

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN
DE *Fasciola hepatica* EN BACTERIÓFAGOS
FILAMENTOSOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

ESPIRIDIÓN RAMOS MARTÍNEZ

TUTOR:
DR. HÉCTOR QUIROZ ROMERO

COMITÉ TUTORAL:
DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES
DR. JULIO V. FIGUEROA MILLÁN

MÉXICO D.F.

2004

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIA

“Multi sun vocati pausi vero electi”

A mis padres, Mario Ramos y Avelina Martínez por su amor, comprensión y tolerancia para el desarrolló de todas miş locuras.

A mis hermanos Maria Obdulia y José Manuel, por ser apoyo y motivo.

A la memoria de mis abuelos maternos y paternos con todo cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Héctor Quiroz Romero, por su orientación y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del jurado Doctores: Dolores Correa Beltrán, Julio V. Figueroa Castillo, Pedro Mendoza de Gives, Rogelio Alonso Morales y Héctor Quiroz Romero. Por sus aportaciones para la realización de este trabajo.

Al Doctor Rogelio Alonso Morales por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

Agradezco el apoyo técnico, en Biología Molecular, a la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez, del laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística.

A todo el personal del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Al Doctor Antonio Figueroa, por su ayuda y sobre todo por su amistad.

A mis amigos de licenciatura, Juan José Montes y Zayra Piña Camargo, por su amistad a prueba de golpes.

A la MVZ Felicitas Vázquez por toda su ayuda técnica, por sus consejos, su apoyo y compañía en momentos difíciles.

A mis amigos del departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM, Alfonso Olivos, Mario Nequiz, Marco Elías Gudiño, Omar Agni García, Ricardo Vargas, Daniel Sánchez y Dr. Ruy Pérez Tamayo.

Al MVZ Alberto Ramírez Guadarrama y MVZ Tóbele Toríz por todo su apoyo en el laboratorio de Parasitología.

A mis compañeros de maestría Verónica Ocampo y Mario Espinosa.

A Dinorah Zepeda, por compartir momentos buenos y malos.

A todos cuantos me dieron una palabra de aliento en mis múltiples ratos de desesperación.

Al CONACYT por apoyarme con una beca para el desarrollo de mis estudios de maestría.

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	7
I-INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Generalidades.....	8
1.2 Morfología y ciclo biológico.....	8
1.3 Importancia económica y sanitaria.....	9
1.4 Diagnóstico y control.....	10
1.5 Respuesta inmune a <i>F. hepatica</i>	11
1.6 Aplicaciones de biología molecular en parasitología.....	14
1.7 Bibliotecas de expresión genética.....	15
1.8 Sistema “phage display”.....	16
1.9 Justificación.....	18
1.10 Objetivo general.....	19
1.11 Objetivos específicos.....	19
1.12 Metas.....	19
II.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
2.1 Obtención de parásitos adultos.....	21
2.2 Purificación de RNA total.....	21
2.3 Cuantificación de RNA total.....	22
2.4 Purificación de RNA mensajero.....	22
2.5 Cuantificación de RNA mensajero.....	23
2.6 Síntesis de primera y segunda cadena de cDNA.....	23
2.7 Fraccionamiento del cDNA.....	25
2.8 Preparación del vector “phage 3.2”.....	26
2.9 Eficiencia de transformación del “phagemido 3.2”.....	27
2.10 Preparación del bacteriófago “helper” M13K07.....	27
2.11 Células TG1 y HB2151.....	28
2.12 Células competentes.....	28
2.13 Células en fase logarítmica.....	28
2.14 Determinación del número de clones representativas del transcriptoma..	29
2.15 Ligación del cDNA y el “phagemido 3.2”.....	29
2.16 Obtención de los viriones recombinantes.....	29
2.17 Titulación de la biblioteca.....	30
2.18 Determinación del porcentaje de clones recombinantes.....	30

2.19 Obtención de antígenos somáticos de <i>F. hepatica</i>	31
2.20 Obtención de suero hiper-inmune anti- <i>F. hepatica</i>	31
2.21 "Panning" (inmovilización de viriones recombinantes)	31
2.22 Precipitación de los viriones recombinantes	32
2.23 Técnica de Bradford para cuantificar proteína	32
2.24 Prueba de ELISA con viriones recombinantes	33
III.- RESULTADOS	35
3.1 Obtención de parásitos adultos.....	35
3.2 Purificación de RNA total.....	35
3.3 Purificación de RNA mensajero.....	35
3.4 Síntesis de primera y segunda cadena de cDNA.....	35
3.5 Fraccionamiento de cDNA.....	36
3.6 Purificación del "phagemido 3.2".....	36
3.7 Digestión del "phagemido 3.2" con EcoRV.....	36
3.8 Transformación de células DH10b	36
3.9 Precipitación del "phagemido 3.2".....	37
3.10 Desfosforilación del "phagemido 3.2".....	37
3.11 Ligación del "phagemido 3.2" con un inserto control	37
3.12 Titulación del bacteriófago filamentoso "helper".....	37
3.13 Propagación del bacteriófago filamentoso "helper".....	37
3.14 Preparación de células competentes.....	38
3.15 Determinación del número de clonas.....	38
3.16 Clonación de cDNA de <i>F. hepatica</i>	38
3.17 Obtención de viriones recombinantes.....	39
3.18 Determinación del porcentaje de clonas recombinantes.....	39
3.19 Obtención de antígenos somáticos de <i>F. hepatica</i>	40
3.20 Obtención de suero hiper-inmune anti- <i>F. hepatica</i>	40
3.21 "Panning".....	40
3.22 Precipitación de viriones recombinantes	40
3.23 ELISA con viriones recombinantes.....	40
IV.- DISCUSIÓN	42
V.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

Lista de cuadros

Cuadro	Título	Pag.
1	Esquema de inmunización para obtener anti-suero.....	53
2	Lecturas de la purificación de RNA total de <i>F. hepatica</i>	53
3	Lecturas de la purificación de RNAm de <i>F. hepatica</i>	54
4	Porcentaje de Incorporación del elemento radiactivo dATP [α - ³² P], en la síntesis de primera cadena.....	54
5	Incorporación de dATP [α - ³² P] en las reacciones de síntesis de segunda cadena.....	55
6	Cuantificación del cDNA, de las muestras fraccionadas.....	55
7	Protocolo de digestión para el "phagemido" con EcoRV.....	56
8	Protocolo de desfosforilación.....	56
9	Protocolo de ligación para la evaluación del vector.....	57
10	Resultado de las ligaciones en el vector "phage 3.2" con diferentes cantidades de inserto.....	57
11	Diluciones del bacteriófago "helper" en medio 2XYT.....	58
12	Títulos obtenidos del bacteriófago "helper".....	58
13	Protocolo para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa	59
14	Condiciones para el desarrollo de la PCR.....	59
15	Concentración de proteína obtenida en las 3 purificaciones de antígeno somático de <i>F. hepatica</i>	60

Lista de figuras

Figura	Título	Pag
1	<i>Fasciola hepatica</i> . Parásito adulto.....	61
2	Ciclo biológico de <i>F. hepatica</i>	62
3	“Phagemido” utilizado por el sistema “EZnet™ phage display cDNA library”.....	63
4	Corrimiento electroforético de RNA total de <i>F. hepatica</i>	64
5	Gel de agarosa alcalina 1%,.....	65
6	Corrimiento electroforético del “phagemido” obtenido.....	66
7	Fragmentos amplificados de células TG1.....	67
8	Fragmentos amplificados de células HB2151.....	68
9	Prueba de ELISA con placa sensibilizada con viriones recombinantes.....	69
10	Corrimiento electroforético de los 3 antígenos somáticos de <i>F. hepatica</i>	70
11	Titulación de suero hiper-inmune.....	71

Construcción de una biblioteca de expresión de *Fasciola hepatica* en bacteriófagos filamentosos.

La fasciolosis es considerada como una de las más importantes parasitosis en los rumiantes domésticos. El diagnóstico se ha realizado por técnicas coprológicas, pero estas tienen baja sensibilidad, además se han empleado pruebas inmunológicas como ELISA. El control se realiza mediante la aplicación de métodos químicos, físicos, biológicos y de manejo zootécnico. Con el propósito de ayudar a la solución del diagnóstico y control, se han generado una gran cantidad de herramientas de biología molecular, que han permitido desarrollar técnicas diagnósticas y preventivas; con resultados variables. El objetivo del presente trabajo fue construir una biblioteca de expresión de proteínas recombinantes, que pudiera ser utilizada en estudios relacionados con el diagnóstico y la profilaxis. A partir de *Fasciola hepatica* adulta, se purificó RNA total y posteriormente mensajero, se sintetizó cDNA que fue clonado en el phagemido "Phage 3.2", la biblioteca fue propagada en células DH10b. Posteriormente se transformaron células TG1, que fueron infectadas con el bacteriófago "helper M13K07". Se obtuvieron viriones recombinantes con un título de 9.8×10^8 , estos fueron utilizados para realizar una inmunocaptura con anticuerpos y una prueba de ELISA para detectar anticuerpos en suero de conejos inmunizados contra el parásito. Se concluye que la biblioteca de expresión de *F. hepatica*, expresa proteínas recombinantes que pueden ser reconocidos por anticuerpos producidos por la inoculación de antígenos somáticos.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, Biblioteca de expresión, "Phagemido".

Construction of an expression library of *Fasciola hepatica* in filamentous bacteriophage

Fascioliasis is considered to be one of the most important parasitosis in domestic ruminants. Diagnosis has been performed by coprology techniques, but these have a low sensitivity; immunology techniques such as ELISA have also been used. Control is made through the application of chemical, physical and biological methods and zootechnical handling. With the purpose of aiding to the solution of diagnosis and control, a large amount of molecular biology tools have been developed, which have allowed the development of diagnostic and prophylactic techniques with variable results. The objective of this work was the construction of a library of recombinant protein expressions that could be used in studies related to the diagnosis and prophylaxis. Total and afterwards messenger RNA of adult *Fasciola hepatica* were isolated; cDNA was synthesized and cloned into the phagomyde "Phage 3.2". The library was propagated in DH10b cells. After that TG1 cells were transformed, which were then infected with the bacteriophage "helper M13K07", and recombinant virions with a titre of 9.8×10^8 were obtained. These were used to perform an immunocapture with antibodies and an ELISA test was performed to detect antibodies in serum of rabbits immunized against the parasite. It is concluded that the expression library of *F. hepatica*, expresses recombinant proteins that may be recognized by antibodies produced by the inoculation of somatic antigens.

Keywords: *Fasciola hepatica*; expression library; phagomyde.

CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN DE *Fasciola hepatica* EN BACTERIÓFAGOS FILAMENTOSOS.

I INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La fasciolosis conocida también como distomatosis hepática, es una enfermedad parasitaria debida a la presencia y acción de *Fasciola hepatica* (Figura 1), trematodo que se aloja en los conductos biliares de bovinos, ovinos, caprinos, cerdos, equinos, animales silvestres y el hombre (Ibarra, 2000). La clasificación taxonómica de este parásito es la siguiente (Quiroz, 1999):

PHYLUM: PLATYHELMINTHES

CLASE: TREMATODA

SUBCLASE: DIGENEA

FAMILIA: FASCIOLIDAE

GENERO: *Fasciola*

ESPECIE: *F. hepatica*

1.2 MORFOLOGIA Y CICLO BIOLÓGICO

F. hepatica es un trematodo hermafrodita de forma foliácea, posee dos ventosas y un tegumento cubierto por múltiples espinas (Quiroz, 1999). El ciclo de vida es indirecto por lo que necesita invariablemente de dos huéspedes para completar su desarrollo; ocupa a mamíferos herbívoros como huéspedes definitivos y como intermediarios a caracoles anfibios de los géneros *Lymnaea*, *Fossaria* y *Pseudosuccinea* (Olaechea, 1992).

El parásito una vez fecundado llega a producir hasta 20,000 huevos por día; éstos son arrastrados por la bilis hasta el duodeno y son evacuados con la materia fecal. En el suelo, en un medio hídrico, se desarrolla el miracidio que busca y se introduce en el caracol, dentro de éste se desarrollan esporocistos, redias y cercarias. Como resultado de una infección exitosa de un miracidio se

producen de 400 a 1000 cercarias; estas abandonan el caracol y se enquistan en el pasto, la metacercaria o fase infectante la ingieren los huéspedes definitivos. En el estómago e intestino se libera del quiste y se origina la adolecercaria, fase inmadura temprana que comienza una migración que termina en los conductos biliares (Malone, 1986) (Figura 2). El período de prepatencia mínimo en bovinos es de 56 días (Boray, 1969).

1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SANITARIA

La fasciolosis es una enfermedad de distribución mundial y es considerada como una de las más importantes parasitosis en los rumiantes domésticos (Boray, 1969).

En México se ha notificado la enfermedad en 27 estados de la República y el Distrito Federal; se considera a Baja California Sur, Campeche, Quintana Roo y Yucatán, como libres de la enfermedad por tener condiciones ecológicas desfavorables para el establecimiento de los huéspedes intermediarios (Quiroz, 2000).

Las prevalencias observadas en esta enfermedad, dependen del período estudiado y la técnica diagnóstica empleada; sin embargo, estudios en rastro permiten observar una tendencia a incrementar el número de animales infectados (Castellanos *et al*; 1992).

En la ganadería la importancia de la fasciolosis radica en las pérdidas económicas que causa, éstas pueden ser clasificadas como directas e indirectas (Malone y Craig, 1990). Boray (1985) calcula en dos mil millones de dólares, las pérdidas anuales derivadas de la infección por el trematodo sobre bovinos y búfalos en todo el mundo.

Otro aspecto de importancia son los 2.4 millones de personas infectadas en el mundo, localizadas principalmente en Bolivia, Perú, Egipto, Portugal y China (Rim *et al.*, 1994).

1.4 DIAGNÓSTICO Y CONTROL

El diagnóstico de la fasciolosis puede realizarse por diversos medios y también diferentes momentos de la infección.

La observación clínica es de poca ayuda, debido a que la presentación de signos es hasta la etapa crónica y con características inespecíficas, fácil de confundir con otras entidades infecciosas (Olaechea, 1992).

