede reducir la ganancia de peso en un 30%, la producción de lana en un 10% y la producción de leche en un 30% (McClure, 2006).

El control de este parásito se basa en romper su ciclo de vida. El método químico es el más utilizado, se han utilizado familias de antiparasitarios comerciales de

amplio espectro. Sin embargo, su uso continuo e irracional ha ocasionado la generación de cepas resistentes a la acción de estos productos. En México se han reportado aislamientos con resistencia del 33.7% a albendazol, 15.8% a bencemidazol (Roberts, 2000; Figueroa, 2000; Rodríguez, 2011).

Otras investigaciones se han centrado en empleo de vacunas con el fin de proteger a los animales antes de que ocurriese la infección con el parásito. La primera estrategia de vacunación fue el empleo de las radiaciones ionizantes y radioisótopos sobre las larvas en una dosis que redujera considerablemente el efecto patógeno de tales larvas sin afectar en grado notable su poder inmunogénico (Smith, 1980; Sztanyik, 1980). Este tipo de vacuna producía un elevado grado de inmunidad adquirida hacía enfermedades helmínticas de los animales domésticos y otorgaba una protección mayor al 80%; sin embargo, producir esta vacuna requería de obtener una gran cantidad de larvas por cada dosis, el almacenamiento de las larvas era difícil pues la viabilidad de estas después de varias semanas de refrigeración o congelación era muy baja y se necesitaban instalaciones y equipo especial para irradiar las larvas. Por estas razones, no fue viable realizar una vacuna comercial contra el parásito.

Se desarrollaron otras tácticas para la elaboración de vacunas como la búsqueda de “antígenos (Ag) ocultos”, éstos son Ag que normalmente no están expuestos al sistema inmune del huésped infectado no son identificados y pueden llegar a ser

más inmunogénicos que los “antígenos naturales”. Ya que estos antígenos son de un órgano interno del parásito, no están en contacto con el tejido del huésped y por lo tanto no están expuestos a su sistema inmune durante la infección. La mayoría de los Ag ocultos descritos hasta el momento en *Haemonchus contortus* forman parte de las proteínas que participan en la cascada de degradación de la hemoglobina y se han propuesto como antígenos inmunoprotectores potenciales. El efecto protector empieza tan pronto el parásito consume la sangre. *Haemonchus* ingiere todos los componentes de la sangre, la cual contiene inmunoglobulinas. Si el huésped está inmunizado con la vacuna que contiene Ag del intestino del parásito, una respuesta de anticuerpos será montada contra éste Ag. Cuando el parásito ingiere la sangre, los anticuerpos se unirán a la superficie de la membrana intestinal causando daño o interfiriendo con el correcto funcionamiento de la membrana (Knox, 2003; Alba, 2013; Bassetto, 2015).

Este enfoque ha sido empleado con éxito utilizando vacunas con el antígeno Bm86 contra las garrapatas del ganado, reduciendo la prevalencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del 80% al 6% en dos años, en países como Cuba, Colombia y Venezuela (Suarez, 2007; Botello, 2011).

Existen trabajos en los cuales se han identificado antígenos con potencial protector. Por ejemplo, Los antígenos H11 (Aminopeptidasa) es una proteína integral de membrana de *Haemonchus* localizada en las microvellosidades intestinales produjo

una reducción de 94% en la eliminación de huevos y 86% de la cantidad de nemátodos machos y 93% de nemátodos hembras con una respuesta inmune eficiente contra el parásito de hasta 126 días (Andrews, 1997). La proteasa de catepsina B (CBL), la contortina (SC) y el complejo Aspartil proteasa, Metaloendoproteasas y cisteínproteasa (H-gal-GP) en el adulto, descrito por (Smith, 1994) son un complejo de glicoproteínas de 1000 KDa extraídas de células intestinales. Estas fracciones son glicosiladas y se unen selectivamente a lectinas con una preferencia por N-acetilgalactosamina (Knox, 2003; LeJambre, 2008) el análisis bioquímico de este complejo ha indicado que contiene aspartoproteasas, metaloproteasas y cisteinproteasas. El mayor componente de H-gal-GP es una familia de 4 metaloendopeptidasas, denominada MEPs 1–4. MEP 3 es la más abundante, sin embargo no se observó protección significativa inmunizando ovinos con MEP1 y MEP 3 recombinantes expresado en bacterias, lo que sugiere que los epítomos conformacionales de MEP son requeridos para la inmunidad (Smith, 2003a).

Del mismo modo, dos aspartoproteasas, nombradas HcPEP1 y dos que fueron identificadas como componentes de H-gal-GP. No fueron protectivos cuando fueron disociados del complejo H-gal-GP (Smith, 2003b).

Otro complejo de proteínas que a diferencia de unirse a lectinas en PNA (Peanut aglutinina) como H-gal-GP se une a lectinas de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), la fracción unida puede separarse por cromatografía en componentes denominados p46, p52 y el complejo de glicoproteínas *Haemonchus* sialilado galactosamina (H-sialgal-gp) H-sialgal-GP y H-gal-GP son igualmente protectivas (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Eficiencia de las Inmunizaciones con los 2 principales Ag contra *H. contortus*.** En todas los experimentos se realizaron 2 o 3 inmunizaciones con la vacuna y posteriormente infectados con larva 3 de *H. contortus*. La eficacia está basada en la reducción de hpg y de nemátodos adultos,

Antígeno	Cantidad (µg)	Núm. dosis	Adyuvante	Eficacia hpg	Eficacia Adultos	Referencia
H11	50	2	FCA/FIA	78.0%	83.0%	Tavernor, 1992
H11	4,500	2	FCA/FIA	n/a	86.5%	Munn, 1993
H11	150	3	FCA/FIA	89.0%	74.9%	Newton,1993
H11	50	3	FCA/FIA	91.0%	86.0%	Andrews, 1997
H11	40	3	Saponina	99.9%	93.6%	Roberts, 2013
H-gal-GP	100	3	FCA	89.0%	69.5%	Smith, 1996
H-gal-GP	100	3	Quil A	93.0%	62.0%	Smith, 2000
H-gal-GP	100	3	Quil A	89.0%	63.5%	Smith, 2003 <sup>a</sup>
H-gal-GP	100	2	Quil A	89.0%	n/a	Smith, 2007
H-gal-GP	100	3	Quil A	88.5%	72.3%	Cachat, 2010

Debido a la diversidad genética del parásito, se esperaría cierto nivel de variación en la estructura de las glicoproteínas en intestino. Esta variación significaría que una vacuna con antígenos de una aislamiento en particular solo sería efectiva contra el mismo aislamiento. Toda la evidencia a la fecha sugiere que este no es el caso, por ejemplo, vacunas de Ag H11 o el complejo H-gal-GP preparada de un

aislamiento susceptible a fármacos fue igual de efectiva que en un aislamiento resistente (Smith, 2007).

Otro ejemplo de los antígenos conservados fue la vacunación con H11 purificada de aislamientos provenientes de Australia y Reino Unido fue igual de efectiva en un desafío con larvas australianas consiguiendo una reducción del 75.5% de los nemátodos en ovinos inmunizados con H11 de Australia y del 60% de los nemátodos en los ovinos inmunizados con H11 de Reino Unido (Newton, 1995). Al igual que una vacuna con glicoproteínas intestinales de *Haemonchus placei* de Reino Unido protegió a terneros en Brasil, consiguiendo una reducción del número de huevos por gramo de heces (hpg) del 97% (Bassetto, 2011).

Un enfoque para el diseño de vacunas ha sido el desarrollo de vacunas a base de proteínas recombinantes, que representan Ag nativos previamente definidos como inmunogénicos (Emery, 1993). La producción comercial de este tipo de vacunas depende de tener disponibilidad de una gran cantidad de Ag de buena calidad, A pesar de un considerable esfuerzo, se ha avanzado poco en el desarrollo de este tipo de vacunas contra nemátodos y hasta el día de hoy se han hecho varios intentos de vacunas para producir versiones recombinantes del antígeno protectorio con poco éxito, (Redmond, 2004; Roberts, 2013) sugiere que este fallo se debe a las diferencias en la glicosilación y/o conformación entre la proteína nativa y la

recombinante. Roberts, demostró que H11 expresada en *Caenorhabditis elegans* era enzimáticamente activa y que tenía estructuras di- y tri - fucosilados que eran similares a los de H11 nativo.

Se observaron algunas diferencias estructurales entre glicanos. Roberts, menciona que los anticuerpos de suero específicos contra H11 nativo se unen a H11 recombinante de *C. elegans* y que la mayoría de los anticuerpos contra H11 recombinante o H11 nativo están dirigidos a restos de glicanos. A pesar de estas similitudes no hubo reducción en el hpg o nemátodos después de la inmunización con H11 recombinante. Otro ejemplo, es una vacuna de antígenos recombinantes conteniendo el complejo H-gal-GP que fue expresado como proteínas solubles recombinantes en células de insecto y dos grupos de ovinos fueron inmunizados tres veces con H-gal-GP nativo o recombinante. Se encontraron altos niveles de anticuerpos en suero reconociendo al complejo H-gal-GP fueron detectadas en ambos grupos al momento de desafío, sin embargo sólo fue observada inmunidad protectora solo en el grupo inmunizado con el complejo H-gal-GP nativo (Cachat, 2010). Estos descubrimientos sugieren que los N-glicanos expresados en Ag recombinante no contribuyen al efecto protector de H11 y que la estructura conformacional del epítipo y los componentes adicionales que están presentes en el extracto del Ag nativo probablemente son necesarios para mejorar la respuesta de anticuerpos que es necesario para la protección (Roberts, 2013).

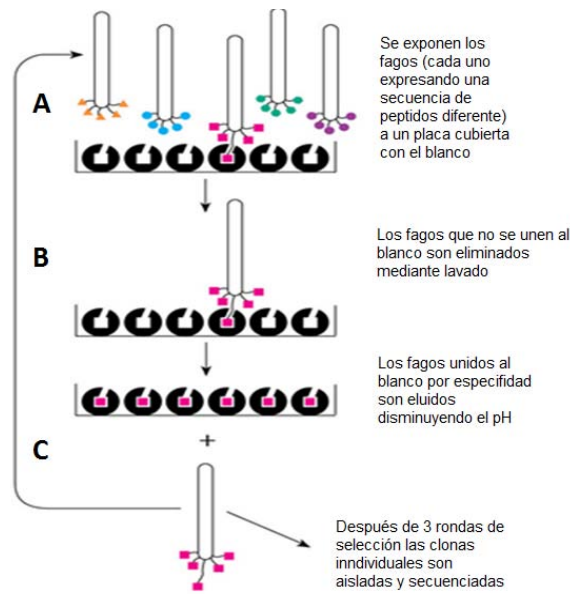
La hipótesis de la coevolución (Janzen, 1980) puede ser una base para la detección de antígenos ocultos. Esta teoría se describe como una carrera armamentística por la cual dos o más organismos ejercen presión de selección mutua y sincrónica que resulta en adaptaciones específicas recíprocas (Leigh Van Valen, 1973). Esto indica que es probable que a lo largo del tiempo *H. contortus* haya coevolucionado junto los rumiantes y desarrollado mecanismos de defensa para evitar ser detectado por su huésped, por ejemplo ocultar antígenos vitales para su desarrollo. Por lo que, si se inmuniza con *H. contortus* una especie filogenéticamente distante a los rumiantes podríamos detectar estos antígenos.

Un método que ha sido empleado con éxito para la selección estos péptidos inmunodominantes de interés, es el sistema de phage display (Ph.D.). Este se basa, en el tamizaje de bibliotecas combinatorias de péptidos expresados en la superficie del fago filamentoso M13 (Fig. 3) empleando anticuerpos específicos (Smith 1997, Tonelli 2013).

La tecnología Ph.D. es una herramienta para identificar estructuras de péptidos que mimetizan a los epítomos naturales. Estos péptidos reciben el nombre de mimótopos (Geysen, 1986). La técnica no requiere ningún conocimiento previo del ligando, y cualquier péptido seleccionado de la biblioteca no necesariamente tienen que parecerse a la secuencia de aminoácidos de un epítomo lineal natural; se pueden



seleccionar puramente a través de su capacidad para imitar la estructura del epítipo conformacional nativo (Ellis, 2012). Para la creación de una biblioteca de péptidos, se insertan oligonucleótidos en el genoma de fagos filamentosos usando la proteína de recubrimiento pIII capaz de desplegar 5 copias de la secuencia expresada en la superficie de cada fago o la proteína principal de recubrimiento pVIII que permite desplegar hasta 2,700 copias de la secuencia expresada en la superficie de cada fago (Smith, 1985; Felici, 1993). Éstas secuencias pueden tener una estructura lineal o conformacional, esta última se logra flanqueando la secuencia con dos residuos de cisteína que formarán entre ellos un enlace disulfuro (Luzzago, 1993). El uso de mimótopos trae consigo varias ventajas sobre los antígenos nativos. Su secuencia corta hace que sean mucho más fácil de producir en comparación con epítipos originales, pueden tener una estructura conformacional; también pueden imitar antígenos no proteínicos, tales como hidratos de carbono; que fácilmente pueden ser codificados por los vectores genéticos comunes y puesto que no hay necesidad de información estructural o secuencial sobre el antígeno original en el proceso de descubrimiento mimótopo, podrían ser contruidos contra antígenos desconocidos. (Riemer, 2007; Knittelfelder, 2009; Kozbor, 2010).



**Figura 3. Proceso de tamizaje de fagos de una biblioteca de péptidos (A)** Una biblioteca de fagos (cada uno mostrando una secuencia diferente de péptidos), es expuesto a una placa recubierta con el blanco. **(B)** Se lavan los fagos no unidos a la placa. **(C)** Los fagos unidos específicamente son eluidos bajando el pH. Después de 3 rondas, se aíslan y secuencian las clonas individuales.

Una vez que las secuencias de los mimótopos que imitan potencialmente la conformación de los epítomos antigénicos han sido plenamente caracterizados, el siguiente paso es desarrollar una vacuna basada en éstos epítomos. Un péptido mimético, inducirá una respuesta inmunitaria equivalente a la inducida por el antígeno nativo (Ellis, 2012). A pesar de algunas dudas sobre la viabilidad de la técnica, los estudios han demostrado que los péptidos son capaces de imitar con éxito estructuras epítomo y por lo tanto esta es una nueva tecnología emergente para la producción de vacunas con la ventaja de que el fago que expresa la secuencia del mimótopo deseado, puede amplificarse fácilmente y en grandes

cantidades para después administrarse junto a un adyuvante. Se ha reportado el uso exitoso de este enfoque en vacunas contra *E. histolytica* y *T. spiralis*. (Melzer, 2002; Gu, 2008).

