



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Campus II

“Clonación de un péptido derivado de la gp-43 kDa de *Trichinella spiralis* y su expresión en la superficie de *Escherichia coli*, empleando el autotransportador ShdA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A
SÁNCHEZ SALINAS SAÚL GUSTAVO

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. ERICKA NELLY POMPA MERA

MÉXICO, D.F.

2008



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología “Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza”, bajo la dirección de la Q.F.B. Ericka Nelly Pompa Mera.

AGRADECIMIENTOS

Al DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA jefe de la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología “Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza” por haberme brindado la oportunidad de trabajar en el laboratorio de investigación que dignamente dirige.

DRA. CAROLINA BEKKER MÉNDEZ por toda la ayuda que me brindo y haberme dirigido para realizar el servicio social.

A todo el personal que labora en la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología “Daniel Méndez Hernández” del Centro Médico Nacional “La Raza”.

A la M. en C. ERICKA NELLY POMPA MERA por su incansable apoyo de haberme dirigido y brindarme hasta el mas mínimo recurso que necesite para llevar acabo este proyecto, así como también por tener la oportunidad de conocer su ejemplar dedicación profesional y su gran espíritu universitario que la caracteriza...¡Gracias por todo Ericka!

Agradezco a dios por su bondad y misericordia con la que me a tratado en esta vida y por verme dado tan ejemplar madre la Sra. Ma. del SOCORRO SALINAS ya que a el y a ella debo toda por la fuerza inspiración y esencia que me han fortalecido en esta vida. Gracias por su paciencia.

A mi madre por ser la excelente persona que es. Por verme enseñado la manera mas hermosa que una madre puede enseñarle a un hijo como quererlo como ayudarlo y como perdonarle sus errores, por ver sido padre y madre a la vez y quererme tanto te amo mama.

A mi bebe S. ABIGAIL SÁNCHEZ R. por ser un amor tan hermoso y puro en mi vida, ya que su presencia en este mundo me llenado de una inspiración indescriptible. Siendo una de las razones más fuertes para poder concluir este proyecto de mi vida. Mi beba hermosa

A todos mis hermanos: ALFREDO SÁNCHEZ.S. por demostrarme la fuerza de resistencia que un búfalo necesita para mantenerse en pie en esta selva que es la vida eres mi ejemplo.

A ALEJANDRO SÁNCHEZ. Por ser tan bueno como hermano.

A RENE C. SÁNCHEZ S. Por ser el primer universitario de la familia y ser una de las piezas claves en mi vida, por que me mostró a mi y a todos mis demás hermanos de manera admirable la parte bella de la vida así como también por sentirme satisfecho de tener un hermano del cual no podría pedirle mas a dios. “Gracias por enseñarme todo lo que me has enseñado “Lú” por ser el ejemplo a seguir.

A TOÑITO por ser la parte divertida de la familia y por todo el apoyo que me ha dado cuando lo necesite y por ser mi hermano mayor.

A G. CLAUDIA S. Por ser un pilar insustituible en mi vida familia, y por seguir luchando incansablemente día a día a lado de cada uno de nosotros gracias “Gigi.”

A J. EDUARDO S. por ser mi buen compañero desde que tengo memoria y con el que me identifico de una manera sentimental muy personal. “te quiero mucho mi niño chiquito.”

A A.ARLETTE S. Por ser la beba más hermosa de nuestra familia y la cual siempre me a enorgullecido como hermana.

INDICE

RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS.....	6
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	7
ANTECEDENTES.....	8
Triquinelosis.....	8
Especies.....	9
Ciclo de vida.....	10
Cambios inducidos por <i>T. spiralis</i>	11
Papel de los antígenos de <i>T. spiralis</i>	13
Antígenos TSL.....	15
Glicoproteína de 43 kDa.....	16
Selección de la secuencia antes de desarrollar una vacuna.....	18
Sistemas de expresión.....	20
Autotransportadores.....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
HIPÓTESIS.....	29
VARIABLES.....	29
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
TIPO DE ESTUDIO.....	30
POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	30
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	30
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	30
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	51
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	54

RESUMEN

La triquinelosis o triquinososis es una enfermedad causada por nemátodos del género *Trichinella*. Actualmente se conocen 7 especies y 3 genotipos, siendo *T. spiralis* la que posee mayor infectividad hacia algunas especies silvestres (reptiles, aves, roedores), domésticas (cerdo y caballo) y el humano. Durante la infección, participan numerosos antígenos del parásito específicos de especie y estadio, algunos de estos glicosilados con funciones perfectamente descritas y otros de función desconocida. A este respecto, uno de los antígenos que parece jugar un importante papel en la generación de una respuesta inmune, es la glicoproteína de 43 kDa (gp43-kDa). Recientemente se demostró que la inmunización intranasal con un péptido de 30 aminoácidos derivado de esta glicoproteína, era capaz de inducir respuesta inmune protectora en ratón en contra el parásito. En el presente trabajo se clonó la secuencia codificante de este péptido en un sistema de expresión (plásmido) que posee los elementos suficientes para expresarlo en la superficie de *Escherichia coli* mediante el autotransportador ShdA. Para ello se emplearon herramientas de biología molecular y de ingeniería genética. La secuencia codificante del péptido derivado de la gp43-kDa se obtuvo mediante PCR por acoplamiento. Posteriormente esta secuencia se insertó en el plásmido pENP-01. La construcción fue verificada mediante análisis de restricción y secuenciación. La expresión de la proteína de fusión fue demostrada a través de un ensayo tipo Western-blot y finalmente la translocación de la misma hacia la superficie bacteriana, se verificó mediante inmunofluorescencia indirecta. Estos estudios constituyen el primer paso para el desarrollo de vacunas basadas en acarreadores bacterianos y como herramientas biotecnológicas.

ABREVIATURAS

Ag30	Péptido de 30 residuos derivado la glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i> , y cuya secuencia de aminoácidos es: RLEMYGSFLAKVMVVNMRIWAVTDNTLQTT
ag30	Secuencia de nucleótidos (DNA) que codifica para el Ag30.
AT	Autotransportador
pnirB	Promotor nir B inducible en anaerobiosis ó en condiciones microaerofílicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
LTB	Secuencia señal de tráfico LTB (subunidad B de la toxina termolábil de <i>E. coli</i>). Es una señal de tráfico sec-dependiente.
ShdA	Autotransportador ShdA , su nombre proviene de <i>Shedding</i> , que significa eliminar.
FLAG	Péptido bandera para detectar la expresión de la proteína de fusión.
pENP-01	Plásmido que posee los elementos: promotor pnir B, secuencia de tráfico LTB, polilinker (sitios de restricción XbaI, HindIII, SpeI, Sal I y XhoI) y gen que codifica una forma acotada del Autotransportador ShdA.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras.
IIF	Inmunofluorescencia indirecta
V	volts
mA	miliamperes
rpm	revoluciones por minuto
d.p.i	días después de la infección
LM	Larva muscular de <i>T. spiralis</i>
kDa	kilodaltons

Índice de tablas y figuras

Tablas

1. Características generales de las especies y genotipos de <i>Trichinella</i>	9
2. Características de la cepa bacteriana.....	33
3. Oligonucleótidos empleados	33
4. Programa de temperaturas empleadas en la PCR.....	35
5. Controles usados en la transformación de <i>E. coli DH5a</i>	38

Figuras

1. Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	11
2. Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de 43 kDa.....	17
3. Elementos científicos asociados al desarrollo de un de una vacuna	20
4. Sistemas de secreción en bacterias gramnegativas	21
5. Sistema de secreción V ó autotransportador (AT).....	24
6. Estructura primaria de ShdA.....	25
7. Estrategia de clonación	34
8. Amplificación de la secuencia codificante del epitopo Ag30.....	43
9. Caracterización del inserto (secuencia Ag30).....	44
10. Caracterización del vector y patrón electroforético de las clonas positivas	45
11. Tamizaje de clonas positivas.....	46
12. Secuencia del plásmido pAg30	48
13. Análisis de la expresión de la proteína de fusión AG30 mediante SDS-PAGE 12.5% y Western-Blot.....	49
14. Expresión del péptido bandera FLAG en la superficie de <i>E. coli</i> transformada con los diferentes plásmidos.....	50