Las técnicas coprológicas, en las que se identifica el huevo del parásito, han sido bastante utilizadas desde hace tiempo, en general se usa el principio de sedimentación; la sensibilidad de esta prueba es de 66% en un solo examen, sin embargo en una serie de tres se eleva al 90% y la especificidad de 100%; pese a esto se enfrentan problemas como: la necesidad de experiencia del técnico, se requiere de tiempo para procesar individualmente cada muestra y la liberación de huevos dependiente del desarrollo del parásito (Anderson *et al.*, 1999).

El diagnóstico coprológico en bovinos puede realizarse hasta las 8 ó 10 semanas post-infección (Hillyer, 1993), es después de este tiempo cuando se encuentran los trematodos adultos dentro de los conductos biliares; sin embargo, el mayor daño al hígado de los animales infectados esta dado por las fases juveniles en migración presentes en los primeros días. Como alternativa al problema se ha propuesto el uso de enzimas como glutamato deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa (Sandeman y Howell, 1981) y gamma glutamil transpeptidasa (Faria *et al.*, 1989) en el suero, pese a que en el período de mayor daño la elevación en los niveles de estas enzimas es significativa, solo han servido como indicadores de daño hepático y no de la presencia específica del parásito.

Las pruebas inmunológicas han sido utilizadas para la detección del parásito con diferentes resultados, como ejemplo la prueba ELISA para detección de antígenos de excreción y secreción, éstos son los primeros en provocar una respuesta inmune (Espino *et al.*, 1990; Castro *et al.*, 1994). Este tipo de inmunodiagnóstico permite la detección de anticuerpos contra el trematodo, la prueba tiene una sensibilidad de 86% y una especificidad de 70% utilizando antígenos del parásito completo (Anderson *et al.*, 1999). Las pruebas inmunológicas representan un medio más adecuado para la identificación de animales infectados en comparación con el hallazgo de huevos en las heces (El-Bali *et al.*, 1992). El principal problema para la estandarización de pruebas de tipo inmunológico, es la pureza de antígenos con los cuales se detectan los anticuerpos circulantes.

Debido al tipo de ciclo y la distribución de la enfermedad, para el control deben ser empleadas medidas como el manejo de pastoreo y el uso de fármacos fasciolicidas (Cordero del Campillo y Rojo-Vazquez, 1999). El tratamiento químico, es el medio más usado para el control de la parasitosis; y el triclabendazol el fármaco con el mayor número de ventajas, por lo tanto una buena opción; pero a pesar de esto, al igual que otros compuestos, el uso frecuente da origen a problemas de resistencia (Lammert *et al.*, 2000).

Con el objetivo de superar los múltiples problemas que enfrenta el diagnóstico y control de esta, y otras enfermedades parasitarias se han utilizado técnicas de biología molecular aplicadas a la parasitología.

1.5 RESPUESTA INMUNE A *F. hepatica*

La respuesta inmune que provoca *F. hepatica* depende de la especie de huésped al que se encuentre afectando (Sandeman y Howell, 1981), es así como se establece una clasificación de acuerdo a la resistencia que presentan a la

infección del trematodo, ésta se considera alta en los cerdos, media para bovinos, equinos, ratas y humanos; y baja en ovinos y ratones (Bautista, 1997). La explicación dada a este fenómeno aparentemente esta dada por condiciones de estructura, con relación directa a la cantidad de tejido fibroso que rodea al hígado de los animales en cuestión (Oldham, 1985). Otro aspecto en la resistencia a *F. hepatica* es la calcificación de conductos biliares, este proceso es importante sobre todo en infecciones recurrentes en el caso de los bovinos, no así en los ovinos donde esto no se presenta; para este caso en particular de bovinos y ratas más que deberse a un mecanismo inmune, la resistencia en las reinfecciones se explica como una inaccesibilidad de los parásitos a los conductos biliares (Goose y McGregor, 1973).

La confrontación del huésped y el parásito comienza cuando la fasciola inmadura temprana atraviesa la pared intestinal, es en este momento cuando el tejido linfoide asociado a mucosas reconoce antígenos del parásito y monta una respuesta (Bautista, 1989).

Para un mejor entendimiento de la inmunidad adquirida y el daño provocado por el parásito, el modelo de la respuesta en bovino se ha dividido en diferentes etapas (Bautista, 1997): En la etapa 1 se presenta el primer estímulo antigénico, aumentan los niveles de anticuerpos IgM y en menor grado los IgG, comienza la invasión hacia el hígado lo que provoca el aumento en los niveles de la enzima sorbitol deshidrogenasa; esta etapa abarca las tres semanas post-infección. La etapa 2 ocurre de la tercera a la quinta semana post-infección, en este momento se elevan los anticuerpos IgG específicos anti-*Fasciola* y aumenta la cantidad de enzima glutamato deshidrogenasa mostrando daño importante a la estructura hepática. En la etapa 3 disminuyen los títulos de anticuerpos IgG y actividades enzimáticas. La enzima hepática aspartato aminotransferasa disminuye significativamente. Se describe una disminución en las secreciones hechas por el parásito; este período abarca la quinta y sexta semana post-

infección. En la etapa 4 los parásitos llegan a los conductos biliares, existe un aumento en la cantidad de sustancias secretadas, los conductos son obstruidos y se incrementa la producción de gamma glutamil transpeptidasa; esta etapa se extiende hasta la octava semana post-infección. La etapa 5 ocurre de la octava a la décimo segunda semana, en este momento aumentan los niveles de IgG1 e IgA, aparecen agregados importantes de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas en el epitelio de los conductos biliares. En este período se exhiben los principales signos clínicos de la enfermedad.

En la respuesta humoral de bovinos hacia *F. hepatica* se observa una marcada predominancia de IgG1 sobre las IgG2 (Duffus y Franks, 1981; Clery *et al.*, 1996) lo cual coincide con la respuesta de los rumiantes a otras infecciones por helmintos (Schalling *et al.*, 1995). Los títulos de IgG1 tienen su pico máximo entre la semana 8 y 10 posteriores a la infección, luego se da un descenso lento en esta inmunoglobulina. Los niveles de IgE en bovinos infectados con el parásito también muestran un aumento; sin embargo aun no existen datos exactos sobre la cinética de este isotipo. Kendall *et al.*, (1978) realizan estudios en los cuales observan aumento en los niveles séricos del anticuerpo; pero no encuentran relación entre estos niveles y el número de parásitos en el hígado.

Se han realizado un número de experimentos para evaluar la respuesta proliferativa de linfocitos circulantes en sangre, y se ha observado que ante el estímulo dado por antígenos del trematodo, la respuesta proliferativa aumenta con un patrón similar al de anticuerpos IgG1; pero en este caso dicho aumento en la respuesta proliferativa si esta en relación con el número de trematodos en el hígado (Clery *et al.*, 1996; Mulcahy *et al.*, 1998).

Otros estudios han descrito la respuesta inmune celular en los bovinos a partir de las células y citocinas que son estimuladas cuando el parásito esta presente. Brown *et al.*, (1994) señalan que las células CD4+ son las más

importantes en una infección crónica en bovinos, por otro lado se ha demostrado que en individuos con infección aguda por el trematodo, las células CD4+ y CD8+ aumentan en su proporción de linfocitos en sangre periférica. Clery y Mulcahy (1998) realizaron un trabajo en el que describen la cinética de la citocina Th1 IFN γ , la cual puede ser detectada en forma elevada en sangre periférica entre la semana 2 y 5 post-infección, transcurrido este tiempo la producción baja lentamente. En este mismo trabajo se describe la detección de RNAm (Ácido ribonucleíco mensajero) de la citocina Th2, IL4 en linfocitos de linfonódulos hepáticos, esta citocina aumenta paralelamente con la infección, en este trabajo utilizan como comparativo linfonódulos preescapulares. Los autores mencionan que la respuesta en etapas tempranas de la infección no es polarizada en la producción de citocinas.

1.6 APLICACIONES DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN PARASITOLOGÍA

La biología molecular, es una de las disciplinas que en los últimos años ha destacado en la parasitología por su gran número de aplicaciones, entre las que se cuentan el estudio de mecanismos de infección, patogenicidad, inmunidad y diagnóstico, así como el origen y evolución de patógenos.

Un uso dado a las técnicas de biología molecular en *F. hepatica*, es el estudio de diversidad genética, Blair y Mc Manus (1989) realizaron mapas con enzimas de restricción que permiten distinguir entre las especies *F. hepatica* y *F. gigantica*.

En el caso de *F. hepatica* se han efectuado diversos trabajos entre los que se cuenta la identificación de enzimas con efecto proteolítico, que con su acción permiten procesos claves como la penetración y migración en tejidos (Heussler y Dobbelaere, 1994; McGonigle *et al.*, 1997; Dowd *et al.*, 1977; Solocture *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 2004; Harmsen *et al.*, 2004); y algunas de ellas se han identificado

como fuertes inductoras de la respuesta inmune (Wedrychowicz *et al.*, 2003; Law *et al.*, 2003).

McGonigle *et a.*, (1997) identificaron una molécula de peroxirredoxina, que permite evadir mecanismos inmunes con acción citotóxica a través de componentes oxidativos.

A partir de una biblioteca de cDNA (Ácido desoxirribonucleico complementario), Dowd *et al.*, (1977) identificaron y caracterizaron una catepsina, analizaron su efecto proteolítico y su importancia en la degradación de tejidos en la migración del parásito.

Diferentes proteínas secretadas por el parásito, con efecto carcinogénico fueron identificadas en diversos trabajos donde la biología molecular es una herramienta básica (Solocture *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1998a).

Algunas técnicas moleculares permiten conocer la expresión de genes en estadios específicos del parásito con el fin de establecer relaciones inmunes y patológicas con el huésped (Reed *et al.*, 1998b).

Aspectos básicos de la biología del parásito como la infección a los caracoles (Mostafa *et al.*, 2003) y la nutrición, pueden ser estudiados mediante técnicas de manipulación de ácidos nucleicos. Marín *et al.*, (1992) localizaron una proteína altamente antigénica en el intestino del trematodo, dicha proteína juega un papel muy importante en la alimentación y podría ser detectada por ensayos serológicos para un mejor diagnóstico.

1.7 BIBLIOTECAS DE EXPRESIÓN GENICA.

Un recurso importante en la parasitología molecular es la disponibilidad de bibliotecas de expresión génica de los patógenos. Estas consisten en colecciones

de clonas que representan y expresan proteínas que son producidas por el parásito en diferentes condiciones (Reed *et al.*, 1998b).

Las bibliotecas de expresión se construyen a partir de la purificación de los RNA (Ácido ribonucleico) mensajeros del parásito, su síntesis a DNA (Ácido desoxirribonucleico) complementario (Das *et al.*, 2001) y su clonación en vehículos adecuados (Christensen, 2001) que expresen los mensajes genéticos como proteínas recombinantes.

Dentro de los vehículos ocupados para la elaboración de bibliotecas de expresión se cuenta con plásmidos, que son unidades que existen en la célula como genomas extracromosómicos, circulares y autorreplicantes; los bacteriófagos lambda (λ), los cuales pueden estar organizados en genomas de cadena doble o simple, tienen un genoma restringido a la capacidad de empacamiento y se perpetúan en ciclos líticos o lisogénicos; y más recientemente se han ocupado “phagemidos” que son estructuras derivadas de M13 (Lewin, 2001).

La importancia de las bibliotecas de expresión consiste, en que son una fuente de antígenos recombinantes importantes, que pueden ser empleados en el diagnóstico y la profilaxis a través de vacunas (Wawrzyniec *et al.*, 2000; Smooker *et al.*, 2001).

1.8 SISTEMA “PHAGE DISPLAY”.

Para este propósito se usa el sistema “EZnet™ phage display cDNA library” (MaximBiotech, 1999) que utiliza un “phagemido” derivado de M13 (Figura 3), ésta es una estructura de DNA monohebra circular, organizados en 11 genes (Rhyner *et al.*, 2002), con un gen de resistencia a ampicilina, un gen Lac, un sitio de clonación en la región intergénica del gen III y un origen de replicación F.

Este “phagemido” es transformado en células TG1 supresoras del codon ambar y posteriormente son infectadas con un bacteriófago “helper” el cual transporta la información del “phagemido” en forma de virion recombinante; este bacteriófago superinfecta a las células HB2151 que al ser inducidas con IPTG (Isopropil β -D-thiogalactosidasa) exporta proteínas recombinantes al espacio periplasmático de la bacteria.

El sistema de “phage display” tiene la característica de aceptar insertos de un amplio rango en su tamaño (500 pb a 3,000 pb); es un sistema de clonación de rápida aplicación y permite el tamizado de tipo inmunológico en dos momentos, uno llamado “panning” (inmovilización con anticuerpos) con la identificación de viriones recombinantes que exponen proteínas en sus filamentos extremos y un segundo tamizado de proteínas expuestas en el espacio periplasmático de las células HB2151, a las cuales no es necesario lisar (MaximBiotech, 1999; Rhyner *et al.*, 2002).

Existen dos descubrimientos claves para el desarrollo de la técnica de “phage display”. Primero la demostración que el DNA foráneo puede insertarse dentro del gen III y es expresado como proteína de fusión en los filamentos del bacteriófago. Segundo, la expresión de la información suplementada con el inserto, la cual se da como una proteína exportada hacia el espacio periplasmático en la cepa bacteriana de *E. coli* (Hassan *et al.*, 2002). Este sistema de expresión puede ser tamizado utilizando la interacción antígeno-anticuerpo o proteína ligando; de esta manera es posible identificar epítopos expresados de manera recombinante, con anticuerpos específicos monoclonales o policlonales dirigidos (Hassan *et al.*, 2002).

1.9 JUSTIFICACIÓN

La elaboración de una biblioteca de expresión de *Fasciola hepatica*, permitirá contar con una fuente de material biológico, para la identificación de genes que codifiquen para proteínas de importancia en el diagnóstico y la inmunización de la fasciolosis, así como para entender más sobre la biología del parásito.