La técnica de Phage display ha sido ampliamente utilizado para la búsqueda de potenciales inmunógenos para diferentes parásitos. Identificando antígenos con capacidad inmunoprotectora como la proteína de superficie del merozoíto-1 (MSPI), un antígeno que forma parte de la isla de patogenicidad de *Plasmodium* spp. (Sowa 2001, Cheng 2007), el antígeno de superficie (SAG2A) (Cunha-Junior 2010), el cual se encuentra en la superficie de los taquizoitos de *Toxoplasma* spp., y la proteína con doble triptófano (PW2) que integra la superficie de los esporozoitos de *Eimeria acervulina* (Da Silva 2002). En medicina veterinaria se ha utilizado este método para identificar y evaluar mimótopos contra *Fasciola hepatica*. Los mimótopos seleccionados fueron evaluados en bovinos consiguiendo una reducción de huevos de hasta 45.55% y una reducción de adultos de hasta 47.61% (Villa 2008).

## **Justificación**

*Haemonchus contortus* es uno de los parásitos más importantes en rumiantes debido a su alta virulencia, amplia distribución e impacto económico en México y el resto del mundo. El uso indiscriminado de antihelmínticos para su control ha provocado la selección de aislamientos resistentes, por lo que es necesario el uso de métodos alternativos para el control de este parásito (Roberts 2000, Figueroa 2000, Radostits, 2002, Cuéllar 2002, Muhammad, 2011, Rodríguez 2011).

La aplicación de antígenos inmunodominantes obtenidos del parásito ha demostrado reducir significativamente la carga parasitaria de los animales infectados, por lo cual, las líneas de investigación se han dirigido a la búsqueda de antígenos con capacidad inmunoprotectora (Andrews 1997, Knox 2003, LeJambre 2008, Alba 2013). Entre las diferentes técnicas que existen para la identificación de antígenos inmunodominantes, el método del Phage display ha demostrado ser eficiente en la identificación de antígenos con potencial vacunal (Tonelli, 2013).

## **Hipótesis**

El tamizado de bibliotecas combinatorias de despliegue en bacteriófagos con anticuerpos heterólogos dirigidos a la fase infectiva L3 de *Haemonchus contortus*, seleccionará mimótopos inmunodominantes con potencial inmunoprotector.

## **Objetivo general**

Identificar y caracterizar epítomos inmunodominantes de la fase infectiva L3 de *Haemonchus contortus*, seleccionados con anticuerpos heterologos, a partir de bibliotecas combinatorias de Phage Display..

## **Objetivos específicos**

1. Obtener y caracterizar sueros hiperinmunes en conejos contra antígenos de larva 3 de *H. contortus*.
2. Seleccionar clonas a partir de bibliotecas combinatorias de péptidos en phage display empleando IgG anti-L3 y su caracterización antigénica y genética.
3. Estudiar las propiedades antigénicas de las clonas seleccionadas de las bibliotecas.

## **Material y métodos**

### **Obtención y propagación de la fase L3 de *Haemonchus contortus*.**

Con el fin de obtener antígeno de *H. contortus* se efectuaron 2 infecciones de corderos.

### **1º Infección**

Se infectaron diez ovinos criollos (5 machos y 5 hembras) de 5 meses de edad provenientes de la Universidad Autónoma de Chapingo. Cada uno se infectó con una alícuota de 2 ml de conteniendo aproximadamente 6,300 L3 de *H. contortus*.

## **2º Infección**

Se infectaron dos ovinos criollos (2 machos) de 3 meses de edad provenientes de Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal – FMVZ- UNAM (**CEIPSA**). Cada uno se infectó con una alícuota de 2 ml conteniendo aproximadamente 7,000 L3 de *H. contortus*.

### **Obtención de L3 de *Haemonchus contortus***

A los NN días post infección, se recolectaron directamente las heces de los ovinos infectados con *H. contortus* por extracción rectal. Adicionalmente, se colocó un calzón a los individuos para coleccionar las heces evitando el contacto con el suelo. Las heces se pesaron y se cuantificó el número de huevos por gramo (hpg) semanalmente para conocer el progreso de la infección. Para obtener la fase infectiva (L3), la técnica de Beltrán (1984) modificada, empleando un recipiente de plástico con una capacidad aproximada de 20 L. El cual se llenó el 30% con trozos de hule espuma y el otro 70% se llenó con las heces recolectadas que por la técnica de McMaster resultaron positivas. Se homogenizó el contenido del recipiente y se humedeció con agua tibia hasta que las heces adquirieran una consistencia pastosa. El recipiente se tapó con tela de malla y se dejó en incubación por 11 días a 27°C, vigilando diariamente que las heces se mantuvieran húmedas. Para evaluar la presencia de L3, se procedió a agregar unas gotas de agua, deslizándolas sobre una de las paredes del recipiente de plástico; el cual se giró sobre su propio eje en

dos o tres ocasiones. El líquido se colectó en una caja de Petri para su observación al microscopio estereoscópico. Una vez confirmado que las larvas obtenidas han alcanzado el tercer estadio evolutivo del parásito, se procedió a realizar la técnica de Baermann para la concentración de las larvas de los cultivos.

### **Técnica de Baermann para la concentración de las larvas de los cultivos.**

Para la recolección de las L3 se utilizó la técnica descrita por Baermann y modificada por Liebano (2011), se pesaron 20-30 g de las heces incubadas y se prepararon fragmentos de gasa donde se colocó la muestra, formando un saco cerrado. Los paquetes fueron depositados sobre una malla metálica e introducidos en el aparato de Baermann, que consiste en un embudo situado en posición vertical sujeto por una barra, en él se colocó, en el extremo más estrecho, un tubo de goma cerrado mediante una pinza Mohr. Se cubrió la muestra con agua templada y se dejó durante 8 h, transcurrido ese tiempo, se abrió la pinza y se recogieron los primeros 10 ml de líquido en tubos de centrifuga. Los tubos se centrifugaron a 1500-2000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur, dejando únicamente 3 ml y se mezcló el sedimento con el líquido restante. Al obtener el sedimento conteniendo larvas de nemátodos gastrointestinales sedimentó también una gran cantidad de impurezas y materiales diversos contenidos en las heces. Para tal efecto se utilizó un procedimiento de separación

de los parásitos de las partículas en suspensión utilizando gradientes de densidad con sacarosa.

**Técnica de gradientes de densidad con sacarosa para la limpieza de L3 de *H. contortus***

Se empleó la técnica descrita por Liébano (2011). Inicialmente, el material resultante de la técnica del embudo de Baermann se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y se dejó reposar en el refrigerador a 4°C durante 1 h. A un tubo de ensayo de 15 cm se le ponen 8 ml de sacarosa al 40%, después se colocan encima 2 ml del sedimento conteniendo las larvas. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 min para que la mayor cantidad de contaminantes y residuos se sedimenten en el fondo del tubo. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se forma un anillo de color blanco en la superficie de la suspensión, que corresponde a las larvas limpias concentradas. Con la ayuda de una pipeta se recuperan las larvas transfiriéndolas a tubos de 10 ml para llevar a cabo tres lavados con agua destilada; con la finalidad de eliminar el exceso de sacarosa y evitar un desequilibrio osmótico y muerte de las larvas.



### **Obtención de *H. contortus* adulto**

Este experimento se realizó en la Universidad Nacional de Chapingo. Se infectaron 2 ovinos machos de 5 meses de edad con 10,000 L3 a cada uno. Se realizaron dos infecciones posteriores con 6,500 larvas en la semana 5 y 6. Los animales se sacrificaron a la semana 7 después de 24 h de ayuno y se obtuvo el abomaso e intestinos. Los órganos se diseccionaron y se recolectaron los adultos adheridos a las mucosas.

### **Obtención antígeno de L3y fase adulta de *H. contortus***

Las L3 (~200,000/tubo) y adultos recolectados (~2,000/tubo) se transfirieron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 1,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 µL solución de lisis (PBS, 1% Tritón, 0.5 mM PMSF). Los tubos se congelaron con nitrógeno líquido y los parásitos se maceraron con la ayuda del émbolo de una jeringa. La muestra descongelada se colocó en un homogeneizador de tejidos con capacidad de 1 ml y se trituró durante 10 minutos. Se verificó que la muestra estuviera homogenizada por la observación en microscopio de L3 y adultos fragmentados. Por último, las muestras se centrifugaron en tubos de centrifuga a 12,000 rpm, se recolectó el sobrenadante donde se encuentra el antígeno y se desechó la pastilla.

### **Cuantificación de antígeno de L3 y adulto por la técnica de Bradford**

Se realizó una curva estándar de cuantificación con albumina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0 a 5 µg/µl en agua destilada, se colocaron 10 µl de cada dilución en dos pozos de una placa y se colocaron 10 µl de cada antígeno en otros dos pozos de la placa. Se diluyó 1 ml de colorante Bio-protein assay (BioRad, No. de catálogo 5000006) en 4 ml de agua destilada en un tubo protegido de la luz y se colocó 190 µL de la solución en cada pozo con las muestras y las diluciones del BSA, se esperó por 5 min y se leyó la placa a 590 nm en un lector de ELISA.

### **Inmunización de conejos con el antígeno obtenido de L3 de *H. contortus***

Se realizaron 4 inmunizaciones a 2 conejos de aproximadamente 4 kilos, libres de patógenos específicos (SPF), con 500 ug/inmunización de antígeno de L3 en solución de lisis en un volumen de 1.5 ml (1ug/ul) conteniendo 50% de adyuvante de Freund (la 1ª inmunización, adyuvante completo y las siguientes incompleto) de acuerdo al siguiente calendario:

**Cuadro 2. Calendario de inmunización de conejos SPF con Ag de L3 para producción de suero hiperinmune contra *H. contortus*. Se indica la fecha de inmunización con L3 y sacrificio.**

<b>Calendario inmunización</b>		
Día	Semana	Actividad
0	0	Inmunización
14	2	Inmunización
28	4	Inmunización
35	5	Inmunización
42	6	Sangrado a blanco

**Titulación del antígeno de la fase L3, fase adulta de *H. contortus* y del suero hiperinmune de conejo contra L3 de *H. contortus* mediante ELISA indirecta**

Para la titulación del antígeno L3 y adulto de *H. contortus* se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc) con los antígenos usando diluciones dobles seriadas hasta 1:640 a partir de 5 µg de antígeno en buffer de carbonatos 1X (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6), colocando 100 µL por pozo incubando a 4°C toda la noche. Posteriormente, se lavó la placa (300µl/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X NaCl 0.125 M, Tris-HCl pH 7.9 25 mM, Tween- 20 0.1%). Enseguida se incubó por 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100 µL de buffer de bloqueo (leche descremada 2% en buffer de lavado 1X). Después la placa se lavó (300µl/pozo) por 5 minutos, en 4 ocasiones. El suero de conejo contra *H. contortus*

se diluyó en buffer de bloqueo (1:100), se colocaron 100 µL/pozo y se incubó la placa por 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente con buffer de lavado 4 veces y se incubó con el 2° Ac (anti-IgG de conejo) acoplado a peroxidasa (HP) diluido en buffer de bloqueo (1:1500) 1 h a 37 °C. Se lavó nuevamente la placa con buffer de lavado en 4 ocasiones y se colocaron 100 µl/pozo de solución reveladora. La solución reveladora se prepara mezclando 5 ml del ácido cítrico 0.1M pH 4.5 y 5 ml de citrato de sodio 0.1M pH 4.5 , agregando 200µl con 5 µg de orto-fenilen-diamina (OPD), 20 µL de peróxido de hidrogeno al 30%). Se incubó 5 minutos y se detuvo la reacción con 50 µL a cada pozo de solución de frenado (ácido sulfúrico 2N). Se leyó a 590 nm en un espectrofotómetro. La calidad del revelado se evaluó con la prueba de máxima densidad óptica (MDO), colocando 100 µL de la solución reveladora en 8 pozos de la placa por duplicado. Se agregan 100 µL de la solución de segundo anticuerpo a una dilución de 1:1500 realizando diluciones dobles seriadas.

Para la titulación del suero hiperinmune de conejo contra L3 de *H. contortus* se siguió el protocolo anterior con las siguientes diferencias:

-Se sensibilizó una placa de 96 pozos (Maxisorb, Nunc) con 2.5 µg de antígeno de L3 y adulto de *H. contortus* a probar a una dilución del suero hiperinmune de 1:10

y 1:100., el suero de conejo contra *H. contortus* se diluyó en buffer de bloqueo (1:10 y 1:100).

Como control negativo se evaluaron las mismas diluciones de un suero de conejo específico contra *Pasteurella multocida*. Se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) acoplado a peroxidasa (HP) diluido en buffer de bloqueo (1:1500).

### **Caracterización del antígeno de la fase L3 y adulto mediante electroforesis y Western-Blot**

Se preparó un gel de acrilamida al 12% y colocando por duplicado por carril 30 µg del antígeno de L3, 30ug antígeno del adulto de *H. contortus*, marcador de peso molecular de proteínas y un control negativo de BSA. Estos fueron previamente desnaturalizados a 94°C por 15 min en buffer de proteínas 1x. El gel se sometió a electroforesis a 80 V durante 45 min. Una vez corrido el gel una mitad se tiñó en solución de coomasie durante 12 h para después desteñirla en agua caliente y comparar el gel con el resultado del western blot.

Para el western blot, los fueron humedecidos con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %, pH 8.3) y se colocaron en el dispositivo de inmunotransferencia, colocando sobre el gel una membrana de PDVF y se cubrió

con papel filtro humedecido con buffer de transferencia. La transferencia se llevó a cabo a 80 V y 200mA durante 1 h. Terminada la transferencia, se tomó la membrana de PVDF y se bloqueó, con 30 ml de buffer de bloqueo (buffer de lavado 1X, leche descremada al 5%.) y se incubó por 30 minutos en agitación. Se lavó tres veces (5 minutos c/u) con buffer de Lavado 1X (1.25 M NaCl, 250 mM de Tris-HCl pH 7.9, Tween 20 1%) y dos veces (5 minutos c/u) con PBS 1X (Fosfato de sodio monobásico 0.1 M, fosfato de sodio dibásico anhidro, cloruro de sodio 0.15 M). Se agregó el suero de conejo a una dilución 1:200 en buffer de bloqueo y se incubó a 4°C por 18 h en agitación constante, posteriormente se lavó tres veces (5 minutos c/u) con buffer de lavado 1X y dos veces con PBS 1X. (5 minutos c/u). Se incubó el anti IgG de conejo acoplado a HP en una dilución 1:1500 en buffer de bloqueo 1x por 1 h a 37 °C y se lavó por tres periodos de 5 minutos con buffer de lavado 1X y 2 periodos de 5 minutos con PBS 1X para finalmente sumergir la membrana de PVDF en la solución reveladora (9 ml de agua destilada, 1 ml de Opti 4CN, 0.2 ml de sustrato (los reactivos y el sustrato, son parte del kit de BIORAD® Opti 4 CN No. de catálogo: 170-8235) a temperatura ambiente y agitación constante por 5 minutos. Se retiró la membrana de la solución reveladora, se enjuagó con agua abundante y se dejó secar la membrana por 10 minutos (Sambrook, 2001).