ANTECEDENTES

En México, las infecciones por parásitos han sido la quinta causa de consulta en el Instituto Mexicano de Seguro Social. Este y la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud incluye a las helmintiasis dentro de las veinte principales causas de morbilidad general (1). A este respecto, las helmintiasis se encuentran entre las infecciones parasitarias más comunes, afectando a más de una cuarta parte de la población mundial. Aunque la mortalidad es baja, la morbilidad es importante ya que se le atribuye una significativa contribución a la totalidad existente de las infecciones transmisibles en los países en vías de desarrollo (2). Se estima que aproximadamente los parásitos helmintos, infectan a billones de personas y a sus animales domésticos en todo el mundo (3). De manera general, este tipo de infecciones, son mucho más severas en niños, cuyo desarrollo físico y mental se ve afectado. Desafortunadamente, en países en vías de desarrollo como el nuestro, las medidas de control para este tipo de infección entre otras no es lo suficientemente capaz y por consiguiente, las helmintiasis continúan siendo un problema de salud pública. Los parásitos nemátodos de importancia médica pueden ser clasificados como nemátodos intestinales y tisulares. Entre las helmintiasis que inicialmente pueden afectar el tracto gastrointestinal, se encuentra la triquinelosis (2,4).

TRIQUINELOSIS

Es una zoonosis producida por nemátodos del género *Trichinella*, el cual tiene una amplia distribución mundial (5). Esta enfermedad puede afectar al humano y a especies animales tanto domésticas (cerdo, caballo); como de vida silvestre (osos, zorros, aves, reptiles) (6).

En el humano, la sintomatología clínica de la triquinelosis comprende desde las fases invasivas entéricas del parásito, hasta el enquistamiento del parásito en el músculo. Las infecciones leves, (<10 larvas/g de músculo) son menos severas y asintomáticas; mientras que las infecciones severas (> 50 larvas/g de músculo) pueden resultar muy graves para la vida del paciente. La invasión a nivel intestinal puede provocar diarrea, dolor abdominal, náusea y vómito. Por otra parte, los síntomas asociados con la migración de la larva y la invasión del músculo, comienzan a presentarse la segunda semana después de la infección, provocando una hipersensibilidad sistémica y/o local con fiebre con hipereosinofilia. Es

común hallar en el paciente, edema periorbital y facial, hemorragia en la retina, subconjuntiva y en la región distal de las uñas de las manos. También puede presentarse rash maculopapular, dolor de cabeza, tos, disnea ó disfagia. En los casos letales de triquinelosis (poco frecuente), puede presentarse miocarditis, taquiarritmia ó falla cardiaca y menos frecuente, encefalitis ó neumonitis (4).

Trichinella spp.

La clasificación taxonómica de este parásito es la siguiente:

REINO	<i>Animal</i>
SUPERPHYLUM	<i>Achelminthes</i>
PHYLUM	<i>Nematoda</i>
CLASE	<i>Adenoforea</i>
ORDEN	<i>Enoplida</i>
FAMILIA	<i>Trichinellidae</i>
GENERO	<i>Trichinella</i>

ESPECIES

En un principio, la división de las especies se ha basado en la morfología, pero se han observado diferencias mínimas entre algunas especies. Actualmente se han descrito 7 especies y 10 genotipos de *Trichinella* (Tabla 1), con distintas capacidades de generar la enfermedad. Todas estas especies son potencialmente capaces de infectar al humano, aunque la mayoría de los casos de triquinelosis en este huésped, son causados por *T. spiralis* (7).

Especie	Genotipo	Encapsulado	Distribución geográfica	Infectividad/ características biológicas.
<i>T. spiralis</i>	T1	Si	Cosmopolita	Alta para roedores y cerdo
<i>T. nativa</i>	T2	Si	Regiones del Ártico y subártico	Muy Baja para roedores y cerdo
<i>T. britovi</i>	T3	Si	Zonas templadas	Baja para roedores y cerdo
<i>T. pseudospiralis</i>	T4	No	Cosmopolita	Infectiva para aves
<i>T. murrelli</i>	T5	Si	Región del Neoártico	No resiste el congelamiento
<i>T. nelsoni</i>	T6	Si	Región del Neoártico	Relacionada a <i>T. nativa</i>
	T7	Si	África ecuatorial	Muy baja infectividad para roedores y cerdo
	T8	Si	África subtropical	Relacionada con <i>T. britovi</i>
<i>T. papuae</i>	T9	Si	Japón	Relacionada con <i>T. britovi</i>
	T10	No	Papua	Infectiva para roedores y cerdo, no infectiva para aves.
			Nueva Guinea	

Tabla 1. Características generales de las especies y genotipos de *Trichinella*. (7)

CICLO DE VIDA

El nemátodo *T. spiralis* es un parásito intracelular que lleva a cabo todos sus estadíos de desarrollo en un solo hospedero (fig. 1). El ciclo de vida se caracteriza por tener 2 fases:

1. Entérica
2. Sistémica (parenteral)

La primera fase, comienza cuando un huésped potencial ingiere carne de un animal previamente infectado (consume carne con quistes que contienen larvas musculares (LM ó L₁ viables de *T. spiralis*). Estas larvas L₁ son liberadas por acción de los jugos gástricos y comienzan a interactuar con el epitelio columnar de la mucosa intestinal. Es en este sitio donde se inicia el proceso de maduración sexual (aprox. 8 horas después de la infección). La larva sufre 4 mudas (L1-L4), hasta desarrollar a larva adulta (LA) en menos de 30-40 horas. En esta etapa la mayoría de los parásitos, ya están completamente diferenciados en hembras y machos, los cuales comienzan a copular a las 48 horas. Por razones aún desconocidas, el macho es expulsado después de ocurrir la fecundación, mientras que las hembras aumentan de tamaño y se fijan a la mucosa y la penetran a través de las microvellosidades de la misma. Por su parte, la embriogénesis dura alrededor de 90 horas y en el caso de *T. spiralis*, las larvas recién nacidas (LRN) son liberadas al quinto día después de la infección (5 d.p.i.)

Las LRN atraviesan la mucosa intestinal y se meten a la circulación arterial y linfática, vía conducto torácico, pasando por corazón y pulmones y de aquí a su tejido blanco: el músculo esquelético y a otros músculos pobres en glucógeno, pero con gran actividad como son: diafragma, intercostales, cuádriceps, lengua maceteros etc., donde se les puede localizar a partir del séptimo día. Hacia el decimoquinto día las LRN han sufrido una serie de mudas adicionales que dan origen a las larvas infectantes ó también conocidas como larvas musculares (LM ó L₁). El ciclo de vida se cierra cuando la carne de este huésped infectado, es consumida por otro huésped potencial (4, 6, 8).

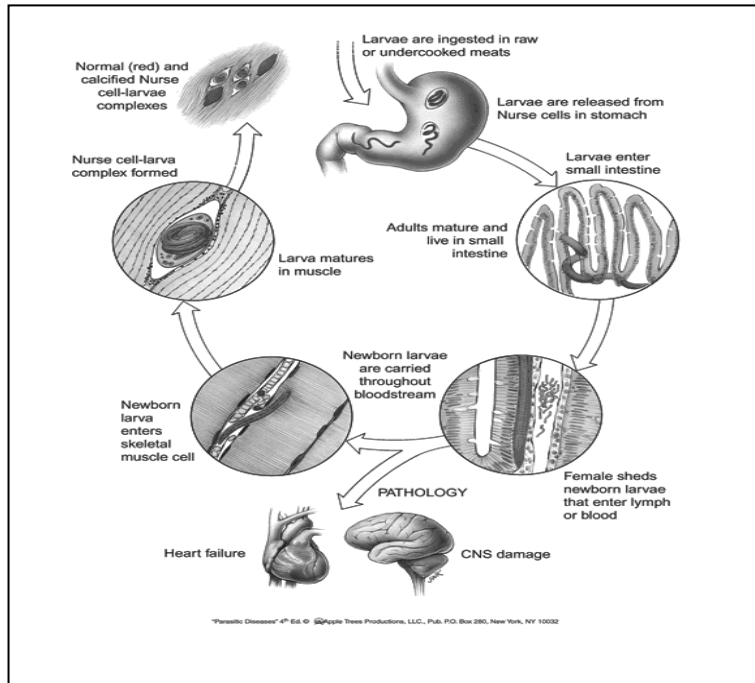


Figura 1. Ciclo de vida de *T. spiralis*. (6)

CAMBIOS INDUCIDOS POR *T. spiralis*.