1.10 OBJETIVO GENERAL

Establecer herramientas moleculares, que permitan identificar antígenos de *F. hepatica* importantes en estudios sobre diagnóstico, profilaxis y biología del trematodo

1.11.-OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Construir una biblioteca de expresión de *F. hepatica* a partir de organismos adultos.
- Evaluar la función y calidad de la biblioteca de expresión.

1.12 METAS

A partir de parásitos adultos purificar RNA total y posteriormente obtener RNA mensajero por columna de afinidad. Utilizar el RNA mensajero como molde para sintetizar el DNA complementario (cDNA) con oligonucleótidos al azar. Seleccionar fragmentos de cDNA sintetizado en un rango de 500 a 3,000 pb.

Purificar, digerir y desfosforilar DNA del phagemido "Phage 3.2" para prepararlo como vector de clonación. Posteriormente ligar al cDNA complementario y transformar células DH10b para propagar la biblioteca. Purificar el DNA de la biblioteca y cuantificarlo; de esta forma la biblioteca podrá ser conservada como DNA.

Con el DNA de la biblioteca transformar células TG1. Cuantificar las células recombinantes e infectarlas con el bacteriófago filamentoso "helper". Purificar los viriones recombinantes y titularlos infectando células HB2151.

Preparar antígenos somáticos del trematodo e inocularlos en conejos, con el fin de producir suero hiper-inmune. Finalmente utilizar estos sueros en pruebas de ELISA que permitan evaluar la expresión de antígenos en la biblioteca.

II MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE PARÁSITOS ADULTOS

Se realizaron visitas al rastro de Toluca, Estado de México con el objetivo de coleccionar hígados decomisados e infectados con *F. hepatica*. Dichos hígados fueron transportados al laboratorio de parasitología en donde se disectaron para coleccionar los parásitos en forma manual; posteriormente se lavaron en solución salina fisiológica, a continuación fueron incubados en medio de cultivo Hedon-Fleig para eliminar el contenido de los sacos ciegos; finalmente se conservaron a -70°C (Morilla y Bautista, 1986).

2.2 PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL

La obtención del RNA se realizó utilizando TRIZOL (GIBCO BRL), el cual es una solución de fenol e isotiocianato de guanidina.

Para la purificación del RNA total se pulverizaron 0.5 gr. de parásitos con nitrógeno líquido, posteriormente se homogeneizaron con 1 ml de TRIZOL, se incubaron 10 minutos a 4°C y se agregaron 200 μl de cloroformo. La mezcla fue agitada vigorosamente durante 15 segundos, se incubó a 4°C durante 3 minutos y luego se centrifugó a 12,000 rpm / 15 minutos a 4°C . La fase acuosa de la solución fue recuperada, enseguida fue precipitada agregando 2 volúmenes de alcohol isopropílico frío al 100%, después se incubó a -20°C durante 30 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm / 10 min. La pastilla fue recuperada y lavada con 500 μl de etanol al 70% DEPC (Dietil pirocarbonato al 0.1% en H_2O destilada); a continuación fue centrifugada a 12,000 rpm / 10 minutos, el alcohol se decantó y finalmente la pastilla se resuspendió en 100 μl de H_2O DEPC. La solución se conservó a -70°C para posteriormente cuantificarla.

2.3 CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

Con el objeto de determinar la cantidad de RNA total obtenido, se realizaron diluciones 1:100 en H₂O DEPC, a las que se les midió la absorbancia a 260 nm y 280nm en un espectrofotómetro (PERKIN ELMER, LAMBDA BIO). La relación entre la lectura de 260 nm y 280 nm indicó el nivel de pureza del RNA total (Sambrook *et al.*, 1990).

Se utilizó la siguiente fórmula para determinar la cantidad de ácido nucleico:

$$\text{RNA total} = (A_{260}) (40\mu\text{g/ ml/ } A_{260}) (100) (1 \text{ ml})$$

Donde:

A_{260} = Absorbancia de la solución a 260 nm

40 $\mu\text{g/ ml/ } A_{260}$ = Factor de conversión

100 = Factor de dilución

1 ml = Volumen total cuantificado

La relación entre 260 nm y 280 nm, se obtuvo por el cociente de las lecturas 260 nm / 280 nm (Sambrook *et al.*, 1990).

Para evaluar la integridad del RNA total de *F. hepatica*, fue corrido electroforéticamente en un gel de agarosa TBE (Tris-borato, 0.09M, EDTA 0.002M) al 1%, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) (Sambrook *et al.*, 1990).

2.4 PURIFICACIÓN DEL RNA MENSAJERO

El RNAm se purificó por columna de afinidad empleando oligo dT celulosa.

Para el aislamiento del RNA mensajero se utilizaron 500 mg de oligo dT celulosa (Stratagene TM) lavados inicialmente con NaOH 0.1N, posteriormente con H₂O DEPC hasta alcanzar un pH de 7 y finalmente con una solución alta en sales (0.5M NaCl, 10mM Tris HCl pH 7.4 y 0.1% Sarcosyl). La muestra de RNA total (500 μg) se mantuvo a 65°C durante 10 minutos, luego se enfrió hasta alcanzar 4°C y se ajustó el volumen a 3 ml con la solución alta en sales. La muestra fue colocada en la columna que contenía la matriz de oligo dT, se colectó una primera

fracción, a continuación la columna fue lavada con la solución buffer alta en sal (7 ml), y se recuperó una segunda fracción; enseguida se realizó un segundo lavado con una solución buffer de concentración media en sales (3.5 ml) (0.1M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.4 y 0.02% Sarcosyl) y se recuperó una tercera fracción, finalmente el RNA mensajero fue recuperado con una solución buffer sin sal (10mM Tris HCl pH 7.4 y 0.02% Sarcosyl) (Sambrook *et al.*, 1990).

2.5 CUANTIFICACIÓN DEL RNA MENSAJERO

La cuantificación se realizó en forma similar al RNA total. La lectura se hizo en las tres fracciones.

2.6 SÍNTESIS DE PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE cDNA

Para la síntesis de ambas cadenas se utilizó el kit comercial "Universal Riboclone® cDNA Synthesis System" (Universal Riboclone, 2001).

En la síntesis de primera cadena de cDNA se utilizaron iniciadores aleatorios hexaméricos mediante una transcriptasa reversa de origen del virus de mieloblastosis aviar.

Preparación de la muestra. Se tomaron 2 µg de RNA mensajero, 1 µg de iniciadores aleatorios y H₂O libre de nucleasas llevándolo a 15 µl. La reacción control fue preparada tomando la muestra control de RNA 2 µg, 1 µg de iniciadores aleatorios y H₂O libre de nucleasas en 15 µl.

Ambas muestras se mantuvieron 10 minutos a 70°C. Posteriormente se enfriaron sobre hielo por 5 minutos y se centrifugaron brevemente. Se adicionó el buffer de primera cadena 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3 a 42°C; 250mM KCl; 50 mM MgCl₂; 2.5 mM Espermidina; 50mM DTT; 5mM de dATP, dCTP, dGTP,DTTP) e inhibidor de ribonucleasas RNAsin™; las muestras fueron calentadas a 37°C por 5 minutos y se adicionó Pirofosfato de sodio 40mM, Reversa transcriptasa AMV

(origen del virus de mieloblastosis aviar) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 μ l.

Las reacciones fueron mezcladas ligeramente y se transfirieron 5 μ l de cada una a otro tubo que contenía 5 μ Ci (Micro Curies) de dATP [α - 32 P], para monitorear la síntesis. Las cuatro muestras (marcadas y no marcadas) se incubaron 60 minutos a 37°C, posteriormente fueron mantenidas en hielo. A dichas muestras con marca se adicionaron 95 μ l de EDTA 50 mM y se conservaron sobre hielo. Para la síntesis de segunda cadena se utilizaron las muestras no marcadas.

La incorporación del fósforo radiactivo se midió con un contador de centelleo. El producto de las reacciones se filtró a través de una columna de sepharosa G-50, y se midió el centelleo antes y después del filtrado. Para calcular el porcentaje de incorporación del elemento radiactivo se aplicó la siguiente fórmula (Technical Manual, 2001):

$$\text{(Cpm después / cpm antes) X 100 \% = Incorporación de la primera cadena}$$

Cpm = cuentas por minuto.

La muestra de reacción se corrió electroforéticamente en un gel de agarosa alcalina al 1%, para visualizar la síntesis lograda. El gel fue secado y posteriormente expuesto a una radiografía por 12 días. Posteriormente se reveló y se observaron las bandas de cDNA de primera cadena sintetizado.

En la reacción de síntesis de segunda cadena para la reacción de interés y la control, se agregaron, buffer de segunda cadena 2.5X (100 mM Tris HCl pH 7.2; 225 mM KCl; 7.5 mM MgCl₂; 7.5 mM DTT), BSA acetilado 0.05 μ g/ μ l, DNA polimerasa I 0.23 U/ μ l; RNAsa 0.008 U/ μ l y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 100 μ l. Esta mezcla fue homogeneizada suavemente y se adicionaron

5 μCi de dATP [α - ^{32}P] para monitorear la reacción de síntesis, tanto en la muestra control como en la muestra de interés.

El producto de las reacciones se filtró a través de una columna de sepharosa G-50, y se midió el centelleo antes y después del filtrado. Para calcular el porcentaje de incorporación del elemento radiactivo se aplicó la siguiente fórmula:

$(\text{Cpm después del filtrado} / \text{cpm antes del filtrado}) \times 100 \% = \text{Incorporación de la segunda cadena}$

Cpm = cuentas por minuto.

Posteriormente el cDNA de doble cadena fue tratado con 4 unidades de T4 DNA polimerasa (2 unidades por cada microgramo de RNA utilizado originalmente), la mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C . La reacción se detuvo adicionando $10 \mu\text{l}$ de EDTA 100 mM y se mantuvo sobre hielo.

El cDNA fue extraído usando un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, la reacción se mezcló enérgicamente y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo, se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 2.5 M, pH 5.2, se mezcló y se agregaron 2 volúmenes de etanol 100% frío. Se mantuvo a -70°C por 30 minutos y se centrifugó al tope de velocidad por 10 minutos. Cuidadosamente se removió el sobrenadante y se agregaron 0.5 ml de etanol 70% a -20°C . Nuevamente se centrifugó por 5 minutos. El sobrenadante fue removido y la pastilla se secó con calor. Finalmente la pastilla fue resuspendida en $50 \mu\text{l}$ de buffer TE.

2.7 FRACCIONAMIENTO DEL DNA

El producto final de la anterior reacción fue corrido electroforéticamente en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Con ayuda de un

transiluminador se cortó una banda completa que abarcó todos los fragmentos posibles desde 500 pb (Pares de bases) hasta 3000 pb, el fragmento se calentó a 65°C, hasta que la agarosa se disolvió, a continuación se agregaron dos volúmenes de fenol saturado, se agitó fuertemente y se centrifugó 10 minutos a 4,500 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una nueva extracción con fenol-cloroformo-alcohol-isoamílico (Proporción 24:25:1). El DNA fue precipitado con 3 µl de glicógeno (10 mg/ml), acetato de sodio (pH 5.3) a una concentración final de 0.3M y 2 volúmenes de etanol puro, se incubó 30 minutos a -20°C. Finalmente se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm, se recuperó la pastilla y se resuspendió en 100 µl de agua estéril (Sambrook *et al.*, 1990).

El cDNA fue diluido 1:1000 en buffer TNE (Tris-Cl 0.1M pH 8, EDTA 0.01M pH 8, NaCl 1M) y colorante de Hoechst (33258) y se cuantificó con un fluorómetro, previo a la clonación.

ACTIVIDADES PREVIAS A LA CLONACIÓN

2.8 PREPARACION DEL VECTOR "PHAGE 3.2"

La purificación del "phagemido" fue por medio del "kit" comercial (QUIAGEN, MEGAKIT), a través de una membrana de intercambio iónico.

La cuantificación del "phagemido" obtenido, fue a través de fluorometría, corroborando la integridad por un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Posterior a esto se realizó la digestión del "phagemido" con la enzima EcoRV, se utilizaron 2 unidades de la enzima por microgramo de DNA a digerir. El DNA digerido fue precipitado con glicógeno, acetato de sodio 0.3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, fue incubado 30 minutos a -70°C, se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm, la pastilla fue recuperada y lavada con 200µl de etanol al 70%, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm, se secó y resuspendió en agua para tener una concentración de 200 ng/µl. Finalmente se desfosforiló utilizando fosfatasa alcalina de camarón.

2.9 EFICIENCIA DE TRANSFORMACIÓN

Con este propósito se realizaron ligaciones, utilizando 30, 60, 90 y 120ng del inserto control λ Alu, 100ng del vector digerido y desfosforilado, y DNA ligasa T4 1U/reacción. Posteriormente las ligaciones fueron transformadas utilizando 100 μ l células competentes DH10b y 30 ng del “phagemido” 3.2 ya ligado; la mezcla se incubó 30 minutos en hielo, posteriormente 1 minuto a 42°C y 2 minutos en hielo; se adicionaron 900 μ l de medio LB e incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se sembraron 100 μ l en agar-LB-ampicilina y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

De acuerdo al número de unidades formadoras de colonia (ufc) se calculó el título y se expresó como UFC (Unidades formadoras de colonia) / μ g.

2.10 PREPARACIÓN DEL BACTERIÓFAGO “HELPER” M13K07

Titulación del bacteriófago filamentoso “helper”. Se realizaron diluciones del bacteriófago desde 10^2 hasta 10^9 en medio 2XYT. De las diluciones 10^7 , 10^8 y 10^9 100 μ l fueron mezcladas con células TG1 en fase de crecimiento logarítmico y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 30 minutos, a cada mezcla de células infectadas se les adicionó 3 ml de agar bacteriológico a 47°C e inmediatamente se esparcieron en cajas de Petri con medio 2XYT agar. Las placas se mantuvieron 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente fueron incubadas toda la noche a 37°C. Para determinar el título se contaron el número de placas formadas por el bacteriófago en la capa de células de cada caja de Petri y se aplicó la siguiente fórmula (MaximBiotech, 1999):

$$\text{UFP / ml} = (\# \text{ de placas} \times \text{factor de dilución}) / (0.5 \times 0.1)$$

$$\text{UFP} = \text{Unidades formadoras de placa}$$

Propagación del bacteriófago “helper”. Esta actividad se realizó ocupando las placas previamente formadas en la titulación del bacteriófago original. Una de

estas placas fue aislada y se colocó en un tubo con 3 ml de medio 2XYT adicionado con kanamicina 100 µg /ml, esta solución fue incubada 16 horas a 37°C en agitación constante, posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 12,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se recuperó y conservó a 4°C (MaximBiotech, 1999). Los bacteriófagos propagados fueron titulados con el procedimiento ya descrito.