### **Purificación, cuantificación y caracterización de IgG de sueros inmunes vs L3**

Se purificaron las IgG del suero de dos conejos inmunizados con el antígeno L3 empleando columnas HiTrap Protein G HP de 1 ml en un equipo de cromatografía de baja presión (Akta prime, pharmacia). La columna se conectó al sistema de cromatografía y se lavó con 10 volúmenes de buffer de unión (Fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0) a 1 ml por minuto. Se cargo una jeringa con 1 ml del buffer de unión y 1 ml del suero de conejo, se conectó al sistema de cromatografía, se aplicó todo el volumen en la columna y se lavó con 5 volúmenes de buffer de lavado y la IgG se eluyeron aplicando la solución de elución (glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7). Las fracciones de IgG purificadas se colectaron en tubos de 2 ml conteniendo 200  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M, pH 9.0 por ml de la fracción de IgG a recolectar. Las fracciones se evaluaron en un gel de acrilamida y se cuantifico por Bradford. Se recolectaron todas las fracciones purificadas de los sueros y se concentraron en filtros amicon centrifugándolo 15 minutos a 3,500 rpm y se cuantificó nuevamente por la técnica de Bradford. Las IgG purificadas se ajustaron a 30  $\mu$ g/ $\mu$ l y se evaluaron mediante ELISA.

## **Titulación de las IgG de suero hiperinmune de conejo contra antígeno L3 de *H. contortus* mediante ELISA indirecta**

Se empleo el protocolo de ELISA indirecta previamente descrito evaluando diferentes concentraciones de IgG desde 60 ug hasta 30ng, Las placas fueron sensibilizadas con antígeno de la fase L3 y fase adulta de *H. contortus*.

## **Selección y amplificación de epítomos dominantes por afinidad de *H. contortus***

Se utilizó el método de phage display que permite la selección de péptidos (mimótopos) afines a los anticuerpos contra *H. contortus* fase L3. Se seleccionaron 20 clonas de una biblioteca de 7 péptidos flanqueada por residuos de cisteína y de una biblioteca de 12 péptidos.

## **Tamizaje de clonas**

Se sensibilizó una placa maxisorb con IgG del suero hiperinmune de conejo colocando 20 µg/pozo (para el primer ciclo de selección), 10 µg/pozo (para el 2° ciclo de selección) y 5 µg/pozo (para el 3° ciclo de selección) en un volumen de 100 µl (en PBS). Se incubó toda la noche en agitación (5 rpm) a 4°C en una cámara húmeda. Se recuperó la solución de IgG y se almacenó a -20°C., Cada pozo se lavó con 200 µl de PBS-Tween al 0.1% por dos minutos, se repitió el lavado 5 veces.



Posteriormente, se bloqueó con 300  $\mu$ l de PBS-BSA al 1% durante una hora, posteriormente se hicieron 5 lavados.

Se prepararon las 2 bibliotecas: 190  $\mu$ l de PBS-Tween al 0.1% + 10  $\mu$ l de la biblioteca, se colocaron 100  $\mu$ l en cada pozo y se incubó la placa una hora a temperatura ambiente en agitación a 40 rpm. Enseguida los pozos se lavaron en 10 ocasiones con PBS-T. Los fagos fueron eluidos empleando 100  $\mu$ l de buffer de elución (glicina 0.2M, BSA 1mg/ml, pH 2.2), se retiró del pozo la elución y se neutralizó agregando 20  $\mu$ l de Tris 1M pH 9.0. En 20 ml de medio 2xYT + 400  $\mu$ l de células ER2738 (O/N), se agregó 80% del eluido y se incubó por 4.5 horas a 37°C en agitación a 220 rpm. Después, se centrifugaron las células a 10,000 rpm por 5 min. Al sobrenadante se agregó 5ml de PEG 20%-NaCl 2.5 M y se incubó en agitación a 4°C O/N. La solución se colocó en tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se suspendió la pastilla con 100  $\mu$ l PBS de PBS-T al 0.1% por tubo.

Se colectó el precipitado suspendido de todos los tubos en uno solo de 1.5 ml, se efectuó una reprecipitación 250  $\mu$ l de PEG-NaCl, se incubó una hora en hielo. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 200  $\mu$ l de PBS.

Titulación de fagos recuperados

Se realizaron 3 diluciones 1:1000 seriadas, colocando 1 µl del eluido amplificado en 999 µl de medio LB y se transfirió 1 µl a las siguientes dos diluciones, quedando las diluciones  $10^3$ ,  $10^6$  y  $10^9$ .

Se titularon las placas de LB-Xgal-IPTG, utilizando:

- 10 µl de cada dilución + 200 µl de bacterias ER2738
- 1 µl de cada dilución + 200 µl de bacterias ER2738.

Se dejaron incubando 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 3 ml de top agar por dilución y se vertieron sobre las placas. Se dejaron gelificar y posteriormente se incubaron a 37°C O/N, posteriormente se contaron placas y se obtuvo el título del eluido y del amplificado (Barbas III, 2001).

Para seleccionar las clonas mas afines a las IgG se repitió el proceso de tamizaje tres veces mas, disminuyendo la cantidad de IgG por pozo a 10 µg/pozo de IgG en el segundo tamizaje y a 2.5 µg/pozo en el tercer tamizaje y se utilizó PBS-T 0.5% en lugar de PBS-T 0.1% para los lavados.

### **Selección de clonas individuales.**

En un matraz de 250 ml estéril, se diluyeron las células 1/1000 colocando 100 ml de medio 2xYT con 100 µl de células ER2738, crecidas O/N. Se colocó cada clona seleccionada (ufp azul) del eluido de la tercer ronda que se tituló en una placa LB-Xgal-IPTG, En tubos de 15 ml que contienen 3 ml del medio 2xYT con las células

diluidas 1:1000 ER2738. Se incubaron en agitación a 230 rpm a 37°C por 4.5 horas. De cada tubo se destinaron 2 ml para recuperación de fago y 1 ml para obtención de DNA (Barbas III, 2001; Sambrook, 2001).

### **Obtención de fago**

Se centrifugaron 2 ml de la suspensión de cada clona a 11,000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo con ¼ de PEG-NaCl, se agitó en vórtex y se incubó toda la noche a 4°C. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se centrifugó nuevamente el tubo a 11,000 rpm por 2 min para eliminar el resto del sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 200 µl de PBS y se centrifugó a 11,000 rpm por 2 min, se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo, se precipitaron los 200 µl con ¼ de PEG-NaCl y se incubaron en hielo en refrigeración por una hora. Se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se centrifugó a 11,000 rpm por 2 min para eliminar el resto del sobrenadante. La pastilla se suspendió en 100 µl de PBS, se centrifugó a 11,000 rpm por 2 min y se recolectó el sobrenadante. Se realizaron 3 diluciones colocando 1 µl del fago en 999 µl de medio LB. Transferir 1 µl a las siguientes dos diluciones. Tendremos las diluciones 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>9</sup>. Se tituló con 10 µl de la tercer dilución en LB-Xgal-IPTG (Barbas III, 2001).

### **Purificación de ADN**

Se centrifugó 1 ml del amplificado de la UFP previamente preparada, se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se precipitó con 250  $\mu$ l PEG-NaCl y se incubó 20 min a -20°C. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se centrifugó a 11,000 rpm por 2 min para eliminar el resto del sobrenadante. Se suspendió la pastilla con 100  $\mu$ l de NaI 4 M, con pipeta, se precipitó con 250  $\mu$ l de etanol absoluto frío y se incubó 10 min. A -20°C. Se centrifugó el tubo a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 400  $\mu$ l de etanol 70% frío, mezclando por inversión. Se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante. Se secó al vacío en speedvac, por 15 min y se suspendió la pastilla en 25  $\mu$ l de agua inyectable. Se verificó integridad del DNA en un gel de agarosa al 1%(Sambrook, 2001).

### **Caracterización de epítomos por secuenciación de ADN**

Se utilizó el primer correspondiente a la proteína III del fago M13: 5'-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG -3', (1 pmol/μl) Al terminar la reacción de secuenciación fue necesario eliminar los restos de reactivos para que no interfieran en la posterior lectura. Para ello las muestras se pasaron por columnas con sephadex G50 previamente equilibradas, se centrifugaron durante 4 min a 2700 rpm y, a continuación, fueron secadas en una centrifuga aproximadamente por 40 min a temperatura y velocidad máxima (Barbas III, 2001; Sambrook, 2001). Finalmente, las muestras se resguardaron de la luz y fueron procesadas en un secuenciador automático en el laboratorio b del departamento de inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por la M. en C. Patricia de la Torre.

### **Análisis de secuencias**

Todas las secuencias fueron analizadas con el programa Clone manager 9.2 usando como referencia de búsqueda la secuencia de la proteína III de M13. Una vez la secuencia era conocida se utilizó la herramienta básica para búsqueda de alineamientos locales (BLAST por sus siglas en inglés) del Centro nacional de información sobre biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés) para conocer que porción de las proteínas de *Haemonchus contortus* podían alinearse con las secuencias de aminoácidos expresadas por las clonas seleccionada del tercer

tamizaje de las bibliotecas de péptidos. Por último, se utilizaron los servidores BCEpred (Saha, 2004) y ABCpred (Saha, 200+) para buscar epítomos inmunodominantes de las proteínas encontradas por BLAST y buscar coincidencias con las secuencias de aminoácidos expresadas por las clonas seleccionadas del tercer tamizaje.

### **Caracterización de las clonas seleccionadas del 3° tamizaje mediante ELISA indirecto**

Se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc) con  $1 \times 10^9$  de cada clona a evaluar en buffer de carbonatos 1X (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6), colocando 100  $\mu$ L de ésta dilución por pozo y se dejó incubando a 4°C toda la noche. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa (300 $\mu$ l/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X. Se bloqueó la placa por 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100  $\mu$ L de buffer de bloqueo (cloruro de sodio 0.125 M, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween- 20 0.1%). Se lavó la placa (300 $\mu$ l/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X (leche descremada 2%, en Buffer de lavado 1X) y se diluyó el suero de conejo contra *H. contortus* en buffer de bloqueo (1:100), se colocaron 100  $\mu$ L/pozo y se incubó la placa por 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente la placa y se incubó con el 2° anticuerpo (anti-IgG de conejo) acoplado a peroxidasa (HP) diluido en buffer de bloqueo (1:1500) 1 h a 37 °C. Se lavó nuevamente la placa y se

colocaron 100  $\mu$ l/pozo de solución reveladora (Preparar ácido cítrico 0.1 M pH 4.5 y citrato de sodio 0.1 M pH 4.5. Por placa se mezclan 5 ml del ácido cítrico 0.1M y 5 ml de citrato de sodio 0.1M, se agregan 200 $\mu$ l de una solución de 5  $\mu$ g de orto-fenilen-diamina (OPD), 20  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno al 30%) Se esperó aprox. 5 minutos y se paró la reacción con 50  $\mu$ L a cada pozo de solución de frenado (ácido sulfúrico 2N). Se leyó a 590 nm en un espectrofotómetro.

### **Selección de clonas candidatas**

Se seleccionaron clonas candidatas con base a su reactividad en los ensayos de ELISA y la frecuencia de repetición de la secuencia de aminoácidos.

### **Inmunización de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) con clonas candidatas**

Se inmunizaron 2 conejos de 2 meses y un peso aproximado de 1.5 Kg por grupo (En total 10 conejos) con las clonas obtenidas mediante Ph.D. que expresaban las secuencias de aminoácidos más reactivas. Se inoculó a cada conejo vía subcutánea en 2 zonas diferentes, las primeras 3 inmunizaciones con  $10^9$  fagos en y las últimas 4 con  $10^{11}$  fagos. Todos los fagos se suspendieron en 250  $\mu$ L de PBS + 250  $\mu$ g del adyuvante Montanide ISA50. Se realizaron 7 inoculaciones el día 0, 14, 28, 35, 42, 56 y 70 los conejos se sangraron los mismos días señalados, el sangrado a blanco fue al día 77. (Frenkel 2000, Rhie 2005)

**Cuadro 3. Número de identificación y secuencia de cada clona con la que se inmunizará a cada grupo de conejos.**

Grupo	Clona Ph.D. 12	Secuencia
1	8	TFPMTYQSLSNR
2	13	LFAYWWNGVRGP
3	7	EPNNGDGSWRWL
4	C-	M13

Grupo	Clona Ph.D. C7C	Secuencia
5	14	CTNANHIFC

### **Evaluación de la reactividad de las clonas candidatas mediante ELISA**

#### **indirecto**

Se sensibilizó una placa (Maxisorb, Nunc) con  $1 \times 10^9$  fagos por pozo por cada clona candidata, en 100  $\mu$ l de buffer de carbonatos 1X, y se dejó incubando a 4°C toda la noche. Pasado el tiempo de incubación se lavó la placa (300 $\mu$ l/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X. Se bloqueó la placa por 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100  $\mu$ L de buffer de bloqueo. Se lavó la placa (300 $\mu$ l/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X (BSA 2%, Tritón X100 0.2% en Buffer de lavado 1X) y se diluyó de forma doble seriado el suero de conejo contra cada clona candidata en buffer de bloqueo 1:10 y 1:100, se colocaron 100  $\mu$ L/ pozo y se incubó la placa por 1 hora a 37°C. Se lavó nuevamente la placa y se incubó con el 2° anticuerpo (anti-IgG de conejo) acoplado a peroxidasa (HP) diluido en buffer de



bloqueo (1:1700) y se incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó nuevamente la placa y se colocaron 100 µl/pozo de solución reveladora, se esperó aproximadamente 5 minutos e inmediatamente se paró la reacción con 50 µl a cada pozo de solución de frenado (ácido sulfúrico 2N) y se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro. La calidad del revelado se evaluó con la prueba de máxima densidad óptica (MDO), colocando 100 µL de la solución reveladora en las 8 filas de la placa por duplicado. Se agregaron 100 µL de la solución del segundo anticuerpo a una dilución de 1:1500 realizando diluciones dobles seriadas .