La LM induce una serie de cambios a fin de asegurar la supervivencia del parásito, que culminan con la formación de un complejo parásito-célula muscular huésped, llamado **célula nodriza**, la cual se deriva de la porción normal del músculo esquelético estriado desarrollándose aproximadamente entre 15 y 20 días después de que la larva invade la célula muscular. *Trichinella spp*, invade a la célula huésped sin matarla y de esta manera se le considera uno de los parásitos simbioses más exitosos, ya que lo habilita para distribuirse ampliamente por el mundo y para extenderse hacia una amplia variedad de huéspedes. Existen ciertos mecanismos por los cuales este nemátodo logra mantenerse viable por periodos largos. Uno de ellos es la transformación de la célula muscular. Despommier en 1998 (8), propuso una hipótesis de cómo es que se lleva a cabo dicha transformación, en la cual proteínas tivelosadas que son secretadas por la larva, juegan un papel central. Esas proteínas se encuentran en el nicho intracelular de la larva al día 7 después de la infección (d.p.i) y pueden ser las responsables de redirigir la expresión genómica de la célula hospedera hacia una célula nodriza, cambiando el curso de su

funcionalidad para beneficio del parásito por meses o años considerándose esto como una simbiosis exitosa, además de conferirle una distribución cosmopolita (6).

Este parásito utiliza la secreción de una variedad de proteínas en los diferentes estadios del ciclo biológico, en los que va remodelando la célula muscular a conveniencia propia, resultando en una reprogramación de la expresión genómica. A continuación, serán abordados algunos de los cambios inducidos por el complejo célula nodriza-parásito:

- a) **Pérdida de proteínas musculares.** Especialmente las proteínas contráctiles, tales como actina y miosina, también otras relacionadas al metabolismo. Por otra parte, la creatina cinasa no son detectables al día 8 post-invasión del miocito.
- b) **Alargamiento del núcleo del miocito.** Ocurre en mayor proporción al día 8 post-invasión. Existe una división nuclear y la replicación del DNA ocurre entre los días 4-5 post-invasión, resultando en la generación de un DNA 4N en cada núcleo y en aproximadamente en 40-60 núcleos por célula nodriza.
- c) **Daño mitocondrial.** Caracterizada por la vacuolización de la matriz mitocondrial interna.
- d) **Síntesis de colágeno tipo IV y tipo VI.** La célula nodriza está rodeada por una cápsula de colágeno que consiste predominantemente de colágeno de tipo IV y VI ambos sintetizados por la célula nodriza. La secreción de proteínas del parásito dentro de la matriz de la célula infectada comienza el día 7 d.p.i. La síntesis del colágeno de los tipos IV y VI, comienza entre el día 7 y 8 post-invasión. Durante el periodo de síntesis de colágeno todo el núcleo alargado queda transcripcionalmente activo, dando como resultado una sobreexpresión de estos dos tipos de proteínas colágeno. Posteriormente al día 26 d.p.i., la síntesis de colágeno tipo IV se detiene, mientras que la de tipo VI continua en bajo grado durante la infección, así se deduce que estos dos genes están regulados por dos mecanismos diferentes.
- e) **Angiogénesis.** Proporciona un medio para la adquisición de nutrientes y un dispositivo de desecho en una sola operación, gracias a que *T. spiralis* promueve la formación de una red vascularizada sobre la superficie de la capa de colágeno externa, con el fin de asegurar una fuente constante de metabolitos de bajo peso molecular. El mecanismo por el cual el parásito logra esto, es la iniciación del programa de la angiogénesis, precedido por un evento inicial de hipoxia dentro de

la célula nodriza, que al igual que otras situaciones de hipoxia, se conduce a la sobre regulación del factor de crecimiento endotelio-vascular (*VEGF*, por sus siglas en inglés) el cual dirige la construcción de redes de capilares vascularizadas al comienzo del día 9 post-invasión. Lo anterior proporciona beneficios al parásito para mantenerse por largos periodos de tiempo dentro del huésped.

- f) **Secreción de proteínas tivelosiladas.** La LM de *T. spiralis*, puede secretar más de 40 proteínas diferentes, la mayoría de ellas glicosiladas con un azúcar inusual altamente antigénico, llamado tivelosa (3,6 dideoxi-arabinohexosa). La configuración de este carbohidrato es adquirida en unas células especializadas llamadas esticocitos (del esticosoma del parásito) de la L1 de *Trichinella* (8).

De manera interesante, la reprogramación genética de la célula huésped se lleva a cabo por un sistema común de comunicación. Como se sabe el sistema de comunicación de los mamíferos depende de un gran número de señales moleculares secretadas (citocinas) que dirigen su comportamiento celular específico. De manera muy similar, *T. spiralis* utiliza este tipo de moléculas en su programa de desarrollo, de tal manera dichas moléculas de señalización actúan de manera parácrina, dirigiendo a la célula huésped hacia la transformación de célula nodriza. Aunque la interacción de las moléculas de señalización parácrina se predice de una compleja interacción entre el parásito y la célula mamífera durante la formación de la célula nodriza, su identificación molecular ha sido muy poco caracterizada y en realidad ninguna molécula de todos los péptidos que han sido aislados corresponden al de alguna citocina ó algún mensajero intracelular (9).

PAPEL DE LOS ANTÍGENOS DE *T. spiralis*.

Existen muchas clasificaciones de los antígenos de *T. spiralis*, sin embargo la propuesta por Dea-Ayuela y cols., (10), establece que al igual que todos los demás helmintos, los antígenos de *Trichinella spiralis* pueden ser clasificados de manera global en tres grandes grupos como son:

- 1) De superficie
- 2) Excreción/ Secreción.

3) Componentes somáticos residuales.

1. Antígenos de superficie

Este tipo de antígenos representan el blanco principal del sistema inmune, debido a que proporcionan la interface huésped-parásito, sin embargo también ha sido demostrado que antígenos internos pueden ser expresados en la cutícula interna y de ésta manera mimetizar aquellos cuyo origen es de superficie. La LRN exhibe 4 antígenos principales de 20, 30, 58, y 64 kDa, mientras que la LM (L1) exhibe 4 principales antígenos de 47, 55, 90 y 105 kDa, de los cuales el de 55 y 105 kDa, tienen la capacidad de unirse a lentil-lectina. Otro grupo de antígenos fue identificado en la cutícula de los estadios L2-L4, cuyos pesos moleculares son de 20, 33,40 y 56 kDa. Entre estos antígenos, el de 56 kDa fue distinguible del de 55 kDa de la L1. Por su parte, los antígenos presentes en L4, solo aquellos con peso molecular bajo fueron también mostrados en el estadio adulto (9, 10).

Los α -esticocitos ó α -gránulos son la principal fuente de los antígenos de superficie, los cuales posteriormente son secretados vía esófago. En esta categoría, pertenece un importante grupo de antígenos tivosilados llamados TSL, que serán abordados más adelante.

2. Antígenos de Excreción/Secreción (ESP).

Pueden favorecer la sobrevivencia del parásito, bloqueando el sistema inmune del huésped. Dentro de ésta categoría se agrupan muchas glicoproteínas. (10). Entre algunas de las proteínas funcionales que figuran dentro de los ESP de *T. spiralis*, se encuentran proteínas de choque térmico, endonucleasas, serin proteasas, endonucleasas, proteínas de unión a DNA, inhibidores de serin proteinasas. Aunque los ESP de *T. pseudospiralis* están más bien implicados en eventos de inmunosupresión y de unión a DNA (11). En este grupo se encuentran también los TSL.