2.11 CELULAS TG1 Y HB2151

De un cultivo original de células TG1 y HB2151 se sembraron en placas con medio mínimo y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Se prepararon "stocks" de ambas cepas, se agregó glicerol a una concentración final de 20% y se conservaron a -80°C.

2.12 CÉLULAS COMPETENTES

Se prepararon células competentes de las cepas TG1, HB 2151 y DH10b, sembrando una colonia de cada cepa en 5 ml de LB, se incubó por 2 horas en agitación constante a 37°C, transcurrido este tiempo los cultivos se vertieron en 100 ml de medio LB y se incubaron nuevamente hasta que se obtuvo una densidad óptica (OD) de 0.5 leyendo con espectrofotómetro a 550 nm, se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en 30 ml de solución TfbI (Kac 30mM, MnCl₂ 10mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 13.3 mM, Glicerol 12%), se incubaron en hielo durante 1.5 horas y se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente fueron resuspendidas en 3 ml de solución Tfb II (MOPS, CaCl₂ 100mM, KCl 10mM, Glicerol 12%), se introdujeron en nitrógeno líquido y se conservaron hasta su uso.

2.13 CÉLULAS EN FASE LOGARÍTMICA

Se sembró una colonia de la cepa TG1 en 5ml de medio 2XYT en caldo y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm hasta que se obtuvo una OD de 0.6 en aproximadamente 6 horas.

2.14 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CLONAS REPRESENTATIVAS DEL TRANSCRIPTOMA

Para estimar el número de clonas recombinantes que fueron necesarias en la biblioteca se aplicó la siguiente fórmula (Clarke y Carbon, 1976)

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-[A/B])}$$

P = Grado de probabilidad de representación de las secuencias.

A = Tamaño de los fragmentos de DNA a clonarse.

B = Tamaño del genoma total.

N = Número necesario de clonas necesarias para representar el genoma.

Ln = Logaritmo natural.

CONSTRUCCION DE LA BIBLIOTECA.

2.15 LIGACIÓN DEL cDNA Y EL “PHAGE 3.2”

A partir de las clonas necesarias también se determinó el número de ligaciones a realizar utilizando la proporción más adecuada entre el inserto y el vector de clonación. Para dichas ligaciones se usó la enzima DNA T4 ligasa 1 U / reacción.

Con el propósito de propagar el DNA complementario las ligaciones se transformaron células DH10b, se calculó el título y el número de UFC por ml.

Una vez realizadas las transformaciones necesarias el DNA del “phagemido” fue purificado utilizando el kit comercial “Genelute endotoxin-free plasmid midiprep kit™” (SIGMA). El DNA obtenido fue cuantificado y conservado a -20°C.

2.16 OBTENCIÓN DE LOS VIRIONES RECOMBINANTES

Se emplearon 50 ng del “phagemido” purificado con el que fueron transformados 100 µl de células competentes TG1, enseguida se agregó medio

líquido 2XYT conteniendo 2 % de glucosa y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación constante a 250 rpm. Se plaquearon 100µl de la transformación para determinar la eficiencia con que esta ocurrió, al resto de la solución se le agregó ampicilina a una concentración final de 100 µg / ml e incubó por 6 horas más a 37°C. Transcurrida la incubación se adicionaron 9 ml más de medio 2XYT con 2% de glucosa, ampicilina 100 µg / ml y 100 µl de bacteriófago “helper” con un título de 10¹⁰ UFP/ml, esta mezcla fue incubada 2 horas a 37°C. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 1,600 rpm x10 min. y se retiró el sobrenadante. La pastilla obtenida fue resuspendida en 10 ml de medio 2XYT con ampicilina 100 µg / ml y kanamicina 100 µg / ml, la solución fue incubada por 20 horas a 37°C y agitación de 500 rpm. Enseguida se centrifugó a 8000 rpm x 20 min, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó con las mismas condiciones. El sobrenadante se conservó a 4°C éste contenía los viriones recombinantes.

2.17 TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA

Con los viriones recombinantes se infectaron células TG1 y HB2151. Se prepararon diluciones de la biblioteca en viriones de 10² hasta 10⁹, de las diluciones 10⁶, 10⁷, 10⁸ y 10⁹ fueron tomados 100 µl los cuales se mezclaron suavemente con 100 µl de cada una de las cepas bacterianas en fase de crecimiento logarítmico y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Usando una pipeta “Pasteur” se sembraron los 200 µl en cajas de Petri con 2XYT agar-ampicilina, se esperó hasta que el líquido se absorbió y enseguida se colocaron en una estufa de cultivo a 37°C donde fueron incubadas por toda la noche. Se determinó el título contando el número de UFC / ml en cada una de las cepas.

EVALUACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN

2.18 PORCENTAJE DE CLONAS RECOMBINANTES

Para la determinación del porcentaje de clonas recombinantes se diseñaron iniciadores para la amplificación del sitio múltiple de clonación, se estandarizó la

prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se aplicó a las clonas recuperadas y de acuerdo al tamaño de los fragmentos amplificados se determinó el porcentaje de recombinantes, tanto en las células TG1 como en las HB2151 infectadas con los viriones recombinantes.

2.19 OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS SOMÁTICOS DE *F. hepatica*

Se colectaron parásitos adultos directamente de hígados infectados, estos fueron lavados con solución salina fisiológica (SSF) y posteriormente se maceraron en nitrógeno líquido, se sonicaron (4°C, 10% amplitud, 9 segundos por pulso, períodos de 5 segundos de descanso), posteriormente se homogeneizaron en un homogeneizador con RIPA (Murray, 1990) (50mM Tris HCl pH 7.4-8.0, 150mM NaCl, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 1% Triton x-100, 1 mM PMSF), se agregó penicilina G sódica (1000,000 UI) y estreptomicina (1g); finalmente la proteína fue cuantificada por el método de Bradford (Morilla, 1986) ya antes mencionado .

2.20 OBTENCIÓN DE SUERO HIPER-INMUNE ANTI-*F. hepatica*

Para obtener suero hiper-inmune anti-*F. hepatica* se inocularon 3 conejos de raza Nueva Zelanda de 2 kg, se empleó el antígeno somático del trematodo en estudio, el inóculo se aplicó con adyuvante completo e incompleto de Freund, con un intervalo de 7 días, posteriormente se administró tres veces sólo y a los 35 días se colectó el suero en su totalidad (Cuadro 1); para titular dicho suero hiper-inmune se empleó la técnica de ELISA. Se calculó un punto de corte sumando 2 veces la desviación estándar de las lecturas pre-inoculación y se determinó el título en la dilución con la que se interceptó el punto de corte y las diluciones post-inoculación.

2.21 “PANNING” (INMOVILIZACIÓN LOS VIRIONES RECOMBINANTES)

Para realizar el panning se diluyó el antisuero anti-*F. hepatica* de conejo 1:50 en PBS 1X (Solución amortiguadora de fosfatos) y se colocaron 50 µl de la

dilución en 6 pozos de una placa para ELISA; se incubó toda la noche a 4°C. Se lavó cada pozo con 200 µl de PBS 1X 5 veces por 2 minutos. Se adicionaron 350 µl de PBS 1X/BSA (Albúmina sérica bovina) 0.1% a cada pozo y se incubó 1 hora a 37°C, posteriormente se lavó de la misma manera que en el paso anterior. Se diluyó la biblioteca 1:60 en PBS 1X / BSA 0.1%, se agregaron 100 µl en cada pozo y se incubó por 2 horas a 4°C con agitación constante. Transcurrida la incubación se lavó como en los pasos anteriores. Se agregaron nuevamente 350 µl de PBS 1X/ BSA 0.1% y se incubó a 4°C por 30 minutos. Se lavó como previamente ya se describió. Para eluir se agregaron 100 µl de glicina-HCl 0.2 M pH 2.2 en cada pozo. Se colectaron todos los eluidos en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se neutralizó con Tris 1M pH 9, 120 µl. Finalmente, se titularon los viriones recombinantes infectando células TG1 con la técnica descrita anteriormente.

2.22 PRECIPITACIÓN DE LOS VIRIONES RECOMBINANTES

A 10 ml de la biblioteca en forma de viriones se les adicionó 1,500 µl de PEG (Polietilenglicol) 20% y 2.5 M NaCl, se mezcló por inversión y se mantuvo a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a 8,000 rpm y el sobrenadante fue eliminado. La pastilla fue resuspendida en 1,000 µl de buffer TE (Murray, 1990). El bacteriófago precipitado fue cuantificado por la técnica de Bradford.

2.23 TÉCNICA DE BRADFORD PARA CUANTIFICAR PROTEÍNA

Se prepararon 100 ml de una solución de albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración final de 1 mg / ml, con esta solución se preparó una curva patrón con concentraciones desde 10 µg / ml hasta 100 µg / ml diluyendo la proteína en PBS 1X.

Preparación de la curva patrón de BSA

Se prepararon 100 ml de una solución de BSA en PBS a una concentración de 1 mg / ml. Se enumeraron 10 viales del número 10 al 100, éste número

represento la cantidad en microlitros de BSA que se colocaron dentro de cada uno, cada vial se preparó agregando PBS hasta completar 1 ml; 40 µl de cada tubo, fueron colocados en las dos primeras filas de una placa de metacrilato de 96 pozos. Con la muestra a determinar se hicieron diluciones seriadas en las siguientes filas de la placa. Para revelar se utilizaron 160 µl de una solución del reactivo de Bradford, diluido 1:5 en agua destilada en cada pozo. La placa fue incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente utilizó un lector de ELISA para determinar la absorbancia a 595 nm. (Morilla, 1986). Con las lecturas obtenidas se hizo una gráfica y mediante una regresión lineal se determinó la cantidad de proteína que contiene cada muestra.

2.24 PRUEBA DE ELISA CON VIRIONES RECOMBINANTES

Para demostrar que los viriones recombinantes expresan epítopes que pueden ser reconocidos por anticuerpos de animales infectados, se estandarizó el ELISA en la que se estableció una curva de sensibilidad, capturando anticuerpos con una placa sensibilizada a partir de la biblioteca de viriones recombinantes como antígeno.

La biblioteca fue diluida en buffer de bicarbonatos (Na_2CO_3 0.03M; NHCO_3 0.07M) a una concentración final de 5 µg / ml y se agregaron 100 µl / pozo; la placa fue incubada toda la noche a 4°C. Posteriormente la placa fue lavada 3 veces con 200 µl de PBS (Na_2HPO_4 , 0.008M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002M; NaCl, 0.15M) Tween 20 0.3% pH 7.4 / pozo. A continuación la placa fue bloqueada con 100 µl de PBS-Tween 20 0.3%-leche descremada 2% / pozo y se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavó con la forma antes mencionada. Se adicionó el antisuero diluido de forma seriada, desde 1:200 hasta 1:819,200 en PBS-Tween 20 0.3%, se incubó por 2 horas a 37°C y se lavó de la manera antes mencionada. Posteriormente se colocaron 100 µl del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, diluido en PBS-Tween 20 0.3%, enseguida la placa fue lavada 3

veces. Se agregaron 4 μg de OPD (o-Fenilenediamina dihidroclorido) como sustrato mezclado con citrato de sodio (0.1M) y ácido cítrico (0.1M) y peróxido de hidrógeno 30%, 100 μl / pozo y se incubó en la oscuridad por 15 minutos. La reacción fue detenida con 50 μl / pozo de H_2SO_4 (2N) y la absorbancia fue leída en un espectrofotómetro lector de ELISA a 492 nm de longitud de onda. Los resultados fueron graficados y se estableció una curva de sensibilidad.

III.-RESULTADOS

3.1 OBTENCIÓN DE PARÁSITOS ADULTOS

Se obtuvieron 5 hígados infectados con *F. hepatica*, en total se obtuvieron 278 especímenes completos que fueron congelados a -70°C .

3.2 PURIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

Con las técnicas descritas previamente en el protocolo para la purificación de RNA se obtuvieron 11.1 mg de RNA total de *F. hepatica* en 2 reacciones (Cuadro 2). , y se calculó una relación 260 nm / 280 nm de 1.6 y 1.3

Paralelamente fue realizado un gel de agarosa 1% con solución amortiguadora TBE y se observó la integridad del RNA total obtenido (Figura 4).

3.3 PURIFICACIÓN DE RNA MENSAJERO

De la purificación de RNA mensajero se obtuvieron 55.44 μg en 3 reacciones (Cuadro 3). Los tubos que contenían el RNAm fueron almacenados a -70°C .

3.4 SÍNTESIS DE PRIMERA Y SEGUNDA CADENA DE cDNA

Los resultados obtenidos de la síntesis de cDNA en cuatro reacciones y de acuerdo a la incorporación de dATP [α - ^{32}P] muestran porcentajes que van desde 5.36 hasta 11.65. La reacción control tuvo una incorporación de 15.3% (Cuadro 4).

A continuación las muestras fueron corridas en un gel de agarosa alcalina al 1%, una vez concluido el recorrimiento electroferético, el gel fue expuesto a una radiografía en un "casset" con dos pantallas durante 12 días (Figura 5).

La incorporación del elemento radiactivo dATP [α - ^{32}P], en la síntesis de segunda cadena, se midió de la misma forma y se encontraron porcentajes de

incorporación de 52 a 65% y la reacción control incorporó en 67% el elemento radiactivo (Cuadro 5).

3.5 FRACCIONAMIENTO DEL cDNA

El cDNA obtenido en las cuatro reacciones fue fraccionado con el procedimiento previamente descrito, se obtuvieron todos los fragmentos de 500 a 3000 pb y se cuantificaron utilizando un fluorómetro (DyNa Quant 200, Hoefer). De las 4 reacciones realizadas se obtuvieron 1,650 ng de DNA (Cuadro 6). Una vez cuantificadas cada una de las muestras se conservaron a -40°C , hasta su clonación.