#### **Caracterización del suero anti clonas candidatas contra el antígeno de L3 y adulto de *H. contortus* mediante Western-Blot**

Se preparó un gel de acrilamida al 12% y se colocaron en cada pozo por repetido 30 µg del antígeno de L3 y adulto de *H. contortus* previamente desnaturalizados a 94°C por 15 min en buffer de proteínas 1x. En otros pozos se depositó el marcador de peso molecular de proteínas y un control negativo de BSA. Se corrió el gel en electroforesis a 80 V durante 45 min. Mientras tanto, se activó la membrana PVDF sumergiéndola 1 minuto en metanol absoluto. Posteriormente se hidrató en agua destilada hasta ser utilizada. Una vez corrido el gel se cortó para teñir el antígeno repetido de L3 y adulto de *H. contortus* en solución de coomasie durante 12 h para después desteñirla en agua caliente y comparar el gel con el resultado del western

blot. Se humedecieron los filtros con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 %, pH 8.3) y se colocaron en el dispositivo de inmunotransferencia, encima se colocó el gel sobre la membrana y se cubrió con más filtros humedecidos con buffer de transferencia, se retiraron las burbujas aplanándolos y se corrieron a 80 V y 200mA durante 1 h. Se tomó la membrana de PVDF del dispositivo de inmunotransferencia y se bloqueó, colocándola en un recipiente con 30 a 50 ml de Buffer de Bloqueo (buffer de lavado 1X, leche descremada al 5%.) y se incubó por 30 minutos en agitación. Se lavó por tres periodos de 5 minutos con Buffer de lavado 1X (1.25 M NaCl, 250 mM de Tris-HCl pH 7.9, Tween 20 1%) y 2 periodos de 5 minutos con PBS 1X (Fosfato de sodio monobásico 0.1 M, fosfato de sodio bibásico anhidro, cloruro de sodio 0.15 M.) Se retiró el exceso de buffer y se agregó el suero de conejo a una dilución 1:75. Se incubó a 4°C por 18 h en agitación constante y se lavó por tres periodos de 5 minutos con Buffer de lavado 1X y 2 periodos de 5 minutos con PBS 1X. Se Incubó el anti IgG de conejo acoplado a HP en una dilución 1:1700 en buffer de bloqueo 1x por 1 h a 37 °C y se lavó por tres periodos de 5 minutos con Buffer de lavado 1X y 2 periodos de 5 minutos con PBS 1X. Se dejó la membrana de PVDF en la solución reveladora (9 ml de agua destilada, 1 ml de Opti 4CN, 0.2 ml de sustrato (los reactivos Opti 4CN y el sustrato, son parte del kit de BIORAD® almacenado a 4°C) a temperatura ambiente y agitación constante por 5 minutos.

Se retiró la membrana de la solución reveladora, se enjuagó con agua abundante y se dejó secar la membrana por 10 minutos (Sambrook, 2001).

### **Analisis estadístico**

Se utilizó el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 20 para el análisis de los datos obtenidos. A todos los resultados obtenidos por los ensayos de ELISA se les obtuvo media y desviación estándar, y se les aplicó la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas para verificar si los resultados fueron aptos para realizar un análisis de varianza (ANOVA), en caso contrario se aplicaron pruebas no paramétricas.

### **Resultados**

#### **1º Infección, cultivo de larva 3**

Los hpg aumentaron considerablemente cada semana hasta alcanzar 7,250 huevos por gramo en la primera infección y 750 hpg en la segunda infección a la semana 7.

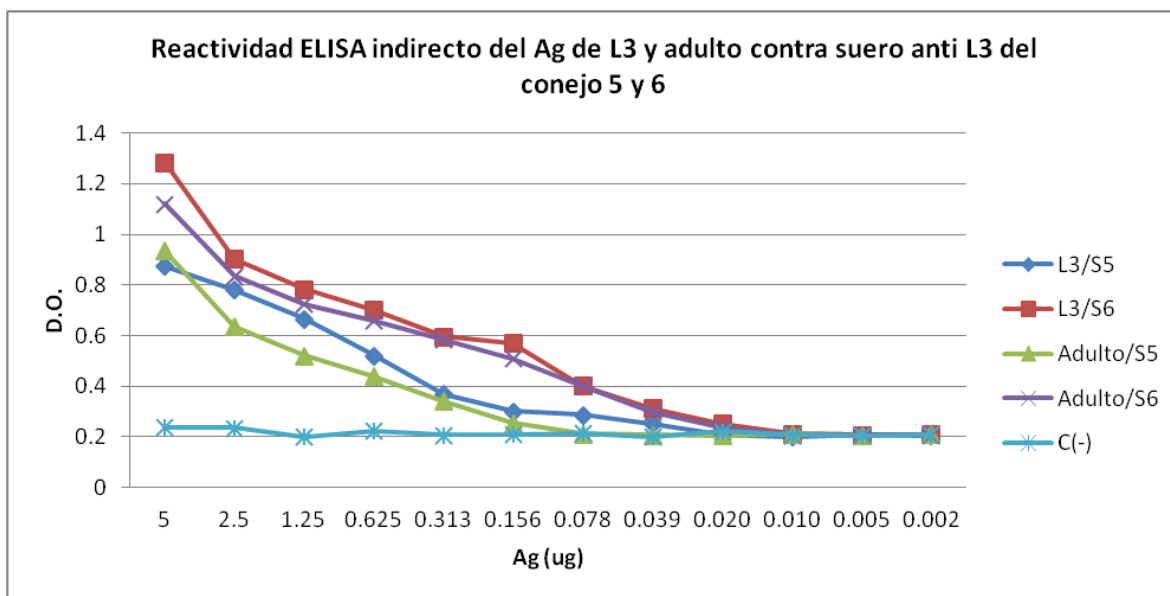
### **Cuantificación de antígeno L3 y adulto por la técnica de Bradford**

El coeficiente de regresión para la curva estándar de BSA es de 0.9947 indicando que existe una alta asociación positiva entre la densidad óptica observada y la concentración de proteína. La cantidad de proteína recolectada para L3 fue de 4.9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y para la fase adulta 15.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Por lo tanto, se podrá deducir la cantidad de proteína presente en las muestras de L3 y *H. contortus*.

### **Titulación del antígeno de la fase adulto y L3 de *H. contortus* mediante**

#### **ELISA indirecta**

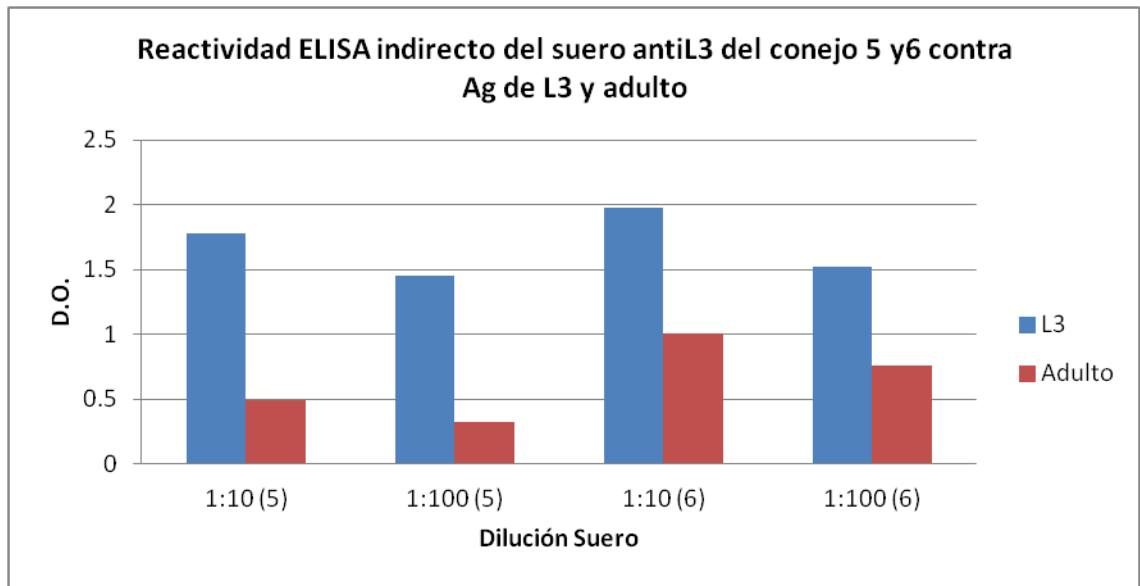
Los dos antígenos fueron reactivos contra los sueros de conejo contra *H. contortus*, siendo más reactivo el suero 6 ( $p < 0.05$ ). También se observa que el antígeno de L3 reacciona más que el de adulto (Figura 4).



**Figura 4. Reactividad por ELISA indirecto del Ag de L3 y adulto contra suero anti L3 de conejo.** Se observa la densidad óptica (Eje Y) de diluciones dobles seriadas del antígeno de adulto y L3 a partir de 5 µg (Eje X) contra los sueros hiperinmunes contra *H. contortus* del conejo 5 y conejo 6

**Titulación del suero hiperinmune de conejo contra adulto y L3 de *H. contortus* mediante ELISA indirecta**

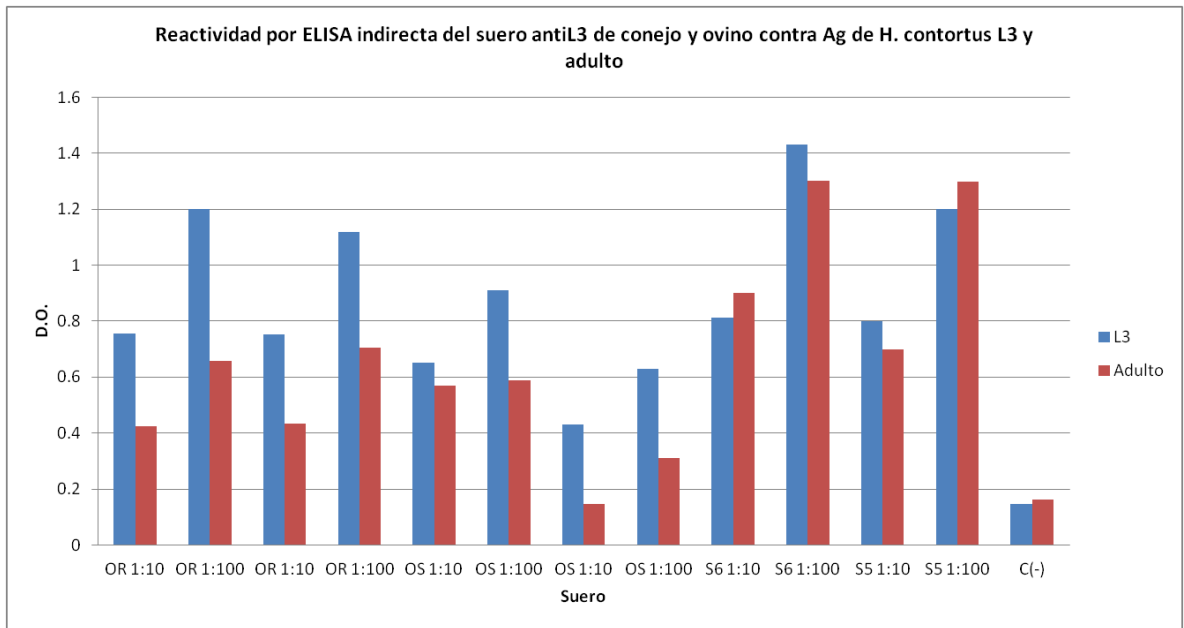
Los dos sueros fueron reactivos contra el antígeno de adulto y L3 de *H. contortus*, siendo más reactivo el suero 6 ( $p < 0.05$ ). También se observa que el antígeno de L3 reacciona más ( $p < 0.05$ ) que el de adulto (Figura 5).



**Figura 5. Reactividad por ELISA indirecta del suero antiL3 contra Ag de L3 y adulto.** Se observa la densidad óptica (Eje Y) de diluciones 1:10 Y 1:100 del suero hiperinmune de conejo contra *H. contortus* 1:10 y 1:100 (Eje X) contra el Ag de L3 y adulto *H. contortus* del conejo 5 y conejo 6

**Titulación del suero hiperinmune de conejo y ovino contra adulto y L3 de *H. contortus* mediante ELISA indirecta**

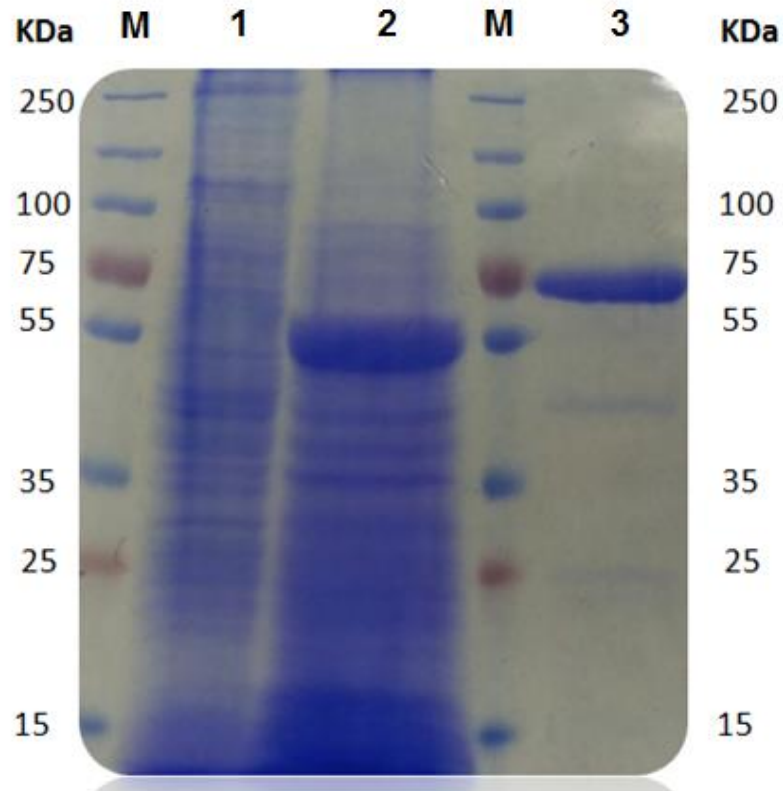
Todos los sueros fueron reactivos contra el antígeno de adulto y L3 de *H. contortus*, siendo más reactivo los sueros de conejo que los de ovino ( $p < 0.05$ ). También se puede apreciar que el suero de ovino resistente es más reactivo ( $p < 0.05$ ) que el de ovino susceptible (Figura 6).



**Figura 6. Reactividad por ELISA indirecta del suero antiL3 del conejo y ovino contra Ag de L3 y adulto.** Se observa la densidad óptica (Eje Y) de diluciones 1:10 Y 1:100 del suero hiperinmune de conejo contra *H. contortus* 1:10 y 1:100 (Eje X) contra el Ag de L3 y adulto *H. contortus* del conejo 5 (S5), conejo 6 (S6), 2 ovinos resistentes (OR) Y 2 ovinos susceptibles (OS)

### Caracterización del antígeno de la fase L3 y adulto mediante Western-blot

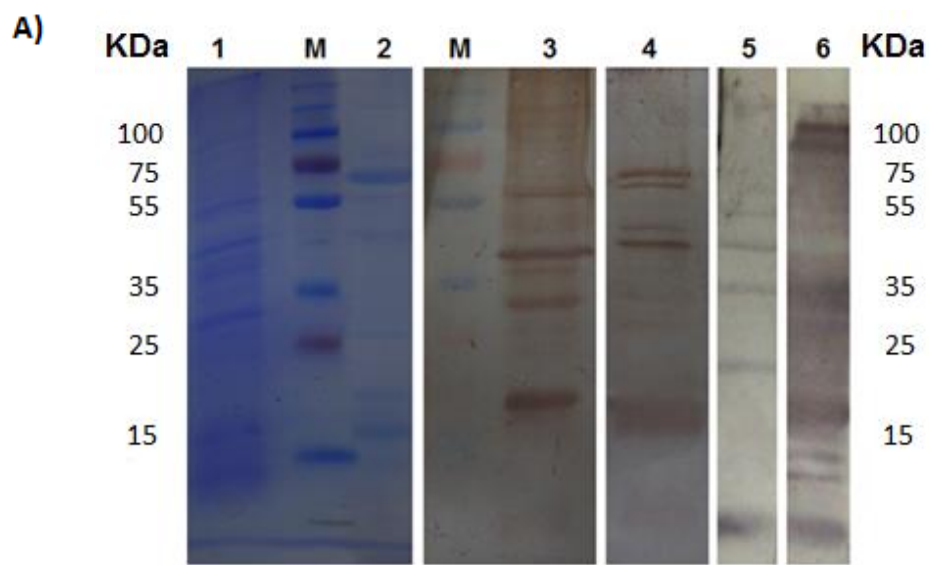
El suero detectó diferentes antígenos entre la fase adulta y la fase L3 de *H. contortus*; Sin embargo, aparentan tener proteínas en común (Figura 7).