3. Componentes somáticos residuales.

Antígenos somáticos constitutivos tienden a ser moléculas ampliamente distribuidas y conservadas. Son menos específicos y más apropiados para propuestas inmunológicas si se comparan con otras fuentes de antígenos. Juegan un importante papel después de la

muerte y destrucción del parásito, particularmente en algunas reacciones patológicas (12).

Antígenos TSL

D.D. Despommier en 1998 (8) propuso una teoría en base a técnicas de análisis inmunológico, en la que describe que los distintos tipos de proteínas antigénicas que se van sintetizando en los diferentes estadios del ciclo de vida desempeñan un papel fundamental en la protección para el parásito y la transformación de la célula invadida. En el característico ciclo de vida del género *Trichinella*, se incluyen estadios extra e intracelulares, promoviendo así las interacciones huésped-parásito y facilitando el reconocimiento del sistema inmune. Esta respuesta ha sido extensamente estudiada en infecciones de origen natural como experimental, partiendo siempre hacia el reconocimiento de epitopos relevantes capaces de despertar una respuesta inmune que sea protectora contra futuras reinfecciones. A este respecto, existen antígenos de este parásito que juegan un papel determinante en la protección del mismo contra de la respuesta del sistema inmune. Estos antígenos pueden ser clasificados en once grupos (TSL-1-TSL-11) de acuerdo a la región de reconocimiento empleando anticuerpos mono y policlonales. Cabe mencionar que de todos ellos, los TSL-1 han sido los más caracterizados hasta hoy, bioquímica e inmunológicamente, ya que son los de mayor importancia desde el punto de vista inmunológico y debido a que se encuentran en la superficie, estos representan blancos del sistema inmune. Por otra parte, también se encuentran como antígenos de excreción-secreción, favoreciendo la sobrevivencia del parásito mediante el bloqueo del sistema inmune del huésped (13).

Los TSL-1 contienen al carbohidrato tivelosa (14). Poco se sabe acerca de las funciones biológicas de esta glicoproteína, no se sabe si las diferentes proteínas que expresan este único carbohidrato están funcionalmente relacionadas, pero fundamentalmente este azúcar es inmunodominante, ya que la mayoría de los anticuerpos monoclonales (MoAbs) dirigidos en contra de los antígenos de la LM de *Trichinella*, poseen reactividad cruzada entre ellos, sugiriendo un origen común. Muchos de los genes que codifican para estos TSL-1, ya han sido clonados (15, 16, 17).

Desde el punto de vista inmunológico, la tivelosa es la porción inmunodominante de las proteínas antigénicas de *T. spiralis* (18), pero a su vez no es determinante en la generación de protección contra el estadio intestinal de la infección; sino más bien parece tener un papel enmascarador de epitopos relevantes (14, 16, 19). Dentro de los antígenos TSL-1 más estudiados se encuentra la glicoproteína de 43-kDa, la cual será explicada en detalle por ser objeto de estudio del presente trabajo.

GLICOPROTEÍNA DE 43 kDa.

Pocos genes de los productos de secreción-excreción y de superficie han sido secuenciados en su totalidad. Uno de ellos es el que codifica para un antígeno perteneciente a los TSL-1, conocido como la glicoproteína de 43 kDa. Se trata de una proteína tivelosilada con 2 motivos del azúcar inusual, sintetizada y después secretada por los α -esticocitos de la LM. Es posible localizarla exclusivamente en el citoplasma de la célula nodriza, a los días 12-15 de la formación de dicha célula. La glicoproteína tiene 344 aminoácidos (fig. 2) y un peso de 43 kDa (aunque algunos autores refieren 45 kDa), pero cuando es deglicosilada tiene un peso aproximado de 32 kDa. (16). La porción peptídica de esta glicoproteína contiene una estructura helice-asa- helice (HLH), deducida a partir de la región básica de aminoácidos (región amino-terminal) sugiriendo que esta proteína estaba implicada en el proceso de transducción de señales de desdiferenciación de músculo. (20, 21). En un principio se pensó que este antígeno podía tener un papel en el desarrollo de la célula nodriza, ya que en estudios inmunohistoquímicos, se encontraba alrededor de los núcleos de la célula nodriza. Sin embargo hasta ahora esta función no ha podido ser demostrada. (22). Por otra parte, la forma deglicosilada de este antígeno no es reconocido por los anticuerpos que reconocen la proteína nativa. El análisis de la secuencia de la glicoproteína de 43-kDa revela que contiene 344 aminoácidos con dos sitios potenciales de N-glicosilación en posiciones 24 y 117, así como la presencia de 2 hélices fuertemente antipáticas que confirman el motivo hélice-asa-hélice (16, 20, 22).



Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de 43 kDa (p43) de *T. spiralis*. Se muestra cada una de las regiones estudiadas en cuanto a niveles de protección a nivel intestinal, generados por la inmunización con péptidos sintéticos. (Elaborada a partir de los datos generados por Robinson et al., 1995 (23) y McGuire et al., 2002 (24).

Anticuerpos dirigidos en contra de la glicoproteína recombinante de 43-kDa, reconocieron la forma nativa purificada de la proteína y dos bandas adicionales ambas bajo glicosilación y no-glicosilación. Esto sugiere que tanto las diferentes variantes de la glicoproteína de 43-kDa con diferente región C-terminal existen ó que las proteínas diferentes muestran al mismo epitope inmunológico. Anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína de 43-kDa purificada, reconocieron la región de 81-120 aa y 121-160 de péptidos sintéticos no protectores, mientras que no reconocieron la región 40-80 aa del péptido protector, sugiriendo que el epitope de esta región en la molécula nativa debe ser enmascarada por carbohidratos (23). El hecho de que el anticuerpo anti-43kDa reconociera al péptido solo en la región 40-80 solo en la región deglicosilada, sugiere que el carbohidrato puede actuar para recubrir una parte del epitope y por lo tanto la glicosilación solo podría constituir una estrategia de evasión frente al sistema inmune del huésped, mediante el recubrimiento funcional de epitopos relevantes (10, 25).

Durante el estadio de LM, la glicoproteína de 43 kDa se almacena en los α -esticocitos de *T. spiralis*, siendo inmediatamente secretada después de la invasión de la células epiteliales de la columna intestinal. De hecho, es posible la detección en suero de la proteína continua a

lo largo de la etapa sistémica de la infección. La determinación del sitio, así como la localización subcelular y la regulación de la expresión y secreción de la glicoproteína de 43 kDa, correlaciona con los cambios morfológicos inducidos en la célula infectada (26).

Por otra parte, se han realizado estudios de protección contra la LM de *T. spiralis*, mediante el uso de péptidos sintéticos derivados de la glicoproteína de 43 kDa. Hasta ahora, los estudios de protección basados en la inmunización con péptidos sintéticos, han mostrado que solo las regiones peptídicas de las posiciones comprendidas entre 40-80 y 210-240 (regiones no glicosiladas) pueden generar protección contra futuras reinfecciones (23, 24). A este respecto, en uno de estos trabajos se demostró que la administración intranasal (i.n) del péptido de 30 a.a, posición 210-240 (RLEMYGSFLAKVMVVNMRIWAVTDNTLQTT), de la gp-43kDa de *T. spiralis* en conjunto con la subunidad b de la toxina del cólera (CTB), fue capaz de inducir una reducción significativa de más del 40%, de la carga parasitaria a nivel intestinal. (24).

Lo anterior representó un avance importante, ya que podría constituir el inicio del desarrollo de nuevas alternativas para controlar esta enfermedad, mediante el uso de antígenos con potencial inmunoproláctico y que a futuro, puedan ser usados en gran escala en animales que constituyen la fuente de infección para el humano. Sin embargo, primero es necesario considerar que existen ciertos aspectos moleculares, antes de seleccionar un blanco de la respuesta inmune, como se revisará a continuación.