ACTIVIDADES PREVIAS A LA CLONACIÓN

3.6 PURIFICACIÓN DEL “PHAGEMIDO”

Este proceso fue realizado por medio del “kit” comercial (QUIAGEN, MEGAKIT), a través de una membrana de intercambio iónico, de acuerdo al protocolo establecido en el manual de dicho “kit”, se cuantificó por fluorometría obteniéndose una concentración de $105\text{ ng}/\mu\text{l}$ y se tuvieron 1.575 mg totales.

3.7 DIGESTIÓN DEL “PHAGEMIDO” CON LA ENZIMA EcoR V

Del “phagemido” obtenido, $100\ \mu\text{g}$ fueron digeridos con la enzima EcoRV e incubados a 37°C durante 48 horas (Cuadro 7). Posteriormente se transformaron células DH10b para determinar su título.

3.8 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DH10b

Para la transformación se utilizaron $100\ \mu\text{l}$ células competentes DH10b y $1.5\ \mu\text{l}$ del “phagemido” 3.2 digerido (50 ng). Por el número de unidades formadoras de colonia (UFC) se determinó que el título fue de 1×10^3 .

3.9 PRECIPITACIÓN DEL “PHAGE 3.2”

El DNA digerido fue precipitado con glicógeno y se obtuvo una concentración final de 200 ng / μ l.

3.10 DESFOSFORILACIÓN DEL “PHAGE 3.2”

El “phagemido 3.2” fue desfosforilado con fosfatasa alcalina de camarón (FAC). La concentración final obtenida fue 100 ng / μ l (Cuadro 8). La reacción se realizó en un termociclador (PCR express, Hybaid), las condiciones fueron 1 hora a 37°C y 15 minutos a 65°C.

3.11 LIGACIÓN DEL “PHAGE 3.2” CON UN INSERTO CONTROL.

Con el fin de evaluar la capacidad del vector de clonación se realizaron ligaciones con un inserto control (λ Alu) en 30, 60, 90 y 120 ng, además de reacciones con ligasa y sin ligasa (Cuadro 9). Los títulos obtenidos en los diferentes puntos estuvieron siempre en el orden de 10^5 (Cuadro 10).

BACTERIÓFAGO “HELPER” M13K07

3.12 TITULACIÓN DEL BACTERIÓFAGO FILAMENTOSO “HELPER”.

El bacteriófago filamentoso “helper” (M13K07) fue titulado de acuerdo al protocolo previamente establecido (Cuadro 11).

El título obtenido en el bacteriófago “helper” original fue 8.1×10^{10} . Las placas se conservaron a 4°C para la propagación del bacteriófago “helper”.

3.13 PROPAGACIÓN DEL BACTERIÓFAGO FILAMENTOSO “HELPER” (M13K07)

La propagación del bacteriófago “helper” fue realizada a partir de las placas previamente obtenidas y después se obtuvieron títulos en los rangos de 10^{12} y 10^{14} . (Cuadro 12).

Los tubos que contenían el bacteriófago "helper" se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso.

3.14 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Las células competentes fueron preparadas de las cepas TG1, HB2151 y DH10b. Los títulos obtenidos después de transformar con 50 ng del inserto control λ Alu fueron de 2.1×10^5 para TG1, 3.5×10^5 en HB2151 y 5.6×10^6 para DH10b.

3.15 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CLONAS

Debido a la escasa información acerca del genoma de *F. hepatica*, los datos utilizados en la fórmula fueron los del trematodo *Schistosoma japonicum*, el tamaño de genoma fue de 130 MB, el tamaño promedio de los fragmentos fue de 5.9 Kb y el grado de probabilidad con el que se trabajó fue de 99%. Sustituyendo estos valores y aplicando la fórmula se determinó que el título necesario fue de 6.0×10^5 .

CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN

3.16 CLONACIÓN DEL cDNA DE *F. hepatica*

Una vez calculado el número de clonas necesarias y el título obtenido del vector con un inserto control, se realizaron las ligaciones necesarias para obtener las unidades formadoras de colonias (UFC) requeridas, luego fueron transformadas con células competentes DH10b y sembradas en medio LB ampicilina. Se incubaron toda la noche y se recuperaron al día siguiente, utilizando buffer TE (Tris, EDTA) para resuspenderlas. El DNA del "phagemido" fue purificado utilizando el kit comercial "Genelute endotoxin-free plasmid midiprep kit™" (SIGMA). Este DNA fue cuantificado y se obtuvo una concentración de 106 ng / μ l. Finalmente se corrió electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 6).

3.17 OBTENCIÓN DE VIRIONES RECOMBINANTES

Con células competentes TG1 fueron transformados 50 ng del “phagemido” purificado y se desarrolló todo el sistema “phage display” hasta obtener los viriones recombinantes con un título de 9.8×10^8 UFC.

La titulación de la biblioteca en viriones fue realizada también infectando células HB2151 en fase logarítmica. Con esta cepa el título alcanzado fue 8.0×10^9 .

EVALUACIÓN DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN

3.18 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CLONAS RECOMBINANTES

Para este proceso fueron diseñados los iniciadores: Delantero 5'-CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG -3' y Reverso 5'-CCT CAT AGT TAG CGT AAC GA -3'; estos iniciadores amplificaron un fragmento de 294 pb que incluía el sitio múltiple de clonación. Se estandarizó la prueba de PCR (Cuadro 13) ocupando 50 colonias de cada una de las cepas con las que se tituló la biblioteca, estas fueron colocadas en tubos individuales con 60 μ l de agua y se calentaron a 95°C por 15 minutos, de esta preparación se tomaron 5 μ l como muestra de DNA después de agregarse los otros elementos fueron colocadas en un termociclador para el desarrollo de la prueba. (Cuadro 14). Las muestras fueron corridas electroforéticamente en geles de agarosa 1% en buffer TBE (0.09 M Tris-borato; 0.002 M EDTA) y teñidos con bromuro de etidio. De acuerdo a las variaciones de tamaño en comparación con el fragmento original amplificado, fueron de 42% en TG1 y 34% en HB2151 (Figura 7 y 8).

3.19 OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS SOMÁTICOS DE *F. hepatica*.

Se obtuvieron parásitos adultos y a partir de estos se purificó antígeno somático con el procedimiento ya descrito, se realizaron 3 purificaciones diferentes a las que se cuantificó la proteína por la técnica de Bradford (Cuadro 15)

Los productos obtenidos en las tres purificaciones fueron corridos electroforéticamente en un gel de acrilamida-SDS al 12 % (Figura 10).

3.20 OBTENCIÓN DE SUERO HIPER-INMUNE ANTI-*F. hepatica*.

Los antígenos somáticos obtenidos de *F. hepatica*, fueron inoculados a 3 conejos de raza Nueva Zelanda y con pesos de 2 kg a 2.5 kg. Se siguió el protocolo de inmunización ya descrito.

Los sueros de los animales inmunizados fueron titulados con la técnica de ELISA y se determinó que el título del suero hiper-inmune fue de 1:204800 (Figura 11).

3.21 "PANNING"

A partir de la biblioteca en viriones se desarrolló la técnica de inmovilización con anticuerpos, utilizando sueros anti-*Fasciola* producidos en conejos. Una vez desarrollado el "panning" se recuperaron bacteriófagos que fueron titulados como ya se ha descrito, el título obtenido fue de 1.0×10^7 .

3.22 PRECIPITACIÓN DE VIRIONES

Los bacteriófagos originales, de la biblioteca y obtenidos del panning, fueron precipitados por la adición de polietilenglicol, se cuantificaron por la técnica de Bradford y se ajustó la concentración a 10 µg/ ml.

3.23 ELISA CON VIRIONES RECOMBINANTES

Para el tamizado de la biblioteca se desarrolló la técnica de ELISA, sensibilizando la placa con los viriones precipitados de la biblioteca, y como primer

anticuerpo se utilizó el suero hiperinmune obtenido de conejos infectados con antígenos somáticos, se usaron como controles negativos bacteriófagos "helper" precipitados. Se estableció una curva de sensibilidad según la absorbancia en la lectura y un punto de corte calculado sumando dos veces la desviación estándar de las lecturas hechas del bacteriófago "helper" usado como control negativo. La curva calculada muestra niveles elevados de absorbancia que descienden gradualmente hasta interceptar el punto de corte en la dilución número 11 correspondiente a 1: 204,800 (Figura 9).

IV.-DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la síntesis de primera y segunda cadena de DNA complementario, arrojan porcentajes de incorporación del elemento radiactivo dATP [α - 32 P] de 11.65 y 65% respectivamente, lo que indica un nivel medio de incorporación pues en ninguno de los casos se alcanzaron los niveles óptimos que se recomiendan por los proveedores del sistema, estos porcentajes son de 12% para la primera cadena y de 80% para la segunda. Pese a no alcanzarse los niveles óptimos, la incorporación se considera adecuada para representar el genoma del trematodo *F. hepatica*.

Se decidió utilizar la cepa DH10b para la propagación del DNA complementario ligado al "phagemido", debido a los bajos niveles de eficiencia en las células competentes TG1; una vez propagado en células DH10b se lograron cantidades adecuadas para la transformación en la cepa TG1 supresora del codón ámbar y así desarrollar el sistema "phage display".

Los títulos obtenidos en la biblioteca fueron de 9.8×10^8 infectando células TG1 y de 8×10^9 en HB2151; niveles comparables con bibliotecas realizadas con el mismo sistema para diferentes parásitos, como el helminto *Taenia solium* con un título de 1.9×10^9 (Gazarian *et al.*, 2000) con la misma cepa bacteriana infectada por bacteriófagos "helper". Dicha situación sugiere que los títulos de la biblioteca están en un rango adecuado para la representar el transcriptoma de *F. hepatica*.

Para el cálculo del porcentaje de clones recombinantes se desarrolló la prueba de PCR en la que se encontraron 42% de recombinantes utilizando células TG1 y 34% con células HB2151; comparables con niveles de recombinantes evidenciados con la misma técnica, en una biblioteca de expresión desarrollada a partir de fibroblastos humanos se encontraron 55% de clones recombinantes en

células XL1-blue (Kemp *et al.*, 2002). Estos resultados muestran un porcentaje adecuado en la biblioteca de *F. hepatica* y solo difiere en las células usadas para la transformación.

Las bibliotecas elaboradas con este sistema de expresión pueden ser utilizada con aplicaciones clínicas como el diagnóstico específico o la generación de una respuesta inmune dirigida a bloquear antígenos claves en la migración y el establecimiento del parásito, este hecho fue demostrado con la realización del panning y posteriormente la prueba de ELISA.

Con el objeto de eliminar bacteriófagos que se producen en una replicación normal del bacteriófago “helper” se desarrolló la técnica de “panning”, se utilizó suero hiperinmune anti-*F. hepatica* producido en conejo, los anticuerpos capturaron los bacteriófagos que expresaron epítopes específicos del parásito, el título posterior al “panning” de 1×10^7 , título considerado como alto y aceptable tomando en cuenta que el original fue de 9.8×10^8 , coincidiendo con lo indicado en el manual técnico del vector (MaximBiotech, 1999). Dicha situación sugiere que es altamente probable encontrar cualquier epítipo de interés al aplicar un tamizado inmunológico como el mencionado. Por lo anterior se demuestra que bibliotecas elaboradas con esta tecnología permiten la selección de péptidos con diferente grado de afinidad y especificidad para su reconocimiento inmunológico con anticuerpos.

Un segundo tamizado de la biblioteca se realizó utilizando la prueba inmunológica de ELISA, se sensibilizó con bacteriófagos recombinantes que expresaban epítopes del trematodo y se utilizó suero hiperinmune anti-*F hepatica* desarrollado en conejos. La sensibilidad encontrada en esta prueba es notablemente alta. Esto demuestra que la biblioteca expresa antígenos de *F. hepatica*, los cuales pueden ser detectados con anticuerpos policlonales con una

alta sensibilidad probablemente debido a la pureza en que se encuentran expuestos.

Gazarian *et al.* (2000) desarrollaron un trabajo en el cual se emplea la tecnología “phage display”, y obtienen resultados satisfactorios al clonar cDNA que codifica para la producción de una paramiocina producida por el cestodo *Taenia solium*, ellos emplean la técnica de ELISA para la titulación de suero hiperinmune producido en conejos y encuentran una relación directa, entre la concentración de bacteriófagos que expresaron en sus filamentos los epitopes recombinantes, y la concentración del suero con anticuerpos producidos a partir de proteínas nativas del parásito. Estas observaciones coinciden con las nuestras y confirman la utilidad de la técnica empleada para el tamizado.

Con respecto a la utilización de la técnica de ELISA, como método para el tamizado de bibliotecas de expresión desarrolladas con la tecnología de “phage display”, Liu *et al.* (2003) realizaron experimentos en los cuales compararon la sensibilidad de una prueba ELISA titulando anticuerpos monoclonales antivirales, utilizando como antígeno sensibilizador a péptidos virales expresados a partir de una biblioteca en forma de bacteriófagos filamentosos. Describen diferencias importantes en los niveles de absorbancia a favor de los anticuerpos detectados usando bacteriófagos recombinantes en comparación con un antígeno viral obtenidos de cultivo celular. El “panning” desarrollado por estos autores, les permite desarrollar su técnica a partir de 10^6 UFC / ml, título menor al obtenido en este trabajo. Este título es menor que el obtenido por nosotros en la biblioteca de *F. hepatica* y esto puede deberse al mayor tamaño y complejidad del genoma de un trematodo comparado con el de un virus.

La versatilidad de las bibliotecas elaboradas con la herramienta de bacteriófagos filamentosos, queda demostrada en el trabajo realizado por Ghosh *et al.* (2002), ellos realizan una biblioteca de expresión a partir de *Anopheles*

gambiae con un título de 10^9 UFC / ml y a partir de la cual realizan diversos experimentos acerca de la interacción de proteínas de las glándulas salivales del insecto y el protozooario *Plasmodium berghei*. Este estudio sugiere que nuestra biblioteca, construida con el mismo sistema puede ser empleada en la búsqueda de moléculas importantes en la interacción huésped-parásito como la evasión de la respuesta inmune.