**Figura 7. Gel de acrilamida al 12% con proteína de L3 y adulto de *H. contortus*.** (1) 50 µg de BSA, (2) Ag L3 30 µg, (3) Ag Adulto 30 µg

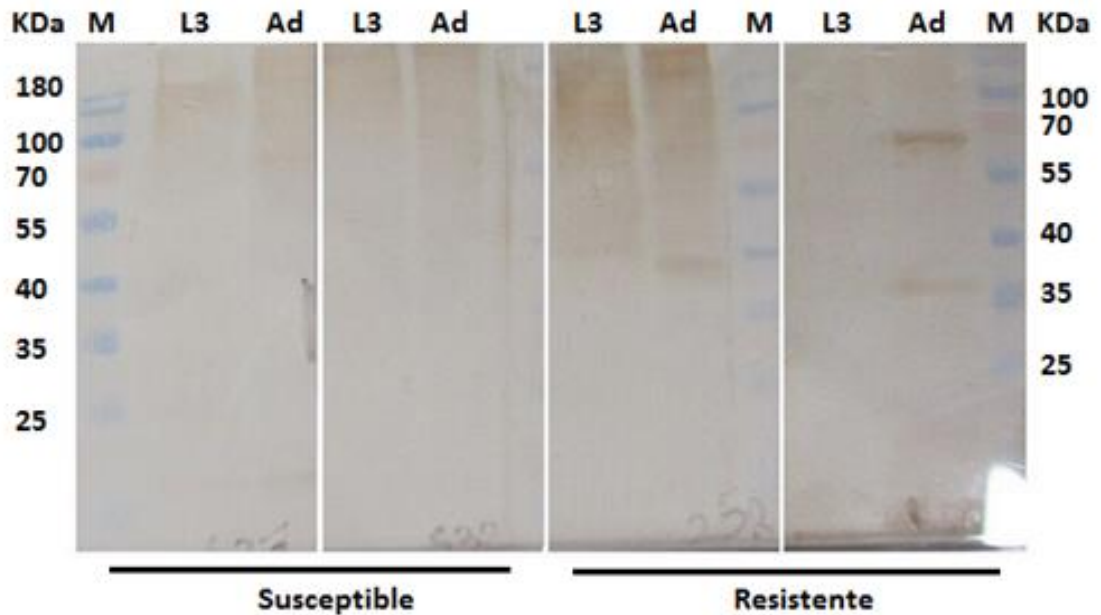
En el western blot fue posible identificar proteínas de diferente peso molecular en cada una de las muestras, además se observó que cada individuo detecta antígenos diferentes tanto en L3 como en adulto de *H. contortus* (Figura 8)





**Figura 8. Reactividad de sueros anti-L3 de *H. contortus* de conejo vs proteínas de L3 y *H. contortus* adulto.** Ag de L3 y adulto se separaron en geles PAGE-SDS al 12%. **A)** Se muestra (1) PAGE-SDS 12% con 30 µg de Ag de L3, (2) PAGE-SDS 12% con 30 µg de Ag de adulto, (3) Suero hiperinmune del conejo 5 (1:100) contra 30 µg de Ag de L3, (4) Suero hiperinmune del conejo 6 (1:100) contra 30 µg de Ag de L3, **(5)** Suero hiperinmune del conejo 5 (1:100) contra 30 µg de Ag de Adulto, (6) Suero hiperinmune del conejo 6 (1:100) contra 30 µg de Ag de Adulto.

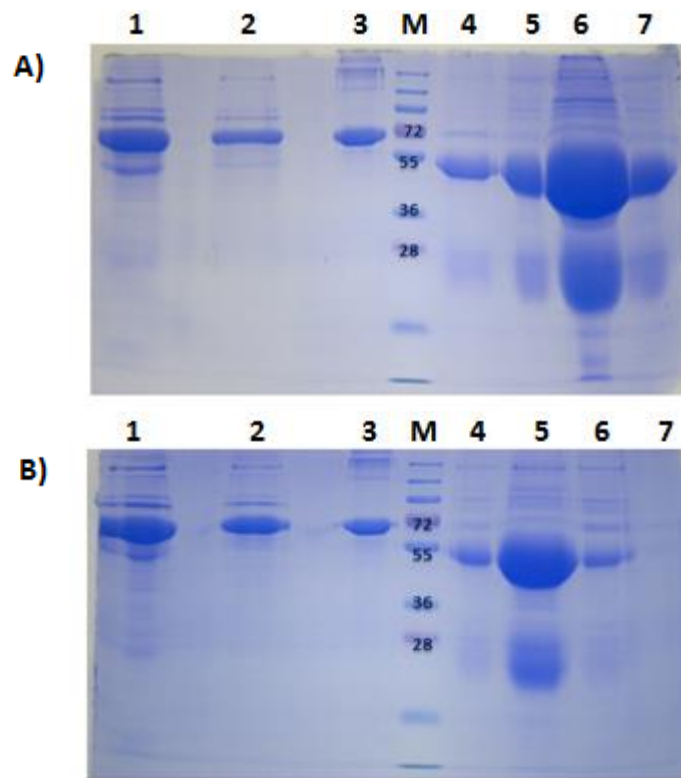
En la figura 9 se muestran los resultados del western blot para antígenos de *H. contortus*. Todos los sueros de ovino tienen reactividad contra el Ag de L3 y Ag de adulto de *H. contortus*. Además se observó que los corderos resistentes tuvieron mayor reactividad a estos Ag que los corderos susceptibles.



**Figura 9. Reactividad de anti-sueros L3 de ovino resistente y susceptible a *H. contortus* vs proteínas de L3 y parásito adulto.** Se muestra suero de ovino resistente y susceptible a *H. contortus* (1:50) contra 30 µg de Ag de L3 y adulto. Revelado con DAB.

### **Purificación y caracterización de IgG**

Se observó en las fracciones colectadas de los pozos 4 a 7 la IgG recolectada, identificándola por los pesos moleculares de sus 2 cadenas pesadas (50KDa c/u) y ligeras (25 KDa c/u) dando en total el peso de 150 Kda (Figura 10).

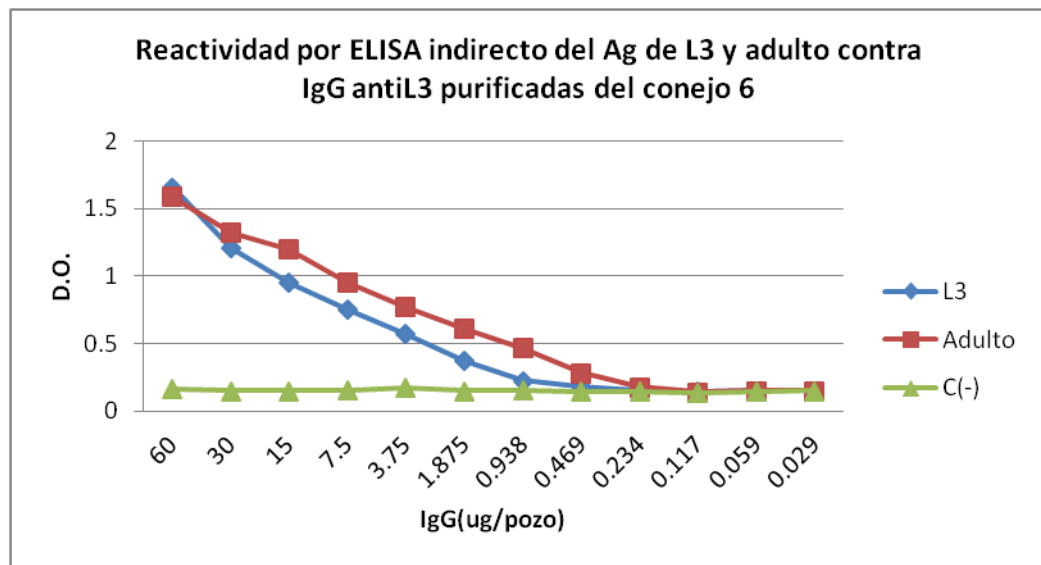


**Figura 10. Gel de acrilamida al 12 % con IgG purificadas del suero hiperinmune del conejo 5 y 6 (1) suero del conejo (2) lavado de columna (3) control BSA (M) Marcador de peso molecular fracción 1 de IgG recolectada (4), (5), (6) y (7). Fracciones de IgG recolectada.**

El coeficiente de regresión para la curva estándar de BSA es de 0.9528 indicando que existe una alta asociación positiva entre la densidad óptica observada y la concentración de IgG. La cantidad de IgG recolectada para L3 fue de 3.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y para la fase adulta 4.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Posteriormente, se concentraron en filtros amicon quedando en 65.63  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para la fase L3 y para la fase adulta 68.04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## Titulación de IgG de conejo específicas contra L3 y adulto de *H. contortus* mediante ELISA indirecta

Se observó que las IgG purificadas son reactivas a ambos antígenos (Figura 11). Además el antígeno de la fase L3 reacciona de manera similar al adulto ( $p > 0.05$ ).



**Figura 11. Reactividad por ELISA indirecto del Ag de L3 y adulto contra IgG antiL3 purificadas del conejo 6.** Se observa la densidad óptica (Eje Y) de diluciones dobles seriadas a partir de 60  $\mu\text{g}$  de IgG de conejo contra *H. contortus* (Eje X) contra el Ag de L3 y adulto *H. contortus* del conejo 6

## Phage display

El título de fagos aumentó en cada ronda de selección (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Título de fagos observados durante cada ronda, sin amplificar y amplificados

	Ph.D. C7C		Ph.D. 12	
	Eluido	Eluido amplificado	Eluido	Eluido amplificado
1ª Ronda (ufp/ml)	$1.07 \times 10^5$	$1.79 \times 10^{14}$	$2.14 \times 10^5$	$2.88 \times 10^{11}$
2ª Ronda (ufp/ml)	$1.5 \times 10^6$	$1.73 \times 10^{13}$	$5 \times 10^5$	$1.31 \times 10^{13}$
3ª Ronda (ufp/ml)	$2 \times 10^6$	$1.95 \times 10^{13}$	$3.6 \times 10^5$	$1.19 \times 10^{13}$
4ª Ronda (ufp/ml)	$2 \times 10^6$	....	$3.8 \times 10^5$	....

En el cuadro 5 y 6 se muestra el título de cada clona amplificada obtenida de la tercera ronda de tamizaje para cada biblioteca Ph.D.

**Cuadro 5.** Título obtenido de la amplificación de cada clona seleccionada durante el tercer tamizaje de la biblioteca Ph.D. C7C

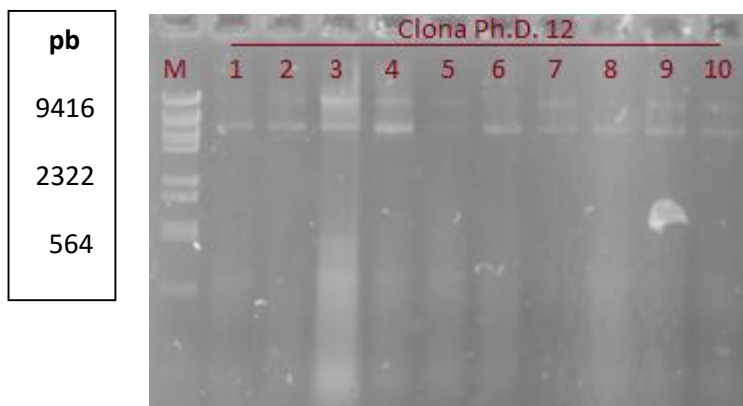
Clona	Título (ufp/ml)	Clona	Título (ufp/ml)
1	$1.3 \times 10^{12}$	11	$1.99 \times 10^{11}$
2	$2.2 \times 10^{12}$	12	$2.51 \times 10^{10}$
3	$3.4 \times 10^{12}$	13	$2.3 \times 10^{11}$
4	$1.1 \times 10^{11}$	14	$3.62 \times 10^{10}$
5	$6.77 \times 10^{12}$	16	$2.72 \times 10^{11}$
6	$2.52 \times 10^{13}$	16	$3.21 \times 10^{12}$
7	$1.45 \times 10^{13}$	17	$4.87 \times 10^{10}$
8	$5.6 \times 10^{13}$	18	$2.18 \times 10^{12}$
9	$2 \times 10^{13}$	19	$3 \times 10^{11}$
10	$3.3 \times 10^{12}$	20	$4.32 \times 10^{11}$

**Cuadro 6. Título obtenido de la amplificación de cada clona seleccionada durante el tercer tamizaje de la biblioteca Ph.D. 12**

Clona	Título (ufp/ml)	Clona	Título (ufp/ml)
1	$1.2 \times 10^{11}$	11	$9.64 \times 10^{10}$
2	$3 \times 10^{12}$	12	$1.38 \times 10^{11}$
3	$3.3 \times 10^{12}$	13	$9.44 \times 10^{10}$
4	$8.6 \times 10^{12}$	14	$1.86 \times 10^{11}$
5	$1.7 \times 10^{10}$	16	$7.6 \times 10^9$
6	$1 \times 10^{11}$	16	$2.31 \times 10^{12}$
7	$1.9 \times 10^{12}$	17	$8.26 \times 10^{10}$
8	$6 \times 10^{11}$	18	$2.21 \times 10^{11}$
9	$4 \times 10^{11}$	19	$7.56 \times 10^{10}$
10	$6 \times 10^{11}$	20	$2.35 \times 10^{12}$

### Purificación de ADN de las clonas seleccionadas

Se observaron dos bandas de alto peso molecular concordando con el peso de m13 (6,400 KDa).



**Figura 12. Gel de agarosa al 1% con ADN de las clonas del 1 al 10 de la biblioteca de 12 péptidos (M) Marcador molecular, (pb) pares de base.**

## Análisis de secuencias

Mediante Clone manager, se encontraron 12 motivos diferentes en las 20 clonas secuenciadas de la biblioteca Ph.D. C7C encontrado sólo 3 clonas repetidas en las secuencias (cuadro 7). En la biblioteca Ph.D. 12 encontraron 8 motivos diferentes en las 20 clonas secuenciadas y se observó 1 familia con motivos similares (cuadro 8). Se realizó un BLAST de proteínas para buscar regiones de similitud entre la secuencia expresada por la clona y *Haemonchus contortus* obteniendo coincidencias de hasta el 100% (cuadro 7 y 8).