SELECCIÓN DE LA SECUENCIA ANTES DE DESARROLLAR LA VACUNA

Los esfuerzos en el control de infecciones por parásitos helmintos se basan principalmente en el tratamiento con fármacos antiparasitarios (derivados benzimidazólicos: albendazol, mebendazol, oxfendazol, entre otros); de hecho, la mayoría de los fármacos antiparasitarios son seguros, baratos y altamente efectivos en contra de un amplio espectro de parásitos. Sin embargo, el alarmante incremento en el número de especies parasitarias que resisten a éstos fármacos, los aspectos relacionados con los metabolitos que dejan en la cadena alimenticia y la falta de nuevos fármacos, estimula el desarrollo de métodos de control alternativos en los cuales, las vacunas juegan un papel central. En la actualidad, las

vacunas contra los parásitos son raras, sin embargo el número de ellas actualmente va en aumento (27, 28).

Al igual que con los proyectos genoma humano y genoma de patógenos microbianos, se ha incrementado el entendimiento de los genomas de parásitos helmintos de importancia médica y económica, además, se tiene mayor progreso en la capacidad de diagnosticar y controlar la propagación de la enfermedad. Aunada a esta información, se podría tener grandes avances en áreas relacionadas que incluyen la biología evolutiva del parásito, la filogenética y la ecología. Mucho de nuestro conocimiento actual, se ha generado a partir de una serie de estudios en helmintos que específicamente infectan a humanos, en particular filarias, tales como *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* y *Onchocerca volvulus* y otros como *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*, los cuales son parásitos que generan enfermedades estudiadas ampliamente por la Organización mundial de la salud, específicamente por la *Tropical Diseases Research branch of the World Health Organisation* (TDR-WHO, por sus siglas en inglés). Mucho del conocimiento generado desde mediados de la década de los 90's, a partir de estas especies de vanguardia, han dirigido a la vacunología y a la helmintología molecular, hacia la era post-genómica (29).

La figura 3 proporciona una idea general acerca de los elementos científicos asociados al desarrollo de una vacuna. Como parte del paradigma moderno, la comprensión de la función de los genes de los parásitos, nos llevarían a la identificación de antígenos útiles, los cuales pueden ser producidos en sistemas recombinantes desarrollados como resultado de la exhaustiva investigación en biotecnología (27, 30).

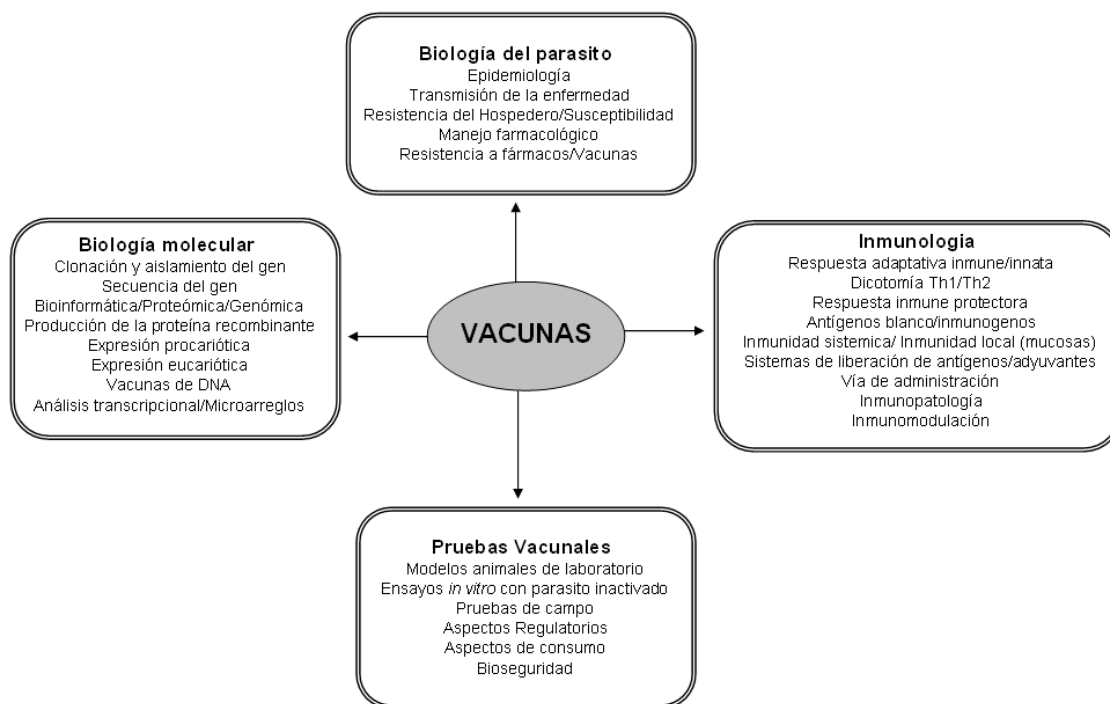


Figura 3. Elementos científicos asociados al desarrollo de una vacuna (30).

SISTEMAS DE EXPRESIÓN

La expresión de antígenos heterólogos en bacterias, representa la forma más sencilla y económica de obtener una proteína recombinante en suficiente cantidad. A este respecto, *E. coli* sigue siendo la bacteria de elección para una producción eficiente de proteínas recombinantes, debido a que es una bacteria bien caracterizada y cuenta con una gran variedad de promotores que la habilitan para ello, pero tiene el inconveniente de que muchas de las proteínas que expresa son insolubles y acumuladas en forma inactiva como cuerpos de inclusión. No obstante, algunas otras proteínas a nivel de citoplasma se encuentran en su forma soluble y pueden ser secretadas hacia el periplasma (véase más adelante) y expresadas en la membrana externa ó ser exportadas hacia el ambiente extracelular (31). Cabe subrayar que es preferible que el epitopo protector sea accesible al sistema inmune, por lo que su expresión en los compartimentos más externo de la bacteria, como la superficie, parece ser una buena opción (28), ya que la exposición/presentación del antígeno en la interface con el huésped, parece ser crucial para la inducción de una

inmunidad protectora. Existen diversos estudios que han empleado a los sistemas de secreción de bacterias gramnegativas, para secretar antígenos ó péptidos heterólogos. A este respecto, las bacterias gramnegativas han desarrollado 5 rutas de secreción para exportar proteínas al medio ambiente extracelular (figura 4).

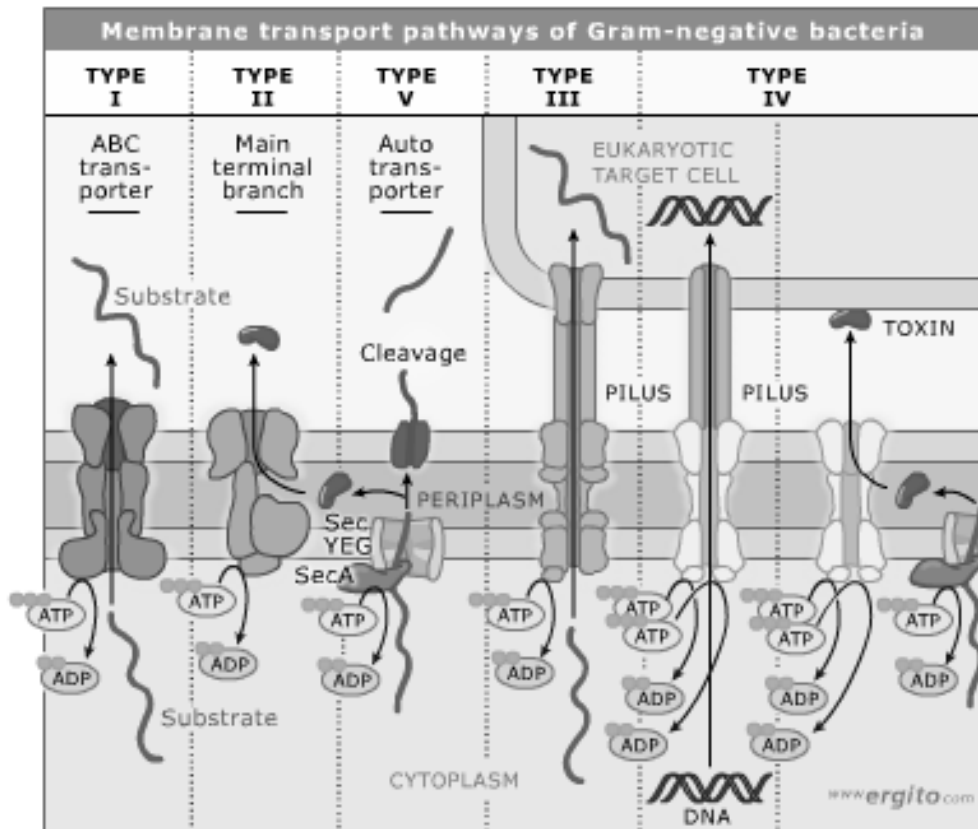


Figura 4. Sistemas de secreción en bacterias gramnegativas (Tomado de www.ergito.com)