El sistema “phage display” introducido por Smith, (1985) ha representado una excelente opción para la clonación y expresión de genes, los cuales codifican para diversas funciones biológicas en gran cantidad de organismos, por ejemplo la identificación de receptores sobre células tumorales humanas (Changshou *et al.*, 2003; Amado *et al.*, 2003), antígenos de importancia virales (Xianlan *et al.*, 2003) y como en este trabajo antígenos parasitarios.

Finalmente, el desarrollo de una biblioteca de expresión de *F. hepatica*, con un sistema tan eficiente y versátil como el “phage display”, permite implementar técnicas más eficientes para el diagnóstico temprano y específico de la enfermedad, además abre la posibilidad de estudiar más ampliamente la respuesta inmune del huésped y la creación de un molécula que induzca una respuesta protectora, eficiente y duradera.

V.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amado J, Wadih A and Pasqualini R. Mapping tumor vascular diversity by screening phage display libraries. *J Control Release* 2003; 91: 183-186.
2. Anderson N, Long TT, Vo NG, Bui KL, Smoker PM and Spithill TW. The sensibility and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet Parasitol* 1999; 83: 15-24.
3. Bautista GCR. Inmunología de la fasciolosis. En: Morilla GA. *Inmunología Veterinaria*. Editorial Diana. 1989. México, DF pp 242-261.
4. Bautista GCR. Respuesta inmune en fasciolosis de los rumiantes. *Enfermedades helmínticas de importancia sanitaria y económica. Curso internacional. Fac. de Med. Vet. Y Zoot. UNAM* 1997: 32-38.
5. Blair D and McManus DP. Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 36: 201-208.
6. Boray JC. Experimental Fasciolosis in Australia. *Advances in Parasitology* 1969; 7: 195-210.
7. Boray JC. Fluke of domestic animals. Importance of pest and predators. Goafar WE, Howard and Marsh. Ed. Elsevier, 1985: 187-218.
8. Brown WC, Davis W, Dobbelaere DAE and Rice-Fitch AC. CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. *Infec Immunity* 1994; 62: 818-827.
9. Castellanos HA, Escutia SI y Quiroz RH. Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas tipo inspección federal en México de los años 1977-1982. *Vet Mex* 1992; 23: 339-342.
10. Castro J, Dumenigo B y Espino A. Detección de coproantígenos para

- evaluar la infección activa por *Fasciola hepatica* en ganado bovino. Parasitol Día 1994; 18: 33-38.
11. Changshou G, Shenlan M, Ranca F, Zhuangs S, Quaranta V, Wirsching P and Kim D. De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage display methods. J Immunol Met 2003; 274: 185-197.
 12. Christensen AC. Bacteriophage Lambda-Based expression vectors. Mol Biotech 2001; 17: 219-224.
 13. Clarke L and Carbon J. A colony bank containing synthetic Co1 E4 hybrid plasmids representative of entire *E. coli* genome. Cell 1976; 9:91-99.
 14. Clery D, Torgerson PR and Mulcahy G. Immune responses of chronically-infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol 1996; 62: 71-82.
 15. Clery DG and Mulcahy G. Lymphocyte and cytokine responses of young cattle during primary infection with *Fasciola hepatica* Res Vet Scie 1998; 65: 169-171.
 16. Collins PR, Stack CM, O'Neill SM, Doyle S, Ryan T, Brennan GP, Mousley A, Stewart M, Maule AG, Dalton JP, Donnelly S. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cell. J Biol Chem 2004; 17: 17038-46.
 17. Cordero CM y Rojo FA. Parasitología Veterinaria. España. McGrawHill, Interamericana. 1999. Cap 18, p 267.
 18. Das M, Harvey I, Chu LL, Sinha M and Pelletier J. Full length cDNAs: more than just reaching the ends., Physiol Genomics 2001; 6: 57-80.
 19. Dowd AJ, Tort J, Roche L, Ryan T and Dalton JP. Isolation of a cDNA encoding *Fasciola hepatica* cathepsin L2 and functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biochem Parasitol 1977; 88: 163-174.

20. Duffus WPH and Franks D. The interaction in vitro between bovine immunoglobulin and juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitol* 1981; 82: 1-10.
21. El-Bali MM, Malone JB, Todd WJ and Schnor KL. Detection of stable diagnostic antigen from bile and feces of *Fasciola hepatica* infected cattle. *Vet Parasitol* 1992; 45: 157-167.
22. Espino AM, Marcel R and Finlay C. Detection of circulating excretory-secretory antigens in human fasciolosis by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2637-2640.
23. Faria SLS, Ibarra VF, Sánchez SMR, Salcedo ER y Quiroz RH. Valoración de los niveles de Gammaglutamil transpeptidasa y Aspartato amino transferasa en ovinos fasciolosos tratados con triclabendazol. *Memorias del Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria*. México, D.F. 1989.
24. Gazarian KG, Gazarian TG, Solís CF, Hernández R, Shoemaker CB, Lacleste JP. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immun Lett* 2000; 72: 191-195.
25. Ghosh AK, Moreira LA, Jacobs-Lorena M. *Plasmodium*-mosquito interactions, phage display libraries and transgenic mosquitoes impaired for transmission. *Ins Bioch and Mol Biol* 2002; 32: 1325-1331.
26. Goose J and McGregor M. Naturally acquired immunity to *Fasciola hepatica* in the rat. *Brit. Vet J* 1973; 129: XLIX-LIII.
27. Harmsen MM, Cornelissen J, Herma E, Bruijs CM, Boersma JA, Suzan HM, Jeurissen M, Milligen F. Identification of a novel *Fasciola hepatica* cathepsin L protease containing protective epitopes within the propeptide. *Int J Parasitol* 2004; 34: 675-682.
28. Hassan MEA, Highsmith WEJ. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002; 35: 425-445.
29. Heussler VT and Dobbelaere DAE. Cloning of a protease gene family

- of *Fasciola hepatica* by polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1994; 64: 11-23.
30. Hillyer GV. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*. Parasitol Día 1993; 17: 130-136.
31. Ibarra VF. Avances de investigación en fasciolosis. En Temas Selectos de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2000: 42-49.
32. Kemp EH, Herd LM, Waterman EA, Wilson AG, Weetman AP, Watson PF. Immunoscreening of phage-display cDNA-encoded polypeptides identifies B cell targets in autoimmune disease. Bioch and Bioph Res Comm 2002; 298: 169-177.
33. Kendall SB, Sinclair IJ, Everet G and Parfitt JW. Resistance to *Fasciola hepatica* in cattle I. Parasitological and serological observations. J Comp Path 1978; 88: 115-122.
34. Lammert M, Cor PH, Vallera P and Borgsteede HM. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle and sheep in the Netherlands. Vet Parasitol 2000; 91: 153-158.
35. Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy N, Whisstock JC, Pike RN, Spithill TW. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. Infect immune 2003; 12: 6921-32.
36. Lewin B. Genes VII. España. Marban. 2001.
37. Liu F, Guttikonda S, Suresh MR. Bispecific monoclonal antibodies against a viral an enzyme utilities in ultrasensitive virus ELISA and phage display technology. J Immun Meth 2003; 274: 115-127.
38. Malone JB. Fasciolosis and Cestodosis. Vet Clin North Am 1986; 2: 261-275.
39. Malone JB and Craig MT. Cattle liver flukes risk assessment and control. Comp Cont Educ Pract Vet 1990; 12: 747-754.

40. Marín SM, Prieto M, Martín JM, Casais R, Boga JA and Parra F. Identification and expression of a *Fasciola hepatica* gene encoding a gut antigen protein bearing repetitive sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 55: 155-166.
41. Maxim Biotech. Inc. EZnet™ Phage Display cDNA Library. Instruction Manual. San Francisco, CA, U.S.A, 1999.
42. McGonigle S, Curley GP and Dalton JP. Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitol* 1997; 115: 101-104.
43. Morilla GA y Bautista GC. Manual de inmunología. México. Editorial Diana. 1986. p 56.
44. Mostafa OM, Taha HA, Ramadan G. Diagnosis of *Fasciola gigantica* in snail using the polymerase chain reaction (PCR) assay. *J Egypt Soc Parasitol* 2003; 3: 733-42.
45. Mulcahy G, O'Connor F, McGonigle S, Dowd A, Clery DG, Andrews SJ and Dalton JP. Correlation of specific antibody titre and avidity with protection in cattle immunized against *Fasciola hepatica*. *Vaccine* 1998; 16: 932-939.
46. Murray PD. Guide to protein purification. USA. Academic Press. 1990.
47. Olaechea F. Epidemiología y control de *Fasciola hepatica* en la Argentina. En Nari A y Fiel C editores Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Uruguay. Hemisferio Sur, 1992.
48. Oldham G. Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola*. *Vet Sci* 1985; 39: 357-363.
49. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Limusa, 1999.
50. Quiroz RH. Epidemiología de la fasciolosis. Frecuencia en animales domésticos en México. En Temas selectos de parasitología. Facultad

de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2000: 130-144.

51. Reed MB, Panaccio M, Strunell RA and Spithill TW. Developmental expression of a *Fasciola hepatica* sequence homologous to ABC transporters. *Int J Parasitol* 1998a; 28: 1375-1381.
52. Reed MB, Spithill TW, Strugnell RA and Panacio M. *Fasciola hepatica*: Stage-specific expresión of novel gene sequences as identified by differential display. *Exp Parasitol* 1998b; 89: 169-179.
53. Rhyner C, Kodzius R and Cramer R. Direct selection of cDNAs from Filamentous Phage Surface Display Libraries: Potential and Limitations. *Current Pharm Biotechnol* 2002; 1: 13-21.
54. Rim HJ, Farag HF, Sornmani S and Cross JH. Food-borne trematodes: Ignored or emerging? *Parasitology Today* 1994; 10:207-209.
55. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. USA. CSH, Second Edition. 1990.
56. Sandeman RM and Howell MJ. Response of sheep to challenge infection with *Fasciola hepatica*. *Res Vet Sci* 1981; 30: 294-297.
57. Schalling HDFH, Van Leewen MAW and Hendrix WML. Isotype-specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet Parasitol* 1995; 56: 149-162.
58. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expresión vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315-1317.
59. Smooker PM, Kennedy NJ, Steeper KR, Christopoulos H and Spithill TW. *Fasciola*: Kinetics and quality of humoral responses to fatty acid binding protein and cathepsin L. Following delivery as DNA vaccines in mice. *Exp Parasitol* 2001; 97:154-160.
60. Solocture L, Wijffels G, Sexton JL, Panaccio M, Maiter S, Mccauler I and Spithill TW. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-

transferase of *Fasciola hepatica*. Mol Biochem Parasitol 1995; 69: 281-288.

61. Universal Riboclone® cDNA Syntesis System. Technical Manual No. 038. Promega Corporation. Madison, WI U.S.A, 2001.
62. Xianlan C, Hadya N and Colmes I. Mapping of conformational epitope on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd-tet phage display. J Virol Met 2003; 114: 109-112.
63. Wawrzyniec K, Mieszczcnek J, Plucienniczak G and Wedrychowicz H. Succesful DNA immunization of rats against fasciolosis. Vaccine 2000; 18: 2985-2990.
64. Wedrychowicz H, Lamparska M, Kesik G, Kotomski J, Mieszczanek L, Panasiuk JL, Plucienniczak A. The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. Vet Immunol and Immunopath 2003; 94: 83-93.

Cuadro 1. Esquema de inmunización para obtener anti-suero

DIA CERO	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28	DIA 35
SANGRADO	INMUNIZACION	SANGRADO	SANGRADO	SANGRADO	*****
INMUNIZACION		INMUNIZACION	INMUNIZACION	INMUNIZACION	*****
1ml de antígeno + 1 ml de Adyuvante Completo de Freund. Subcutáneo	1 ml de antígeno + 1 ml de Adyuvante Incompleto de Freund. Subcutáneo	1 ml de antígeno por vía intramuscular	0.5 ml de antígeno por vía intramuscular	0.5 ml de antígeno por vía intramuscular	0.5 ml antígeno intramuscular

Cuadro 2. Lecturas de la purificación de RNA total de *F. hepatica*.

Muestra	DO 260 nm	DO 280 nm	Relación 260nm/280nm	RNA total en miligramos
1	1.169	0.709	1.648	5.1
2	1.370	0.998	1.372	6,0
Suma de las 2 Reacciones				11.1

Cuadro 3. Lecturas de la purificación de RNAm de *F. hepatica*.

Tubo	DO 260 nm	DO 280 nm	Relación 260nm/280nm	RNAm en microgramos
1	0.04	0.021	1.90	14.4
2	0.113	0.566	1.99	40.68
3	0.001	-----	-----	0.36
Suma de los tubos				55.44

Cuadro 4. Porcentaje de Incorporación del elemento radiactivo dATP [α - 32 P], en la síntesis de primera cadena.

Reacción	Porcentaje de incorporación
Control	15.3 %
1	11.19 %
2	10.89 %
3	5.36 %
4	11.65 %

Cuadro 5. Incorporación de dATP [α - 32 P] en las reacciones de síntesis de segunda cadena.

Reacción	Porcentaje de incorporación
1	65%
2	58%
3	56 %
4	52 %
Control	67 %

Cuadro 6. Cuantificación del DNAC, de las muestras fraccionadas.

Reacción	DNA obtenido (Nanogramos = ng)
1	870 ng
2	390 ng
3	180 ng
4	210ng
Total	1650 ng

Cuadro 7. Protocolo de digestión para el "phagemido" con EcoRV.

Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen en reacción
"Phagemido"	1 μ g/ μ l	100 μ g	100 μ l
EcoRV	12U/ μ l	2U/ μ g	16.6 μ l
Buffer	10X	1X	200 μ l
Espermidina	100Mm	1mM	20 μ l
H ₂ O cbp 2000 μ l			1663.4 μ l

Cuadro 8. Protocolo de desfosforilación.

Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen en reacción
"Phagemido" 3.2	200 ng/ μ l	50 μ g	250 μ l
FAC	1U/ μ l	0.2 U/ μ mol DNA	2.3 μ l
Buffer FAC	10X	1X	50 μ l
H ₂ O cbp 500 μ l			197.7 μ l

Cuadro 9. Protocolo de ligación para la evaluación del vector.

Reactivo	[] Stock	[]Reacción	Con ligasa	Sin ligasa	30ng λ Alu
“Phage” 3.2	100 ng/ μl	100 ng	1 μl	1 μl	1 μl
Inserto control	20 ng/ μl	30 ng	----	----	1.5 μl
Ligasa T4	1 u / μl	1 u	1 μl	----	1 μl
Buffer de ligación	10 X	1 X	2 μl	2 μl	2 μl
PEG	10 %	2.5 %	1.2 μl	1.2 μl	1.2 μl
H ₂ O		Cbp 20 μl	14.8 μl	15.8 μl	13.3 μl

Cuadro 10.Resultado de las ligaciones en el vector “Phage 3.2” con diferentes cantidades de inserto.

“phagemido”	Inserto control λ Alu	Título obtenido
100 ng	Con lig / sin inserto	1.6×10^3
100 ng	Sin lig / sin inserto	3.5×10^2
100 ng	30 ng	2.1×10^5
100 ng	60 ng	3.0×10^5
100 ng	90 ng	3.3×10^5
100 ng	120 ng	1.5×10^5

Cuadro 11. Diluciones del bacteriófago "helper" en medio 2XYT

	Medio 2XYT	Factor de dilución
20µl fago no diluido	198µl	10 ²
20µl de la dilución 10 ²	180µl	10 ³
20µl de la dilución 10 ³	180µl	10 ⁴
20µl de la dilución 10 ⁴	180µl	10 ⁵
20µl de la dilución 10 ⁵	180µl	10 ⁶
20µl de la dilución 10 ⁶	180µl	10 ⁷
20µl de la dilución 10 ⁷	180µl	10 ⁸
20µl de la dilución 10 ⁸	180µl	10 ⁹

Cuadro 12. Títulos obtenidos del bacteriófago "helper"

Número de reacción	Título obtenido
1	1.7 x 10 ¹⁴
2	1.8 x 10 ¹⁴
3	2.0 x 10 ¹²

Cuadro 13. Protocolo para la PCR

Elemento	Concentración usada
H ₂ O	Cbp 20 μ l
Iniciadores	1 μ M
dNTP	0.2 mM
ASB	0.15 mg/ ml
Tritón	0.1%
Buffer Mg	0.15 mM
Taq polimerasa	0.12 U/ μ l
Muestra	1 colonia

Cuadro 14. Condiciones para el desarrollo de la PCR

Núm. de ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Desnaturalización	94°C	3 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	30 segundos
35 ciclos	Alineación	68°C	30 segundos
35 ciclos	Extensión	72°C	1 minuto
1 ciclo	Extensión	72°C	1 minuto

Cuadro 15. Concentración de proteína obtenida en las 3 purificaciones de antígeno somático de *F. hepatica*.

Purificación	Concentración
1	1.03 mg/ml
2	1.4 mg/ ml
3	1.9 mg/ ml

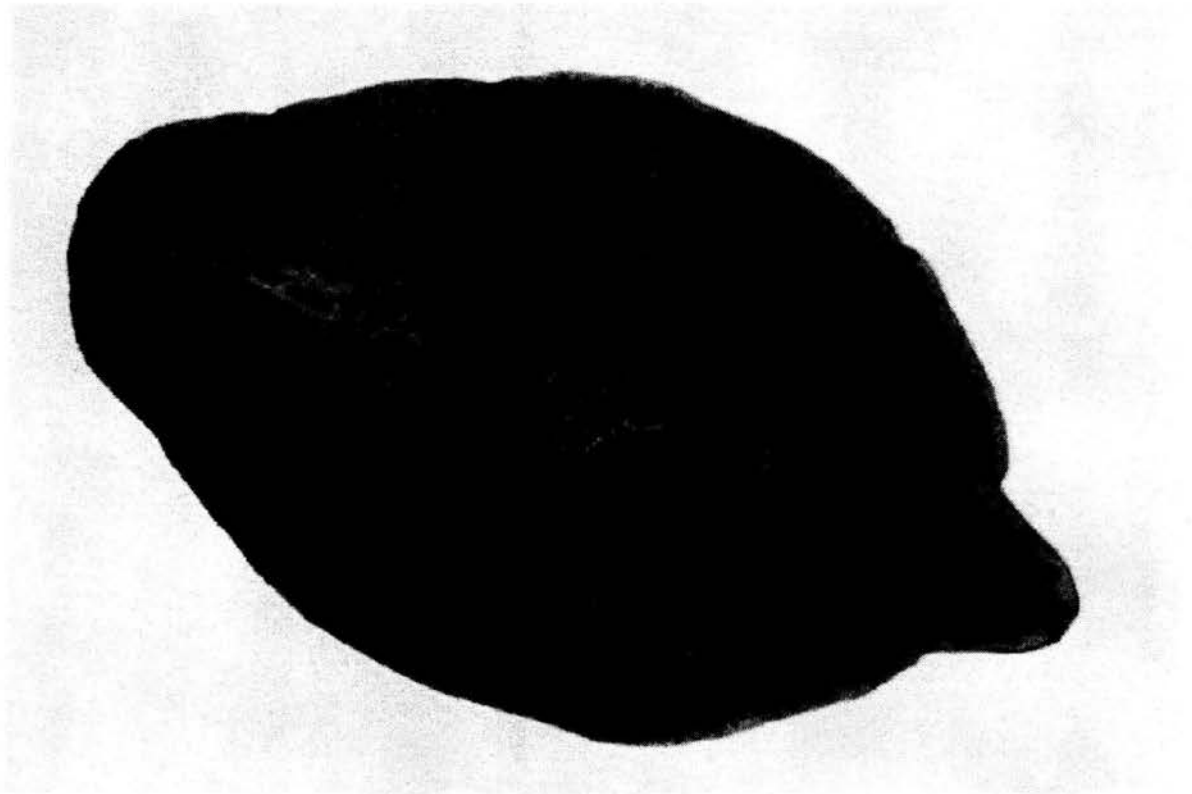


Figura 1. *Fasciola hepatica*. Organismo adulto, colectado de conductos biliares y teñido con carmín acético. Fotografía de la colección del departamento de parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

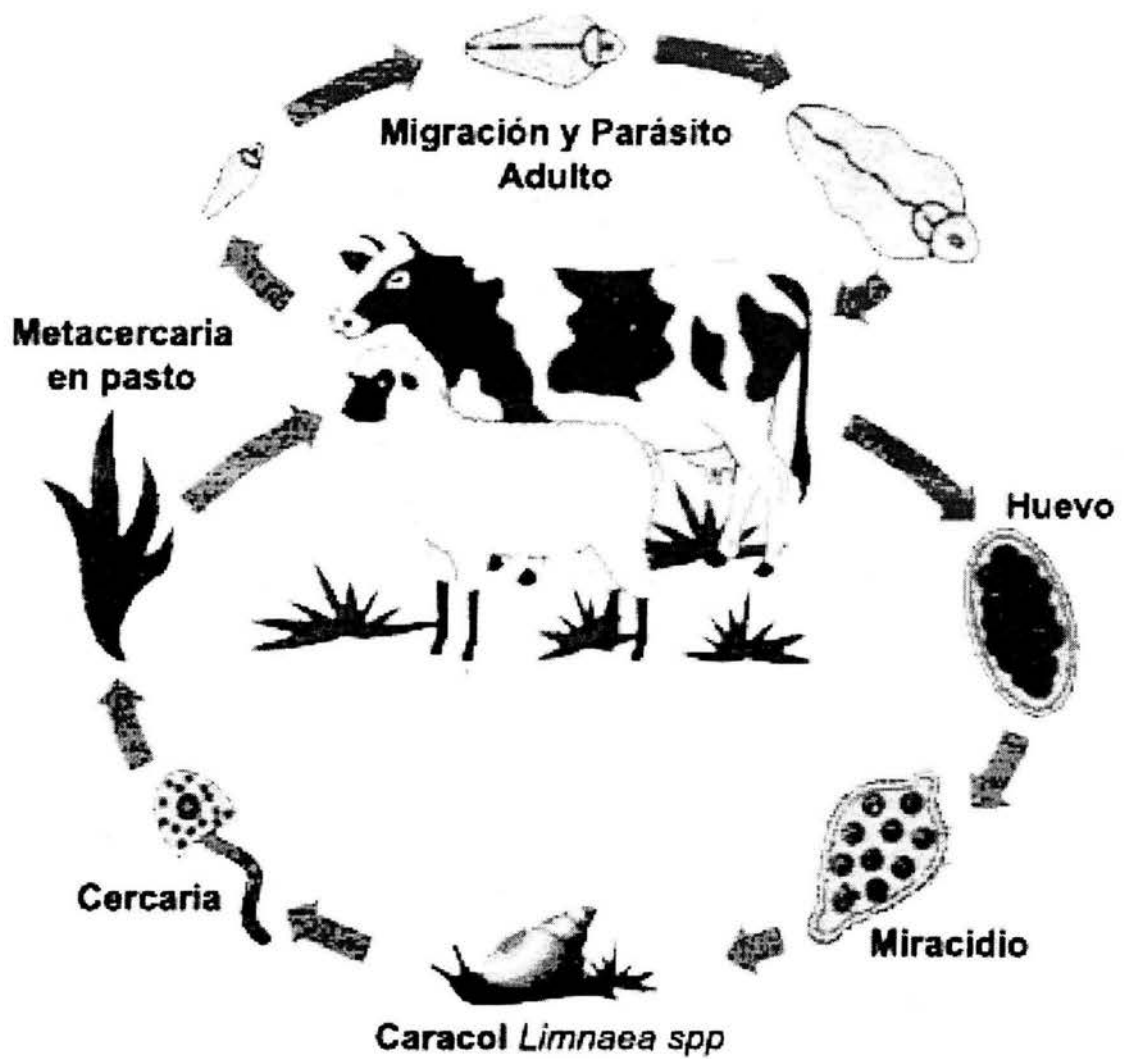


Figura 2. Ciclo evolutivo del trematodo *F. hepatica*.

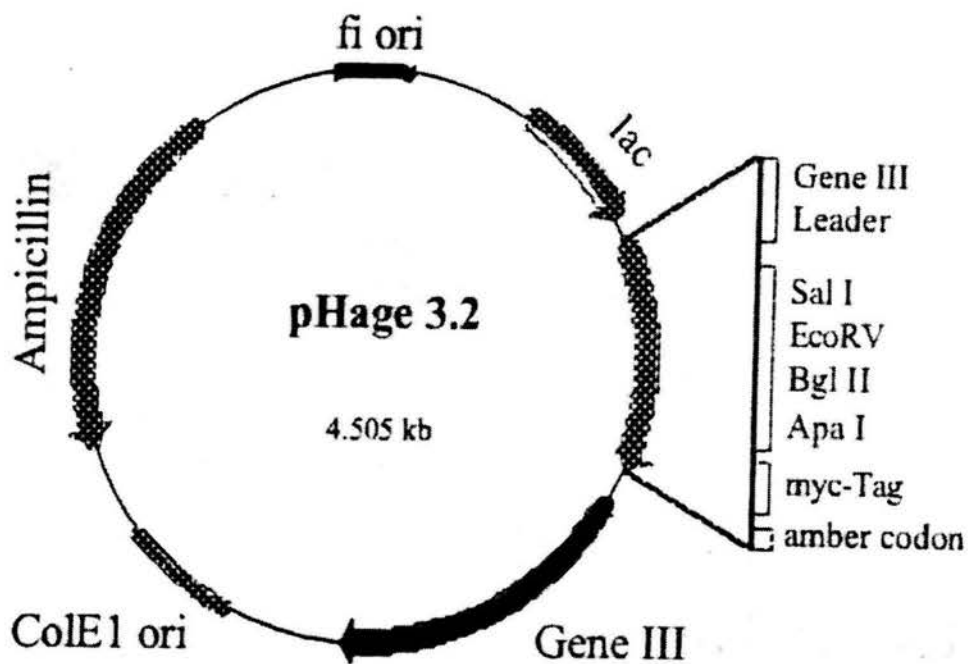


Figura 3. "Phagemido" "Phage 3.2" utilizado por el sistema "EZnet™ phage display cDNA library"

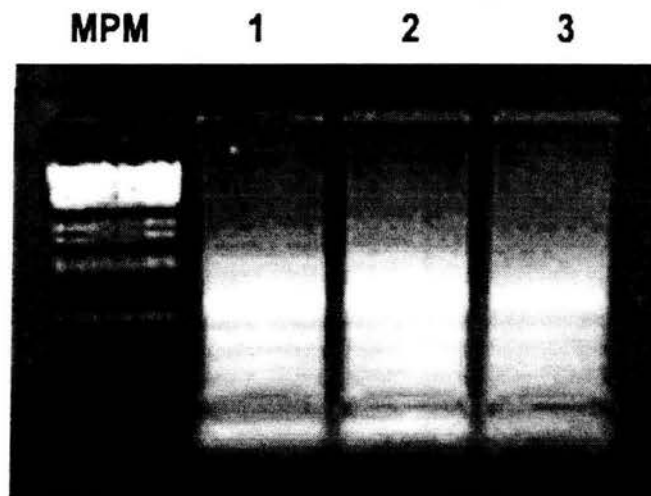


Figura 4.Corrimiento electroforético de RNA total de *F. hepatica*. En gel de agarosa- TBE 1%, teñido con bromuro de etidio.

MPM: Marcador de Tamaño molecular, Lambda DNA digerido con Bst E II.
Carriles 1-3: RNA total de *F. hepatica*.



Figura 5. Autorradiografía, a partir de un gel de agarosa alcalina 1%, MPM: Marcador de Tamaño Molecular, Lambda DNA digerido con Bst E II. C: Reacción control. Carriles 1-4: Las cuatro reacciones de síntesis de primera cadena de cDNA de *F. hepatica*.