Cuadro 7. Resultado del alineamiento de la secuencia expresada de las clonas de la biblioteca Ph.D. C7C contra *Haemonchus contortus*

Secuencia Ph.D. C7C	Proteína	Coincidencia	Acceso GenBank
CEGQRWMQC	Sulfotransferasa y Dedos de zinc	4/5 aa (80%)	CDJ91026.1
CPHTMHKQC	Dwil\GK11221-PA	5/5 aa (100%)	CDJ80070.1
CTNANHFC	Dominio BRK	5/6 aa (83%)	CDJ84517.1
CEFSKFRSC	Producto de proteína (Sin nombre)	6/7 aa (86%)	CDJ81058.1
CGSWRWLC	Dominio Peptidasa C19	6/8 aa (75%)	CDJ93158.1
CMSTGLSSC	Producto de proteína (Sin nombre)	6/7 aa (86%)	CDJ95066.1
CLKLGEKWC	Proteína HCOI_00219700	5/5 aa (100%)	CDJ81699.1
CLWSTGATC	Dominio extracelular SCP	5/6 aa (83%)	CDJ89144.1
CSISLTHC	Dominio de proteína DUF229	6/6 aa (100%)	CDJ94620.1
CESCAKSHC	dominio ShK	6/6 aa (100%)	CDJ89882.1
CRRQIGGNC	proteína MGC80099	6/6 aa (100%)	CDJ80092.1

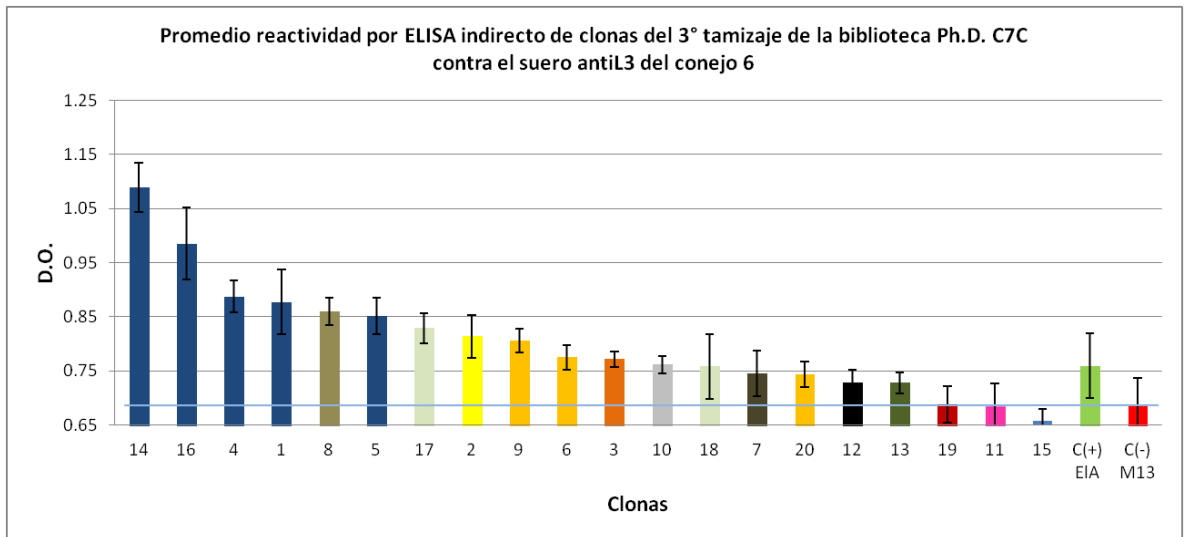
**Cuadro 8. Resultado del alineamiento de la secuencia expresada de las clonas de la biblioteca Ph.D. 12 contra *Haemonchus contortus***

Secuencia Ph.D. 12	Proteína	Coincidencia	Acceso GenBank
HFAYWWNGGRGP		7/11 aa (64%)	
HFAYWWNGGRGP	Dominio ferredoxina	8/11 aa (73%)	CDJ85987
LFAYWWNGVRGP		8/11 aa (73%)	
FNANSPHWSWSN	Proteína C. briggsae CBR-SID-1	7/10 aa (70%)	CDJ86520.1
EPNNGDGSWRWL	Proteína B0457.2	6/6 aa (100%)	CDJ87595.1
	Proteína CRE-EFF-1	7/12 aa (58%)	CDJ92918.1
TFPMTYQSLSNR	Dominio FAD oxidasa	8/10 aa (80%)	CDJ95065.1
AANQALAAGLLP	Dominio Proteína de unión a Acil-	7/9 aa (78%)	CDJ96667.1
TAYHLDFKRIWA	Dominio de proteína DUF1683	6/7aa (86%)	CDJ98300.1

### **Caracterización de las clonas seleccionadas del 3° tamizaje de ambas bibliotecas mediante ELISA indirecto**

Se encontraron 3 motivos repetidos en las clonas obtenidas de la biblioteca Ph.D. C7C reactivo a los anticuerpos contra *H. contortus* de los cuales el péptido con secuencia: CTNANHYFC (Figura 13) fue el más reactivo ( $p < 0.05$ ) y con más repeticiones (Cuadro 9).



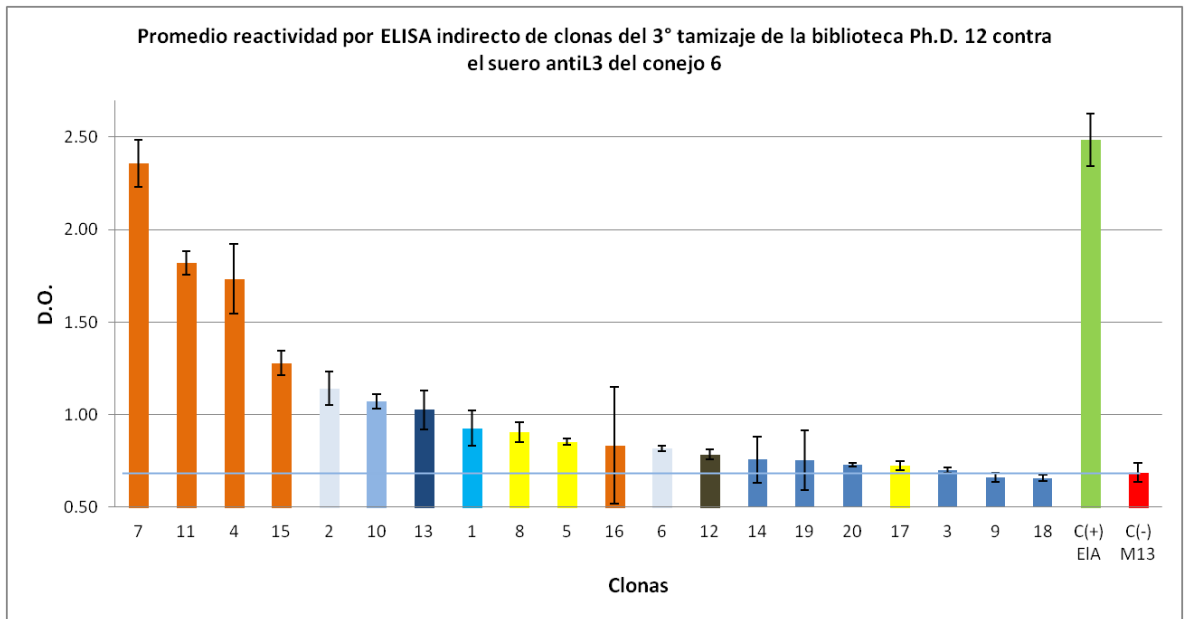


**Figura 13. Reactividad por ELISA indirecto de las clonas obtenidas de la 3° ronda de tamizaje de la biblioteca Ph.D. C7C contra suero antiL3.** Se utilizó  $1 \times 10^9$  fagos del eluido amplificado de la tercer ronda como control positivo (Verde) y  $1 \times 10^9$  fagos M13 como control negativo (Rojo)

**Cuadro 9. Frecuencia identificada de las 20 clonas seleccionadas mediante phage display de la biblioteca de C7C aa.** Se observaron en total 12 secuencias diferentes y 3 secuencias repetidas.

	Secuencia	Frecuencia	
	CTNANHYFC	5	1, 4, 5,14, 16
	CEGQRWMC	2	17,18
	CEFSKFRSC	3	6, 9, 20
	CESCAKSHC	1	8
	CTVESCLAC	1	15
	CPHTMHKQC	1	19
	CGSWRWLC	1	13
	CESCAKSHC	1	2
	CRRQIGGNC	1	7
	CMSTGLSSC	1	10
	CLKLGEKWC	1	11
	CLWSTGATC	1	12
	CSISLTHC	1	3

En el ELISA indirecto de la biblioteca Ph.D. 12, se observó que el motivo EPNNGDGSWRWL (Figura 14), fue el más reactivo del grupo ( $p < 0.05$ ) por lo cual se utilizó para inmunizar al grupo de conejos y se encontró 1 familia de motivos muy parecidas y abundantes (LFAYWWNGGRGP, HFAYWWNGVRGP, HFAYWWNGGRGP) las cuales son 91.6% y 83.6% idénticas respectivamente (Cuadro 10).



**Figura 14. Reactividad por ELISA indirecto de las clonas obtenidas de la 3° ronda de tamizaje de la biblioteca Ph.D. 12 contra suero antiL3 del conejo 6, se utilizó 1x10<sup>9</sup> fagos del eluido amplificado de la tercer ronda como control positivo (Verde) y 1x10<sup>9</sup> fagos M13 como control negativo (Rojo)**

**Cuadro 10. Frecuencia identificada de las 20 clonas seleccionadas mediante phage display de la biblioteca de 12 aa, se observaron en total 1 familia reactiva y 8 secuencias diferentes.**

Secuencia	Frecuencia	Familias	Núm. Clona
HFAYWWNGGRGP	5	12-1 (7/20)	1, 3, 9, 13,14,18, 19, 20
HFAYWWNGVRGP	1		
LFAYWWNGGRGP	1		
EPNNGDGSWRWL	5		4, 7, 11, 15, 16
TFPMTYQLSNR	3		5, 8, 17
FNANSPHWSWSN	2		2, 6
AANQALAAGLLP	1		10
TAYHLDFKRIWA	1		12

## Secuenciación clonas 4º Tamizaje

Se realizó un cuarto proceso de selección para saber si las clonas seleccionadas coincidían con las del tercer tamizaje. Se encontró que todas las clonas seleccionadas del cuarto tamizaje de Ph.D. 12 coincidían con la secuencia de aminoácidos de clonas del tercer tamizaje, mientras que la en la biblioteca de Ph.D. C7C solo 3 clonas coincidieron con clonas seleccionadas del tercer tamizaje (Cuadro 11 y 12).

**Cuadro 11. Comparación de la frecuencia observada de las secuencias identificadas en el tercer y cuarto tamizaje de la biblioteca Ph.D.12.** a) Frecuencia identificada de 20 clonas seleccionadas, se observaron en total 1 familia reactiva y 8 secuencias diferentes b) Frecuencia identificada de 9 clonas seleccionadas en el 4º tamizaje de la biblioteca de 12 aa, en todas las clonas se observaron repeticiones de la secuencias identificadas

a)	Secuencia	Frec.
	HFAYWWNGGRGP	5
	HFAYWWNGVRGP	1
	LFAYWWNGGRGP	1
	EPNNGDGSWRWL	4
	TFPMTYQSLSNR	3
	FNANSPHWSWSN	2
	AANQALAAGLLP	1
	TAYHLDFKRIWA	1

b)	Secuencia	Frec
	HFAYWWNGVRGP	5
	EPNNGDGSWRWL	3
	AANQALAAGLLP	1

**Cuadro 12. Comparación de la frecuencia observada de las secuencias identificadas en el tercer y cuarto tamizaje de la biblioteca Ph.D.C7C. a)** Frecuencia identificada de 20 clonas seleccionadas en el 3° tamizaje, se observaron 12 secuencias diferentes **b)** Frecuencia identificada de 5 clonas seleccionadas en el 4° tamizaje de la biblioteca Ph.D.C7C, se identificaron 3 clonas con las mismas secuencias presentes en el tercer tamizaje y 2 secuencias que no habían sido identificadas previamente.

	Secuencia	Frecuencia
	CTNANHYFC	5
	CEGQRWMC	2
	CEFSKFRSC	3
	CESCAKSHC	1
	CTVESCLAC	1
	CPHTMHKQC	1
	CGSWRWLC	1
	CESCAKSHC	1
	CRRQIGGNC	1
	CMSTGLSSC	1
	CLKLGEKWC	1
	CLWSTGATC	1
	CSISLTHC	1

	Secuencia	Frecuencia
	CTNANHYFC	2
	CEFSKFRSC	1
	CRRQIGGNC	1
	CSWQMGGNC	1
	CSDARSPKC	1
	Wild type	4

### Selección de clonas candidatas

En total se obtuvieron 40 clonas conteniendo 18 secuencias diferentes. De las cuales, se seleccionaron 4 clonas con base a su frecuencia de selección en el tercer tamizaje y su reactividad contra Ag de L3 de H. contortus. Con las cuales se inmunizaron 2 conejos por clona con el fin de obtener sueros específicos contra estas clonas (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Número de identificación y secuencia de cada clona con la que se inmunizó a cada grupo de conejos**

Grupo	Clona Ph.D. 12	Secuencia
1	8	TFPMTYQSLNR
2	13	LFAYWWNGVRGP
3	7	EPNNGDGSRWL
4	C(-)	M13

Grupo	Clona Ph.D. C7C	Secuencia
5	14	CTNANHYFC

## **Análisis de secuencias de clonas seleccionadas**

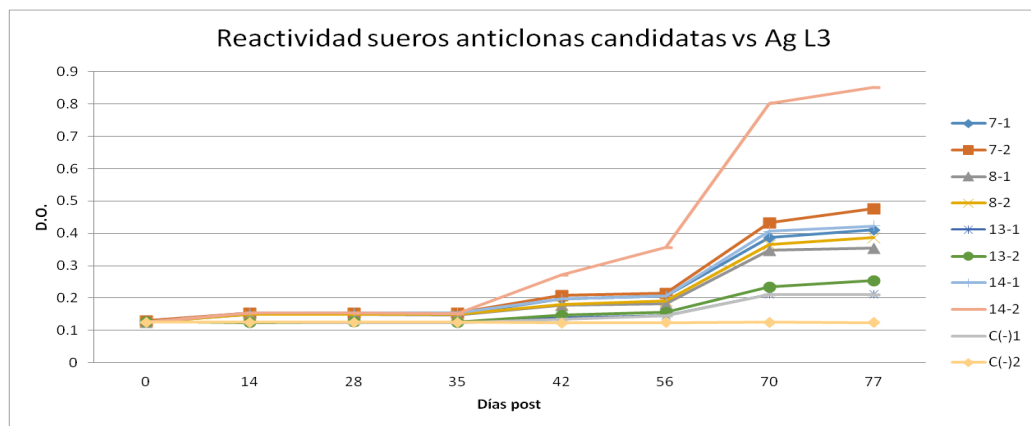
Se utilizaron los programas de predicción de epítomos ABCpred y BCEpred para conocer si la secuencia de la clona seleccionada es un posible epítomo, se utilizó como referencia la proteína con la que la secuencia tiene mayor identidad (Cuadro 14 y 15). Las clona 7 Ph.D. 12 tuvo el mejor puntaje mientras que la clona 13 Ph.D. 12 fue la que tuvo el menor puntaje.