El tipo I ó camino de transporte ABC se ejemplifica por la hemolisina A (*Hly A*) de *E. coli.*, exportando sustratos directamente de la membrana interna hacia la membrana externa, sin incluir intermediarios periplásmicos. El tipo II, se ejemplifica por la secreción de la *polulanasa* de *Klebsiella oxytoca* mediante un proceso de dos pasos que involucra una translocación Sec-dependiente, pasando por un intermediario periplásmico. El tipo III ó contacto-dependiente, cuya característica principal es la de aguja, se ejemplifica por la secreción de las proteínas *Yops* de *Yersinia spp.*, para inyectar sus factores de virulencia directamente hacia el citoplasma de la célula hospedera. El tipo IV, muy parecido al

sistema III, es usado para inyectar polímeros de DNA a la célula huésped y finalmente, el tipo V, llamado de *autotransportador* (AT), que también ha sido ampliamente usado para mostrar ó translocar en la superficie bacteriana determinantes antigénicas, como parte de las estrategias vacunales basadas en acarreadores bacterianos (32, 33). Este sistema de secreción, será explicado en detalle, puesto que es de interés para el presente trabajo.

AUTOTRANSPORTADORES (ATs)

El sistema de secreción tipo V ó de Autotransportador (AT), comprende una familia de proteínas con la capacidad de insertarse en la membrana externa de la bacteria (OM), con el fin de exponer antígenos, enzimas, proteínas ó péptidos con funciones que generalmente están implicados en la virulencia de la bacteria (34,35, 36). Klauser y colaboradores fueron los primeros en describir y proponer un modelo para el tipo de secreción V en bacterias gramnegativas, estudiando la relación entre el gen que codifica para la proteasa de la inmunoglobulina A1 (IgA-P) de *Neisseria* y su producto extracelular (37). El nombre de *autotransportador*, se apoya en el concepto de que el precursor de la *IgA-P*, contiene todos los determinantes necesarios para dirigir el transporte de la proteasa desde el periplasma, hasta el medio extracelular, sin la participación de proteínas accesorias. Es decir, no parece requerir del acoplamiento de energía o de algún factor accesorio en el proceso de translocación. A diferencia de los sistemas I y IV, las moléculas blanco para la secreción V son estrictamente covalentes a fin de conectar el β -dominio (dominio translocador) con las proteínas secretadas. De tal forma, han sido descritas cerca de 60 proteínas que siguen este camino de secreción en bacterias gramnegativas (38).

Estructura de los ATs.

En todos los casos las estructuras de los AT siguen el prototipo de la IgA proteasa, la cual está compuesta por 3 dominios (figura 5); la secuencia señal (también llamada péptido señal o secuencia líder), el dominio pasajero (proteína madura por secretar) y la unidad de translocación (ó translocador). La secuencia señal se localiza en el extremo N-terminal de la proteína; su función es dirigir el tráfico de la proteína desde el citoplasma, pasando por el periplasma hasta que esta alcance la OM, para posteriormente expresarse en la superficie bacteriana (donde puede permanecer anclada) ó secretarse hacia el medio extracelular. Por su parte, el dominio pasajero (ó dominio α) confiere las diversas

funciones efectoras de varios AT (38). Finalmente, el dominio translocador localizado en el extremo C-terminal de la proteína es la unidad de translocación (también llamada dominio β ó dominio C) que consiste en una región *linker* corta que sirve de puente para conectarse con el dominio pasajero. Posee además, una estructura secundaria α -helice y un β -core que adopta la forma de una estructura terciaria de β -barril con capacidad de insertarse en la OM de la bacteria gracias su elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos; facilitando así el transporte del dominio pasajero a través de la OM. Generalmente el dominio β consiste de 250 a 300 aminoácidos. De manera interesante, todos los dominios β de los AT poseen un alto grado de homología, pero son extremadamente diversos en su secuencia. (34, 38).

Eventos durante la secreción

La forma en que ocurre la secreción del dominio pasajero, primero está dada por la secuencia señal que determina el tránsito periplásmico, sitio donde el AT existe como un intermediario periplásmico. Puede haber un plegamiento del dominio pasajero antes o después de transitar por el periplasma ó simultáneamente con su localización a través de la OM con la presencia de un chaperona intramolecular en BrkA a nivel de periplasma. Por otro lado, la proteína es susceptible a corte proteolítico por enzimas que residen en el periplasma (38).

La lista de AT conocidos y caracterizados es creciente. En la actualidad se conocen cerca de 60 proteínas que cumplen con las características propias de la familia de los de ATs, las cuales han sido subclasificadas en 11 grupos mediante un análisis filogenético (34, 35, 36, 38).