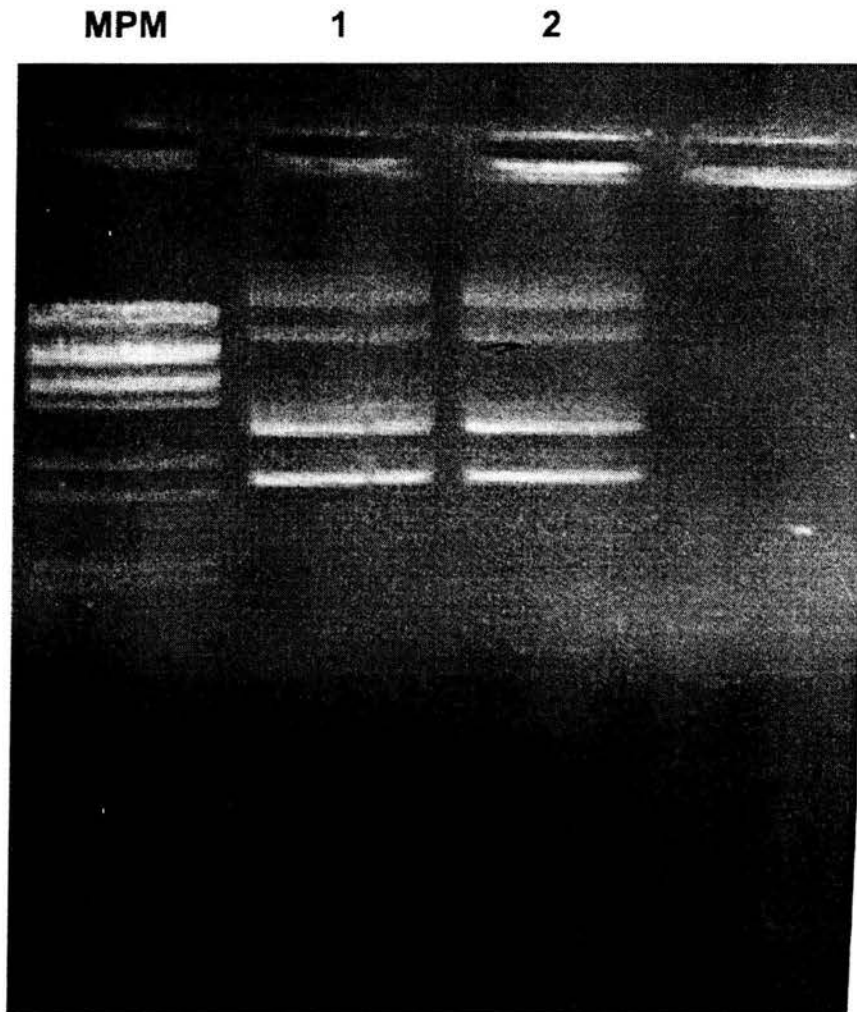


Figura 6. Corrimiento electroforético del “phagemido” obtenido en un gel de agarosa-TBE 1% y teñido con bromuro de etidio. MPM: Marcador de Tamaño Molecular, Lambda DNA digerido con Bst E II. Carriles 1-2: “Phagemido” purificado.

Falta página

N°

67

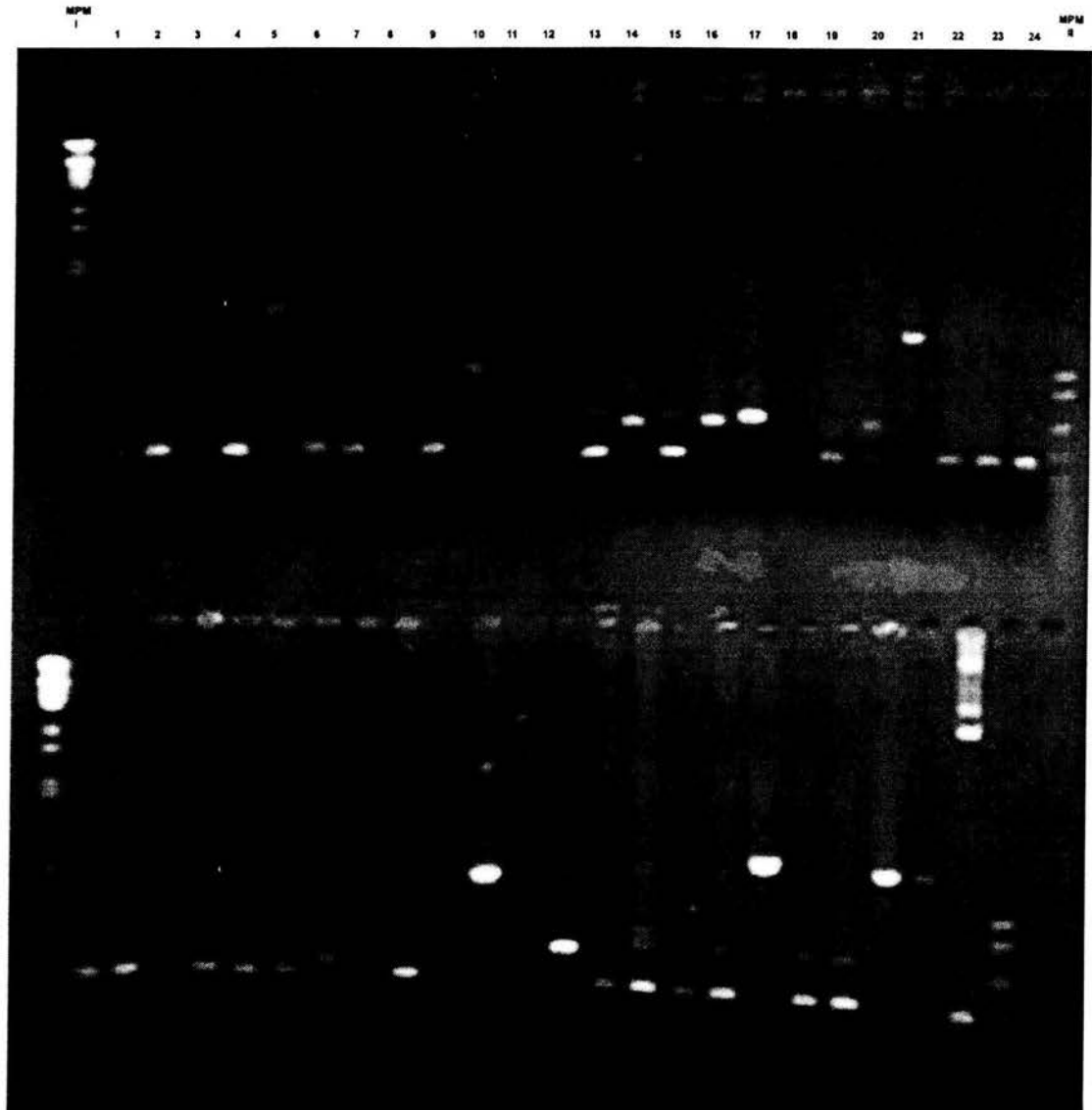


Figura 8. Corrimiento electroforético de los fragmentos amplificados de células HB2151, en un gel de agarosa-TBE 3%, teñido con bromuro de etidio. MPM I: Marcador de Tamaño Molecular, Lambda DNA digerido con Bst E II. Carriles 1-24 Fragmentos amplificados. MPM II: Marcador de Tamaño Molecular, DNA pBR 322 digerido con Msp I.

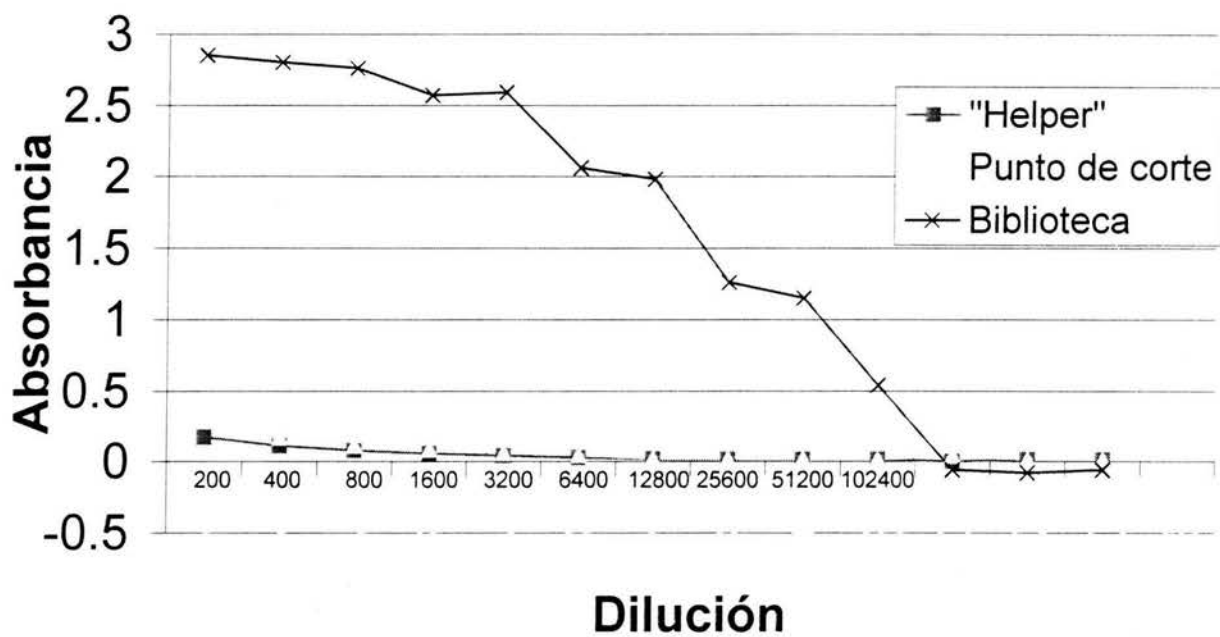


Figura 9. Prueba de ELISA con placa sensibilizada con viriones recombinantes

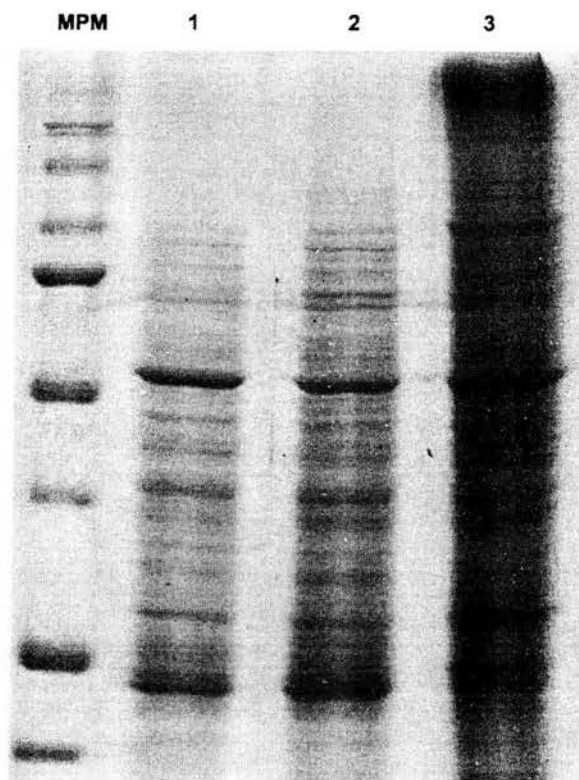


Figura 10. Corrimiento electroforético en SDS-PAGE 12% y teñido con azul de Coomassie. MPM: Marcador de Peso Molecular, Presicion plus protein Standard (BioRad). Carriles 1-3 antígenos somáticos de *F. hepatica*.

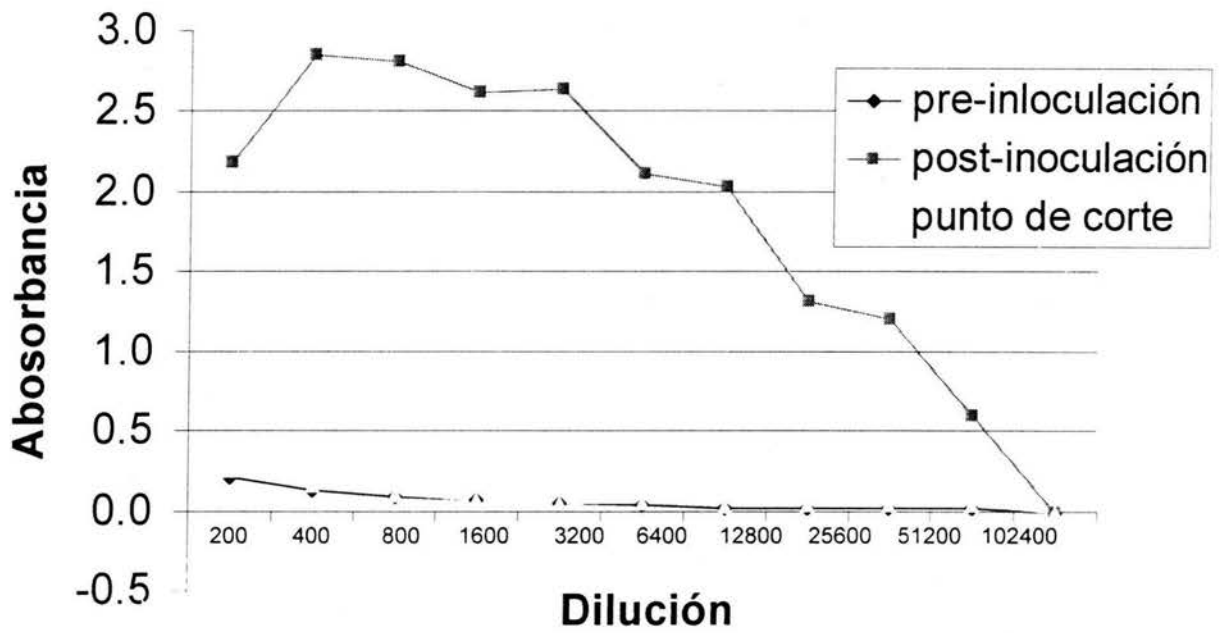


Figura 11. Titulación de suero anti- *F. hepatica*