**Cuadro 14. Análisis de secuencias de clonas seleccionadas.** El puntaje muestra la probabilidad de que cada clona sea un epítomo entre mayor sea el puntaje mayor es la posibilidad de ser un epítomo.

<b>Clona-Ph.D.</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Proteína de referencia</b>	<b>Acceso Genbank</b>	<b>BCEpred Puntaje (-3 a 3)</b>	<b>ABCpred Puntaje (0 a 1)</b>
14-C7C	CTNANHYFC	Protein ZC21.6	CDJ96412.1	0.8	0.82
7-12	EPNNGDGSRWL	Proteína B0457.2	CDJ87595.1	2.04	0.95
8-12	TFPMTYQSLSNR	Dominio FAD oxidasa	CDJ96338.1	0.84	0.84
13-12	LFAYWWNGVRGP	Dominio ferredoxina	CDJ85987.1	0.51	0.76

## Titulación del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas mediante ELISA indirecta durante el periodo de inmunización

Se evaluó la reactividad de los sueros contra las clonas candidatas por cada semana a partir del día 0 de inmunización (Figura 15). En general, se observó que el aumento de la reactividad de cada suero es dosis dependiente con respecto al aumento de Ag inoculado a partir del día 28, siendo el suero contra la clona 14 el más reactivo ( $p < 0.05$ ).

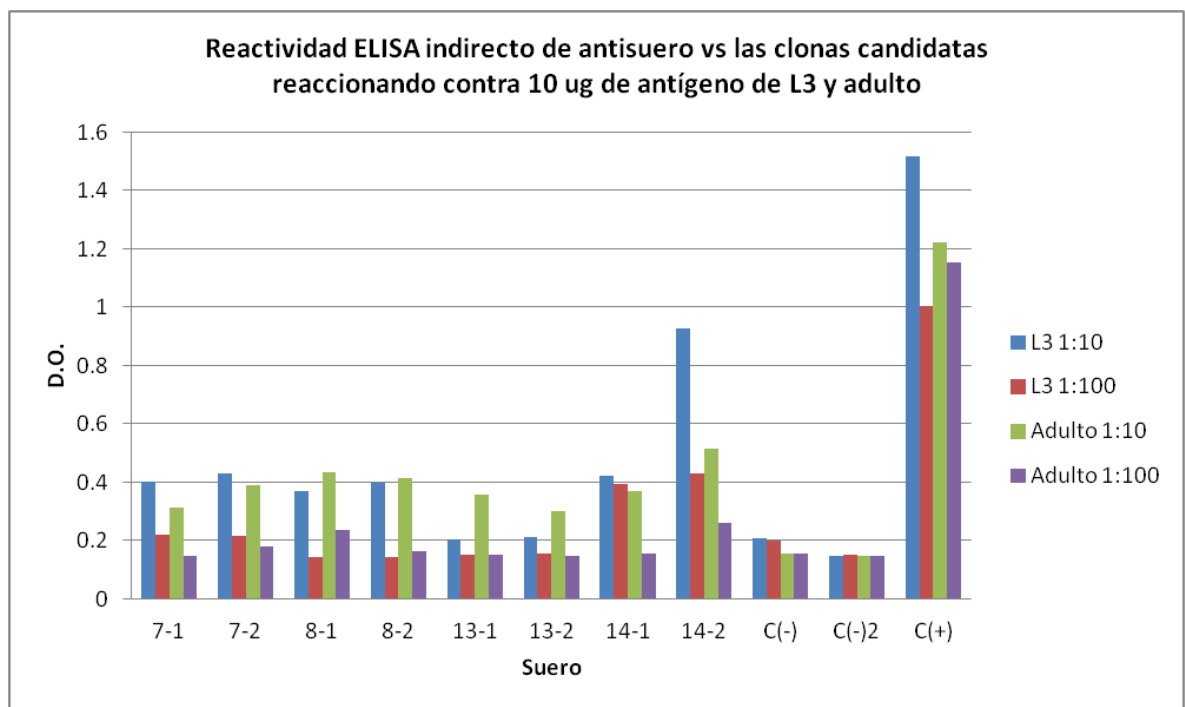


**Figura 15. Reactividad ELISA indirecto de cada fecha de inmunización de los conejos en donde se empleó antisuero vs las clonas candidatas reaccionando contra Ag de L3. Se utilizó suero anti-m13 C (-)1 y suero de conejo sin inmunizar C (-)2 como controles negativos. Suero 1:10, revelado con OPD.**



### Titulación del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas contra Ag de L3 mediante ELISA indirecta

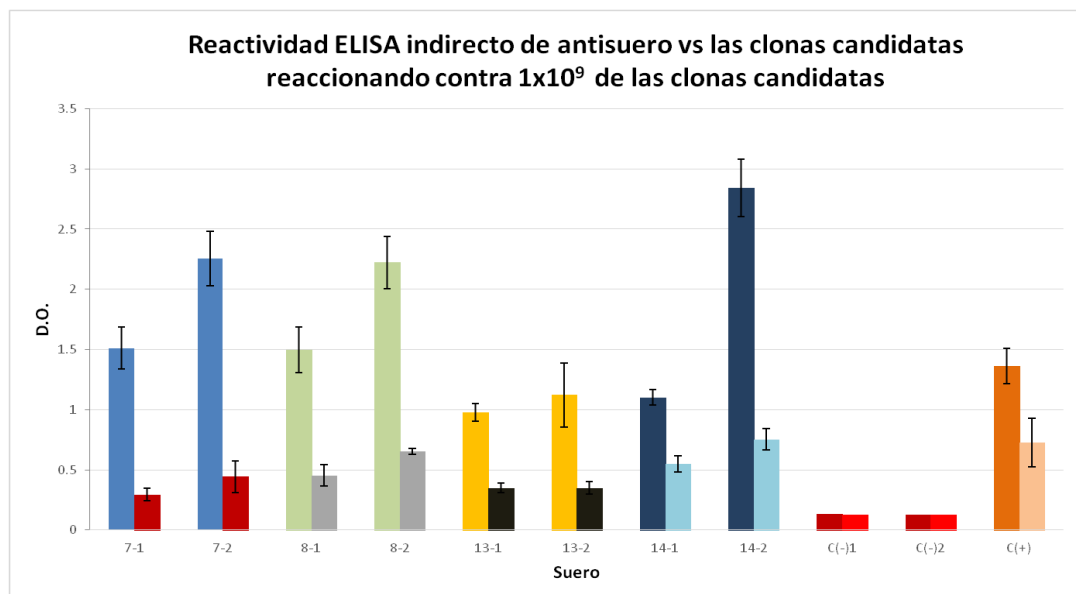
Se evaluó la reactividad de los sueros anti clonas candidatas del día 77 de inmunización contra Ag de L3, se observó reactividad en todos los sueros, siendo el suero contra la clona 14 el más reactivo ( $p < 0.05$ ) y el suero contra la clona 13 el menos reactivo (Figura 16).



**Figura 16. Reactividad ELISA indirecto de antisuero vs las clonas candidatas reaccionando contra 10 µg de antígeno de L3 y adulto.**, se utilizó  $1 \times 10^9$  fagos del eluido amplificado de la tercer ronda de selección como control positivo y  $1 \times 10^9$  fagos M13 como control negativo. Suero 1:10 y 1:100, suero anticonejo 1:1700, revelado con OPD.

## Titulación del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas contra las clonas candidatas mediante ELISA indirecta

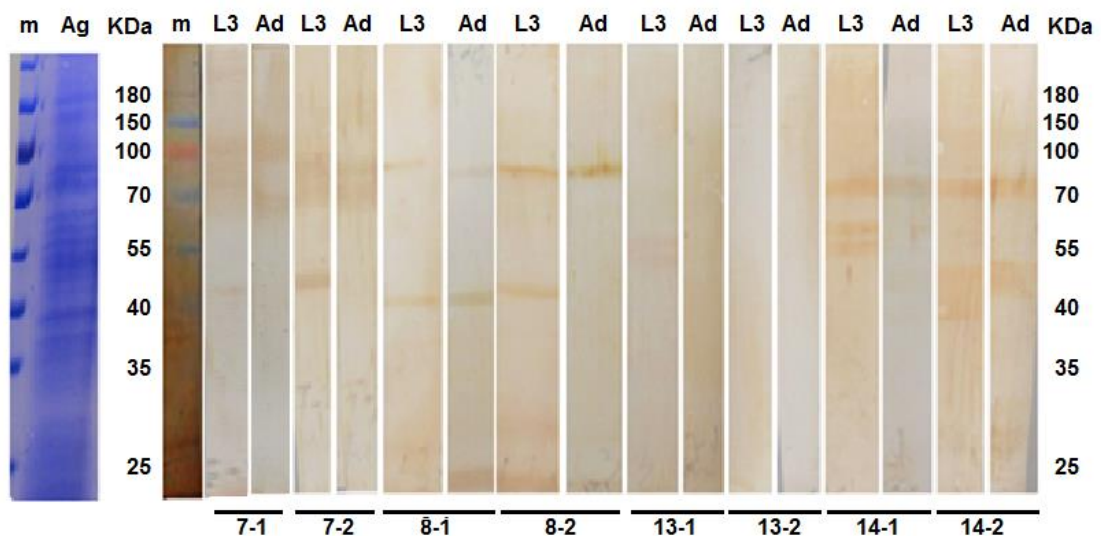
Se evaluó la reactividad de los sueros anti clonas candidatas del día 77 de inmunización contra las clonas candidatas (Figura 17), se observó mayor reactividad en todos los sueros respecto al ELISA contra el Ag de L3, siendo nuevamente el suero contra la clona 14 el más reactivo ( $p < 0.05$ ) y el suero contra la clona 13 el menos reactivo ( $p < 0.05$ ).



**Figura 17. Reactividad de ELISA indirecto de antisuero vs las clonas candidatas reaccionando contra  $1 \times 10^9$  de las clonas candidatas.**, se utilizó  $1 \times 10^9$  fagos del eluido amplificado de la tercer ronda de selección como control positivo y  $1 \times 10^9$  fagos M13 como control negativo. Suero 1:10 (Barra izquierda) y 1:100 (Barra derecha), suero anticonejo 1:1700, revelado con OPD.

## Reactividad del suero hiperinmune de conejo anti clonas candidatas contra Ag de L3 y adulto mediante Western-blot

Todos los antisueros generados contra las clonas identificaron de una hasta tres bandas (Figura 18), menos el antisuero contra la clona 13, aunque el conejo 1 revela tenuemente un par de bandas en L3 (~55 Kd). Este reconocimiento de bandas fue en general en ambas fases del parásito. Se puede apreciar que hubo una ligera diferencia en la respuesta en cada uno de los dos conejos inmunizados. Se observan pocas diferencias entre diferentes individuos del mismo grupo mientras que se aprecia mayor reactividad contra L3 que en el adulto de *H. contortus*.



**Figura 18. Reactividad de 30 µg de antígeno de L3 y adulto contra los sueros anticlonas candidatas. (1) Gel de acrilamida al 12% con 30 µg de Ag de L3, (2) gel de acrilamida al 1% con 30 µg de Ag de adulto,**

Se aprecia que el peso molecular de la proteína de referencia (Cuadro 15) y las proteínas detectadas por la clona 7-Ph.D. 12 y 14- Ph.D. C7C (Figura 18) son semejantes.

**Cuadro 15. Peso molecular de las proteínas de referencia usadas para la predicción epítopos.**

<b>Clona-Ph.D.</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Proteína con mayor identidad</b>	<b>Acceso Genbank</b>	<b>Peso Molecular (KDa)</b>
14-C7C	CTNANHYFC	Proteína ZC21.6	CDJ96412.1	~51
7-12	EPNNGDGSWRWL	Proteína B0457.2	CDJ87595.1	~38
8-12	TFPMTYQSLSNR	Dominio FAD oxidasa	CDJ96338.1	~58
13-12	LFAYWWNGVRGP	Dominio ferredoxina	CDJ85987.1	~65

## **Discusión y conclusiones**

Al comparar los patrones de bandas de las proteínas de la fase L3 y adulto en los geles SDS-PAGE un aislamiento de *H. contortus* empleada en este estudio con los patrones de los geles de Smith (2001), quien utilizó un aislamiento inglés y Anbu (2008), usando un aislamiento de la India, se puede apreciar un patrón de proteínas muy parecidos. Estos datos se ajustan a los reportados por Bassetto (2015) quien indica que las proteínas del parásito son geográficamente conservadas. Razón por la cual una vacuna puede afectar a diferentes cepas del parásito. Éste hecho puede ser de utilidad para crear una vacuna eficiente no sólo contra diferentes cepas del parásito sino contra todas las fases de su ciclo de vida. Los ensayos de ELISA con el suero de conejo anti-L3 detectan reactividad tanto en Ag de L3 como de adulto. Esto mismo se aprecia por WB, apreciando que se reconocen unos pocos Ag (Entre

8 y 9) de la fase L3, así como en la fase adulta (Entre 5 y 6), las bandas observadas en el WB con Ag de adulto se encuentran también en el WB con Ag de L3 con diferentes reactividades, esto implica que ambas fases poseen antígenos inmunodominantes en común. Estudios del transcriptoma realizados por Laing et al. (2013) reporta hay genes que se expresan en común en las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito. Muy probablemente algunos de estos genes correspondan a los antígenos detectados por los anti-sueros L3 de conejo; sin embargo, algunas bandas que se pueden apreciar en el WB de Ag de L3 no se observan en el WB con Ag de adulto.

La comparación por WB de los patrones de antígenos detectados por los antisueros de conejo y de ovejas reveló mayor cantidad de bandas en el suero de conejo que en el de ovino, esto puede deberse a que los anticuerpos del suero de conejo estén detectando antígenos que los anticuerpos del suero de ovino no están detectando, apoyando la hipótesis de la coevolución de Janzen (1980) que menciona que es posible que a lo largo de miles de años de evolución el parásito ha desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped (Leigh Van Valen, 1973) entre ellos ocultar antígenos vitales del parásito. Por otro lado se observó que las dos bandas que se encuentran en los sueros de ovinos de aproximadamente 35 y 70 Kda parecen coincidir con las bandas encontradas en el

suero de conejo, este resultado nos indica que es posible que ambas especies hayan detectado dos proteínas inmunodominantes.