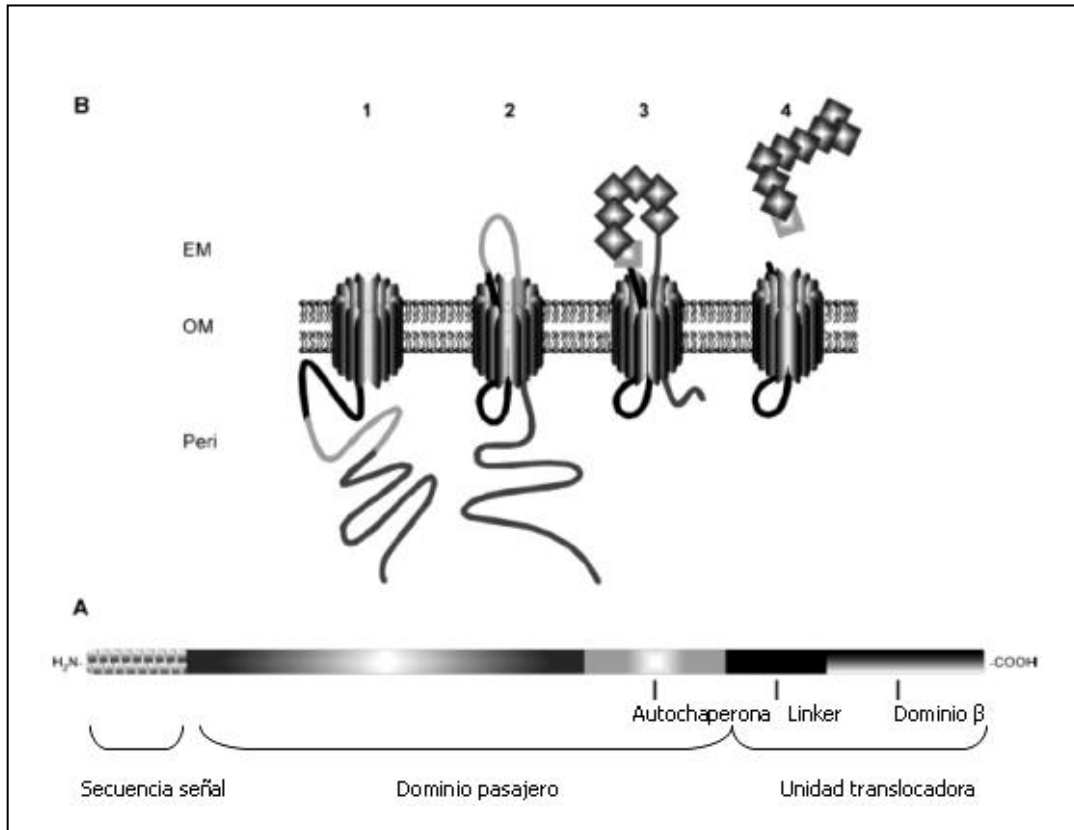


Figura 5. Sistema de secreción tipo V ó autotransportador (AT). (A) Estructura primaria del AT. Cada uno de los dominios principales implicados en la secreción es indicado. (B) Secreción del dominio pasajero a través de la membrana externa. Paso 1: inserción del dominio β en la membrana externa y formación del poro central común en el β -barril. Paso 2: La región linker dirige la secreción a través del poro. Paso 3: El dominio de autochaperona activa el plegamiento del dominio pasajero tan pronto como este emerge del β -barril. Paso 4: Una vez plegado el dominio pasajero, este es expuesto en la superficie de la bacteria y finalmente la molécula efectora se libera hacia el medio extracelular después de un corte proteolítico. Los cuadros representan la forma plegada ó madura del polipéptido. Peri: periplasma; EM: medio extracelular; OM: membrana externa. Tomada de Desvaux, et al., 2004, (38).

El autotransportador ShdA y otras de sus funciones.

ShdA es el AT más recientemente descrito. Pertenece a los grupos 3 y 4 (ó familia de AIDA-I) (38). Se describió como una proteína de membrana externa restringida a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, cuya estructura primaria reunía las características propias de la familia de los AT. Es una proteína codificada por el gen *shda*, cuyo tamaño es de 6831 pb y que está localizado en una isla de patogenicidad (PAI), lo que desde un principio sugirió que esta proteína podría tener un importante papel en la virulencia de *Salmonella* (39). Posee un dominio C-terminal conformado por 447

residuos. La secuencia de esta región presentó homología con 440 residuos del dominio C-terminal de AIDA-I de *E. coli* lo que equivale a un 34% de identidad (40). También presenta homología en un 36% con el AT MisL de *Salmonella* (41, 42) y en un 30% con IcsA (VirG) de *Shigella flexneri* (43). Adicionalmente, el extremo C-terminal contiene 5 copias de un repetido de 12 aminoácidos, el cual no exhibió homología a secuencias disponibles en la base de datos (figura 6).



Figura 6. Estructura primaria de ShdA. Hacia el extremo amino se encuentra la secuencia señal, la cual es cortada por proteasas a nivel de periplasma. El dominio pasajero que es propiamente la proteína madura por secretar ó translocar hacia la superficie bacteriana y el dominio translocador que es la región con capacidad para insertarse en la membrana externa de la bacteria. Tomada de Kingsley et al., 2004 (44).

El dominio N-terminal (dominio pasajero: aminoácidos 61-1553) no exhibió homología a las secuencias disponibles en el gene-bank, pero contiene 9 copias de repetidos de 63 aminoácidos y 3 copias de repetidos de 102 aminoácidos. (44). ShdA solo es expresado por aquellos serotipos de *Salmonella enterica subespecie 1* que están frecuentemente asociados con la enfermedad. De hecho, *Salmonella enterica subespecie 1*, posee uno o más genes que abilitan a éstos patógenos para invadir, persistir y extenderse dentro de las poblaciones de huéspedes de sangre caliente, resultando en la introducción de estos patógenos en los alimentos y en la generación de la enfermedad en animales domesticados y en el hombre. (45, 46).

Mutaciones de ShdA a nivel del dominio pasajero, resultan en la eliminación de un bajo número de bacterias en las heces fecales, pero en un corto período de tiempo. De aquí

el nombre de ShdA (de la palabra en inglés *shedding*, que significa eliminar). Adicionalmente, estas bacterias mutantes en *shda*, mostraron una reducción en la capacidad de colonizar el intestino grueso, un órgano que sirve como principal reservorio de este serotipo, en modelo murino. Esto se debe a que la fibronectina de la matriz extracelular es un receptor de ShdA (45, 47). Por otra parte, se conoce que la región no repetida de ShdA tiene una actividad de unión completamente independiente, lo cual sugiere la posibilidad de que esta región puede no ser necesaria para la secreción ó correcta presentación del dominio de unión al ligando (región repetida) en la superficie de la bacteria y de ésta manera, solo ser requerida para facilitar la interacción con la fibronectina ú otros ligandos durante las infecciones naturales (48).

El uso de ShdA en el desarrollo de vacunas basadas en acarreadores bacterianos vivos y atenuados ha sido recientemente explorado por nuestro grupo de investigación. Se ha demostrado la utilidad del autotransportador MisL para presentar en la superficie de *E. coli DH5α* y de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium SL3261* el epitopo inmunodominante de células B NANP y la proteína circunsporozoítica (CSP) de la cual se deriva, ambos de *P. falciparum* (42). De manera análoga, se ha demostrado la utilidad de 3 formas recombinantes de ShdA para translocar hacia la superficie de *E. coli DH5α* y de *Salmonella entérica* serovar *Typhimurium SL3261* los antígenos NANP, CSP (de *P. falciparum*) y ESAT-6 de *M. tuberculosis* (49).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La triquinelosis es una zoonosis emergente y reemergente de amplia distribución mundial cuya vacuna aún no existe. Un mayor entendimiento de los genomas de parásitos helmintos de importancia médica y económica, permitirá un mayor progreso en nuestra capacidad de diagnosticar y controlar la propagación de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Clonar un péptido de 30 aminoácidos derivado de la glicoproteína de 43 kDa de *T. spiralis*, que pueda expresarse en la superficie de *E. coli* mediante el autotransportador ShdA.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Obtener la secuencia que codifica para el péptido de 30 residuos (ag30) derivado de la gp-43kDa, mediante PCR por acoplamiento en ausencia de templado.
- 2) Verificar la amplificación de la secuencia codificante mediante electroforesis en geles de agarosa.
- 3) Subclonar la secuencia ag30 en el plásmido pENP-01, mediante herramientas de ingeniería genética.
- 4) Evaluar el estado de la construcción mediante análisis de restricción y secuenciación automatizada.
- 5) Verificar la expresión del péptido Ag30 en extractos totales de *E. coli* DH5 α , mediante SDS-PAGE y Western-blot.
- 6) Evaluar la expresión del péptido en la superficie de *E. coli* DH5 α mediante inmunofluorescencia indirecta.

HIPÓTESIS:

La subclonación de la secuencia que codifica para el péptido Ag30 de *T. spiralis*, río arriba de la secuencia que codifica para el AT ShdA en el plásmido pENP, permitirá la expresión del péptido en la superficie de *E.coli DH5α* .

VARIABLES

Independiente:

- Cepa bacteriana: *E.coli DH5α* .
- Transformación con 100 ng de los plásmidos pENP-01 y pAg30
- Cultivos bacterianos de *E.coli DH5α* con una D.O_{450 nm}. de 1.0.
- de 5-6 horas, crecidos en medio tioglicolato y bajo condiciones microaerofílicas *in vitro*.
-

Dependiente:

- Expresión del péptido Ag30 de *T. spiralis* en la superficie de *E.coli DH5α* mediante el sistema de expresión plasmídico que contiene el gen de ShdA.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Existen diversos trabajos en los que se demuestra que uno de los primeros pasos antes de desarrollar una vacuna, es la producción del antígeno como péptido ó proteína recombinante, con la finalidad de ver si se conservan sus propiedades estructurales, bioquímicas, funcionales e inclusive inmunológicas. Es por ello que el uso de un plásmido en *E. coli DH5α* como sistema de expresión, resulta atractivo en este sentido, ya que ofrece ciertas ventajas entre las que se destaca, la facilidad de manipularlo genéticamente y así expresar un antígeno heterólogo en forma estable, en cantidades suficientes y en el compartimento deseado, lo cual determinará el tipo de respuesta. A este respecto, el uso del autotransportador *ShdA*, permitirá la expresión eficiente del antígeno Ag30 de *T. spiralis* en la superficie bacteriana dado que esta molécula posee tolerancia estructural durante el proceso de translocación.