Mediante el panning con IgG anti-L3 de bibliotecas combinatorias (Ph.D. C7C y Ph.D.12) de Phage display se seleccionaron 20 clonas de cada biblioteca. La secuencia de nucleótidos de las clonas reveló que se seleccionaron 18 secuencias de aa diferentes (10 de Ph.D. C7C y 8 de Ph.D. 12). Algunas clonas se seleccionaron repetidamente, por lo menos 2 veces, identificando 7 diferentes motivos de aminoácidos, tres de los cuales pertenecen a la biblioteca Ph.D. C7C y 4 a la biblioteca de Ph.D. 12, debido probablemente a que estas clonas poseen una alta afinidad a los anticuerpos contra L3. Esto se verificó por ELISA indirecta, encontrando que la mayoría de las clonas seleccionadas repetidamente tenían a su vez alta reactividad antigénica. Sin embargo, la clona 13 seleccionada de la biblioteca Ph.D. 12, la cual se seleccionaron 6 veces, tuvo baja reactividad.

Para poder demostrar que los péptidos de las clonas seleccionadas representan a mimótopos naturales del parásito, se seleccionaron 4 clonas para ser inmunizadas en conejos. Estas clonas fueron las que tenían un mayor nivel de reactividad en los ensayos de ELISA y a su vez se seleccionaron con mayor frecuencia. Aunque se empleó también la clona 13 de la biblioteca Ph.D. 12,

Estos anti-sueros se evaluaron por ELISA y WB con los antígenos de L3 y parásito adulto. Anti-sueros de las clonas 7, 8 y 14 reaccionaron con títulos altos en ELISA y detectaron una o hasta 3 bandas conservadas tanto en L3 y adulto. Esto demuestra que las secuencias de los péptidos expresadas por estas clonas corresponden a mimótopos del parásito. Sin embargo, la clona 13 de la biblioteca Ph.D. 12, tuvo una reactividad muy baja en los ensayo de ELISA y en el WB un conejo detecto bandas, el otro conejo solo detecto un par de bandas en L3. Es difícil explicar el alto número de clonas seleccionadas para esta secuencia teniendo una baja reactividad antigénica en ELISA. En las otras clonas se encontró una buena correlación entre la reactividad por ELISA y la detección de bandas por WB.

Los antisueros de la clonas en los experimentos WB detectaron de una a 3 bandas conservadas en la fase de L3 y adulto. El hecho que un mimótopo genere anticuerpos que detecta a varias proteínas puede deberse a que la fracción expresada por el epítipo es muy corta y es posible que varias proteínas compartan el mismo epítipo, esto explica por qué no todos los pesos de las proteínas de referencia coinciden con el del WB y porqué algunos de los sueros tuvieron reactividad a más de una proteína, lo cual representa una ventaja, ya que al desarrollar una vacuna los anticuerpos específicos se dirigirían no solo contra una proteína sino contra varias proteínas que comparten una secuencia en común. Los anticuerpos contra la clona 13 fueron los que tuvieron menor reactividad, sin

embargo, fue la clona que se seleccionó con mayor frecuencia, éste hecho se puede deber a que en el proceso de tamizaje la secuencia expresada por el fago favorezca su replicación y, por lo tanto aumente su probabilidad de ser seleccionada (Powell, 2014). Por otro lado, los anticuerpos con mayor reactividad corresponden a los sueros contra la clona 14, la única seleccionada de la biblioteca Ph.D. C7C, es probable que esta mayor reactividad se deba a la estructura conformacional del mimótopo que es posible que se asemeje estructuralmente al antígeno nativo y, por lo tanto, los anticuerpos tengan mayor afinidad con esta clona (Roberts, 2000). Las proteínas detectadas por WB por los sueros de las clonas clona 7 y 14 son semejantes al de las proteínas identificadas con mayor identidad para la secuencia de la clona usados en los programas de predicción de epítomos ABCpred y BCEpred, la proteína B0457.2 tiene un peso de 38KDa y la Proteína ZC21.6 tiene un peso de 50Kda coincidiendo con los pesos apreciados por Western blot contra los sueros anti-clona 7 Ph.D. 12 y la clona 14 Ph.D. C7C respectivamente, lo que sugiere que es probable que se hayan seleccionado mimótopos de esta proteína. Estos mimótopos son candidatos a ser evaluados en su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en experimentos de inmunización-desafío en ovinos.



## Bibliografía

Alba F. y Muñoz M. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *Rev. Biomed Research International*. 2013; 1-11

Anbu K. y Joshi P. Identification of a 55 kDa *Haemonchus contortus* excretory/secretory glycoprotein as a neutrophil inhibitory factor. *Rev. Parasite Immunology*. 2008; 30: 23–30

Andrews S., Munn E. y Taylor M. Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11. *Rev. Research in veterinary science*. 1997; 62(3): 223-227.

Barbas III. C., Burton D., Scott J., Silverman G. Phage Display: A laboratory manual. Estados Unidos de America. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

Bassetto C. y Amarante A. Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *Rev. Journal of Helminthology*. 2015; 89: 517–525

Beltrán S. Valoración de seis técnicas de coprocultivo para la obtención de la larva infectante de *Haemonchus contortus*. (Tesis de licenciatura). México, Estado de México. Universidad Nacional Autónoma de México, 1984.

Botello A. et al. Control de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos con el inmunógeno Herber biogar. *Rev.Redvet*. 2011; 12(5): 1-10.

Cachat, E., Newlands, G., Ekoja, S., McAllister, H. y Smith, W. Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, H-gal-GP. *Rev. Parasite Immunology*. 2010; 32: 414–419

Cheng, X.-J., Hayasaka, H., Watanabe, K., Tao, Y.-L., Liu, J.-Y., Tsukamoto, H., et al. Production of high-affinity human monoclonal antibody Fab fragments to the 19-Kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum*. 2007. *Rev. Infect. Immun*. 75: 3614–3620.

Cuéllar J. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo y respiratorio en ovinos y caprinos. Memorias Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos; 2002; Morelia, Michoacán; Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cunha-Junior J., Silva D., Silva N., Souza M., Souza G., Prudencio C., et al. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. 2010 Rev. Immunobiology 215: 26–37

Da Silva, A., Kawazoe, U., Freitas, F., Gatti, M., Dolder, H., Schumacher, R., et al. Avian anticoccidial activity of a novel membrane interactive peptide selected from phage display libraries. 2002. Rev. Mol. Biochem. Parasitol. 120, 53–60

Ellis S., Newlands G., Nisbet A. y Matthews J. Phage-display library biopanning as a novel approach to identifying nematode vaccine antigens. Rev. Parasite immunology. 2012; 34:285-29

Emery D., McClure S. y Wagland B. Production of vaccines against gastrointestinal nematodes of livestock. Rev. Immunol Cell Biol 1993; 71: 463–472

Felici F., Luzzago A., Folgori A. Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries. Rev. Gene. 1993; 128(1):21–7.

Figuerola J., Méndez R., Berruecos J., Álvarez J. Detección de resistencia a *Haemonchus contortus* al sulfoxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. Rev. Veterinaria México. 2000; 31(4): 1-7.

Frenkel D., Katz O., Solomon B. Immunization against Alzheimer's b-amyloid plaques via EFRH phage administration. Rev. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000 (97): 11455-11459.

García A., Soto V., Tamayo Y., Rosales A., San Martín C. Influencia de la edad de ovinos en desarrollo en la infestación por estrongídeos gastrointestinales. Rev. Granma Ciencia. 2008; 12(2): 2-7.

Geysen H., Rodda S., Mason T. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. *Ciba Found Symp.* 1986; 119:130–49.

Gu Y., Li J., Zhu X., Et al. *Trichinella spiralis*: characterization of phage-displayed specific epitopes and their protective immunity in BALB/c mice. *Rev. Exp Parasitol* 2008; 118: 66–74

Janzen D. When is coevolution? *Rev. Evolution.* 1980; 34(3):611-612

Knittelfelder R., Riemer A., Jensen-Jarolim E. Mimotope vaccination – from allergy to cancer. *Rev. Expert Opin Biol Ther.*2009; 9:493–506

Knox D. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *Rev. International Journal for Parasitology.* 2003; 33(11):1129-1137.

Kozbor D. Cancer vaccine with mimotopes of tumor-associated carbohydrate antigens. *Rev, Immunol Research.* 2010; 46:23–31

Laing R. Et al. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Rev. Genome Biology.* 2013; 14(8):r88

Leigh Van Valen. Molecular Evolution as Predicted by Natural Selection. *Rev. Molecular Evolution.* 1973; 3: 89-101

LeJambre L., Windon R. y Smith W. Vaccination against *Haemonchus contortus*: performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Rev. Veterinary parasitology.* 2008; 153(3-4):302-312.

Liéban E., López M., Mendoza P., Aguilar L. Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nemaátodos gastrointestinales en rumiantes. México, Instituto nacional de investigaciones forestales agrícolas y pecuarias. 2011

Luzzago A., Felici F, Tramontane A. Mimicking of discontinuous epitopes by phagedisplayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Rev. Gene.* 1993; 128(1):51–7.

McClure S. y Filmer M. Low liveweight link to parasites. *Rev. Farming ahead*. 2006; 176: 52-54.

Melzer H, Fortugno P, Mansouri E, Et al. Antigenicity and immunogenicity of phage Library-selected peptide mimics of the major surface proteophosphoglycan antigens of *Entamoeba histolytica*. *Rev. Parasite Immunol.*2002; 24: 321–328

Muhammad Q, Azhar M. y Nisar A. Economic losses due to haemonchosis in sheep and goats. *Rev. Sci.Int. (Lahore)* 2011; 23(4):295-298.

Munn E., Smith T., Graham M., Tavernor A., Greenwood C. The potential value of integral membrane proteins in the vaccination of lambs against *Haemonchus contortus*. *Rev. Int. J. Parasitol.* 1993; 25: 261-269

Newton S., Morrish L., Martin P., Montague P. y Rolph T. Protection against multiply drug resistant and geographically distant strains of *Haemonchus contortus* by vaccination with H11, a gut membrane-derived protective antigen. *Rev. International Journal for Parasitology.*1995; 25: 511–521.

Powell G. y Brown C. Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides. *Rev. Chemical reviews.* 2014; 114 (2): 1020–1081

Quiroz H. *Parásitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos.* México, Editorial Limusa. 1984. Pág. 574-580.

Radostits, O.; Gay, C.; Blood, D.; Hinchcliff, K. *Medicina Veterinaria, Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino.* 9° Edición. Edit. McGraw Hill. Madrid-España, 2002: 45-49.

Redmond D. y Knox D. Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*. *Rev. Vaccine.* 2004; 22: 4252–4261.

Rhie G., Park Y., Chun J., Yoo C., Seong W., Oh H. Expression and secretion of the protective antigen of *Bacillus anthracis* in *Bacillus brevis*. *Rev. FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 2005 (45): 331-339.

Riemer A., Jensen-Jarolim E. Mimotope vaccines: epitope mimics induce anti-cancer antibodies. *Rev. Immunol Lett.* 2007; 113:1–5

Roberts, L., Janovy J. Foundations of Parasitology. 8° Edición. Edit. McGraw Hill. Estados Unidos de América, 2000: 267-276.

Rodríguez R., Et al. Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. México, Consejo Nacional de ciencia y tecnología. 2011: 14-17.

Saha.S y Raghava G. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. Ed. Estados Unidos de America. ICARIS. 2004.

Saha, S y Raghava G. Prediction of Continuous B-cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. Rev. Proteins. 2006; 65(1):40-48

Sambrook J and Russell DW. Molecular Cloning. A laboratory Manual third ed. China. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Schwarz E. Et al. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode Haemonchus contortus. Rev. Genome Biology. 2013; 14(8):r88

Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Rev. Science. 1985; 228(4705):1315-7.

Smith G. y Petrenko V. Phage display. Rev. Chemical Reviews. 1997; 97(2): 391-410.

Smith, S. Et al. Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of Haemonchus contortus. Rev. Parasite Immunology. 1999; 21: 187-199.

Smith W., Angus K. Haemonchus contortus: attempts to immunise lambs with irradiated larvae. Rev. Research in veterinary science. 1980; 29:45-50

Smith, W., Smith, S. y Murray, J. Protection studies with integral membrane fractions of Haemonchus contortus. Parasite Immunology. 1994; 16, 231-241.

Smith, W., Smith, S., Pettit, D., Newlands, G y Skuce, P. Relative protective properties of three membrane glycoprotein fractions from Haemonchus contortus. Rev. Parasite Immunology. 2000; 22: 63-71.

- Smith W., Pettit D. y Smith S. Cross-protection studies with gut membrane glycoprotein antigens from *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta*. *Rev. Parasite Immunology*. 2001; 23: 203-211
- Smith W., Newlands G., Smith S., Pettit, D. y Skuce, P. Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Rev. Parasite Immunology*. 2003a; 25: 313–323
- Smith,W., Skuce, P., Newlands, G., Smith, S. y Pettit, D. Aspartyl proteases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Rev. Parasite Immunology* 2003b; 25: 521–530.
- Smith, W. Attempts to detect synergy between vaccination and anthelmintic against a drug resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Rev. Veterinary Parasitology*. 2007; 148: 356–359.
- Sowa, K., Cavanagh, D., Creasey, A., Raats, J., McBride, J., Sauerwein, R., et al. Isolation of a monoclonal antibody from a malaria patient-derived phage display library recognising the Block 2 region of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. 2001. *Rev. Mol. Biochem. Parasitol.* 112: 143–147
- Suarez M. Control de las infestaciones de la garrapata *Boophilus microplus* en la ganadería Cubana y en regiones de Latinoamérica con la aplicación del inmunogeno Gavac dentro de un programa de lucha integral. *Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe, Red Ectopar.* 2007
- Sztanyik L. Radiovacunas para combatir las enfermedades parasitarias humanas. *Rev. IAEA Bulletin*.1980; 26: 20-25
- Tavernor A., Smith T., Langford C., MUNN E., Graham M. Vaccination of young Dorset lambs against haemonchosis. *Rev. Parasite immunology*. 1992; 14(6): 645-655.
- Tonelli R., Colli W. y Alves M. Selection of binding targets in parasites using phage-display and aptamer libraries in vivo and in vitro. *Rev. Microbial Immunology*. 2013; 3: 419-423.

Troell K., Waller P. y Höglund J. The development and overwintering survival of free-living larvae of *Haemonchus contortus* in Sweden. *Rev. Journal of Helminthology*. 2005; 79:373-379.

Vázquez G. et al. Estrategias para el control integral de las nemaátodosis gastrointestinales en rumiantes en México. Libro técnico No 1. Ed. Centro nacional de investigación disciplinaria en parasitología veterinaria. 2004; 158-173

Villa A., Et al. Induction of immunity in sheep to *Fasciola hepatica* with mimotopes of cathepsin L selected from a phage display library. *Rev. Parasitology*. 2008; 135(12):1437-45.

White, G. y S. Newton. A single chain variable region immunoglobulin library from the abomasal lymph node of sheep infected with the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. *Rev. Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 78: 117-129.