TIPO DE ESTUDIO

Experimental.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Bacterias del género y especie *E.coli*, cepa *DH5a*.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Clonas de *E. coli DH5a* que expresen en su superficie el autotransportador ShdA fusionado a los péptido bandera FLAG y Ag30 de *T. spiralis*, bajo condiciones anaeróbicas y/o microaerofílicas *in vitro*.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Clonas de *E. coli DH5a* que modifiquen el marco de lectura de la proteína de fusión y que por lo tanto no expresen la fusión ShdA-FLAG-Ag30.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN: Clonas de *E. coli DH5a* que muestren signos de muerte por toxicidad de la proteína de fusión, durante el estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

EQUIPO

- Agitador orbital Shaker
- Termociclador Master Eppendorf
- Espectrofotómetro
- Vórtex
- Microscopio de epifluorescencia
- Centrífuga refrigerada
- Microcentrífuga
- Incubadora
- Analizador de imágenes KODAK
- Transiluminador
- Cámara horizontal de electroforesis para DNA Biorad®
- Cámara vertical de electroforesis para Proteínas Biorad®
- Cámara horizontal de electroforesis para DNA Biorad®
- Cámara vertical de electrotransferencia de Proteínas Biorad®
- Ultracongelador REVCO
- Fuente de Poder Biorad®
- Horno de hibridación
- Horno de microondas SAMSUNG®

MATERIAL

- Mechero
- Asa bacteriológica
- Micropipeta Finnpiette Eppendorf® de 0.2-2.0 μ L
- Micropipeta Finnpiette Eppendorf® de 2-20 μ L
- Micropipeta Finnpiette Eppendorf® de 20-200 μ L
- Micropipeta Finnpiette Eppendorf® de 200-1000 μ L
- Tubos de centrifugación FALCON® de 15 y 50 mL
- Microtubos Eppendorf® de 500 y 1500 μ L
- Cajas petri de vidrio estériles
- Pipetas graduadas de 10 mL.
- Cronometro DAIGGER®
- Frascos de cultivo de 250 mL PIREX®
- Tubos de polipropileno para midiprep CORNING®
- Frascos de polipropileno para midiprep CORNING®
- Gasas estériles
- Membranas de secado para geles de poliacrilamida Promega®

REACTIVOS

- Enzimas de restricción: *Bam HI*, *Hind III*, *XhoI*, *Sac I*, *SpeI* de 15 U/ μ L c/u, NEB®
- Enzima DNA polimerasa termoestable: *Taq platinum* 5 U/ μ L Invitrogen®
- Enzima T4 ligasa 10 U/ μ L NEB®.

- Marcador de tamaños moleculares de 1 kb y de 100 pb NEB®.
- Marcador de tamaños moleculares de proteínas NEB®.
- Anticuerpo primario monoclonal anti-FLAG biotilado Sigma®.
- Anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG de ratón acoplado a HPO Zymed®.
- Anticuerpo secundario monoclonal anti-IgG de ratón acoplado a FITC Zymed®.
- Streptavidina conjugada a HPO Zymed®.
- Streptavidina conjugada a FITC Zymed®.
- Ampicilina Sigma®.
- *Gel resolving 12 %* (Acrilamida-Bisacrilamida 30% , 2.9 mL de Buffer Tris 1M, 234 mL de SDS al 10%, 117µL de NaCl al 20 % , 20µL TEMED, agua destilada 3.6 mL, pH 8.8.
- *Gel stacking*: 1.25mL de Tris 1M pH 6.8 , 1.3 mL de Acrilamida al 30 % , 50 µL de Persulfato de amonio al 10% (APS), 10µL de TEMED, 7.0 mL de Agua destilada.
Buffer TAE 1X: 4.84g. de Tris base, 1.142mL. de ac. Acético glacial, 7.4 g. de Na₂EDTA•2H₂O, Agua destilada cbp 1L.
- Buffer de corrimiento: 15.1 g de Tris base, 94g de glicina, 50 mL de SDS 10%, agua destilada cbp1L.
- Buffer de transferencia: Tris-base 6 g, glicina 28.83 g, 400 mL de metanol (grado biología molecular) .
- Buffer salino de fosfatos PBS 1X: 8 G. de NaCl, 0.2g. de KCl, 1.15g.Na₂HPO₄, 0.2 g. KHPO₄, cbp 1L agua destilada.
- Solución de Azida de sodio al 10%
- Leche descremada al 5% en buffer PBS
- 1,4-cloro- α -naftol Sigma®.
- Metanol absoluto JTBaker®.
- Peróxido de hidrógeno al 70% JTBaker®.
- Agua destilada
- Bromuro de etidio Sigma®.
- Solución fijadora: (Metanol, Ac. Acetico, Agua destilada (porción 45:10:45)
- Solución de Azul de Coomassie: 0.25g. de azul de Coomassie, 90 ml. de MeOH y Agua (1:1), 10 ml. de Ac. Acético glacial.
- Solución decolorante: 30 ml. de MeOH, 10 ml. de Ac. Acético, 60 ml. de Agua destilada.

KITS comerciales

- QIAGEN® Filter Plasmid Midi.
- QIA quick gel Extracción QIAGEN®

CEPA BACTERIANA

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Escherichia coli DH5α</i>	SupE44 Δ lac 169Φ 80lac ZΔM 15hsd R17 recA1 endA1 gyrA 96 thi- 1re1A1	Invitrogen®

Tabla 2. Características de la cepa bacteriana empleada. El agente de selección para esta cepa es la resistencia a la ampicilina.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PLÁSMIDOS

Plásmido pENP-01. Contiene a promotor *nirB* (42) seguido de la secuencia señal de la LTB fusionada a un sitio múltiple de clonación artificial (LINKER) con 5 sitios de restricción para las enzimas Xba I, Hind III, Spe I, Sal I y Xho I. Río abajo, se encuentra la secuencia codificante de FLAG y la forma acotada A de ShdA (ShdA-A). El destino final de la proteína de fusión es la superficie de la bacteria. (Figura 7).

Plásmido pAg30. Contiene a promotor *nirB* seguido de la secuencia señal de la LTB fusionada a la secuencia que codifica para el epitopo de 30 aminoácidos (Ag30) derivado de la glicoproteína de 43 kDa de *T. spiralis*. Río abajo, se encuentra las secuencias correspondientes a FLAG y ShdA-A. El destino final de la proteína de fusión es la superficie de la bacteria. (Figura 7)

NOMBRE	SECUENCIA
Triqui-1	5' CTC TAG AAG CTT CGC CTG GAG ATG TAT GGT TCG TTC CTG GCC AAG GTG ATG GTT GTG AAC ATG CGT ATT T 3'
Triqui-2	5' CGC CGC CTC GAG GAG CTC CGT GGT CTG CAG GGT ATT ATC AGT CAC CGC CCA AAT ACG CAT GTT CAC AAC C 3'
PNIR-1*	5' TTA TCG CGA CAT ATG AAA GTC TCC TGT GGA 3'

Tabla 3. Oligonucleótidos** empleados. *Usado en la secuenciación automática. **Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Accesolab®.

ESTRATEGIA GENERAL DE CLONACIÓN

La preparación de las cepas bacterianas, la manipulación genética, así como las técnicas de biología molecular, tales como obtención y preparación del DNA, PCR, electroporación, transformación con los plásmidos, se realizaron de acuerdo a los protocolos de Sambrook (50) y de acuerdo a las indicaciones de los *kits* comerciales empleados. A partir del plásmido *pENP-01* para construir el plásmido *pAg30*. Brevemente, el plásmido *pENP-01* se cortó con las enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I* con la finalidad de dejar los mismos extremos cohesivos del inserto. Posteriormente, este se ligó con la secuencia codificante del epítipo Ag30 (véase más adelante) en presencia de T4 ligasa. Finalmente, el plásmido resultante *pAg30* se analizó con las enzimas de restricción *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I* y *Xho I*. Se consideraron clonas positivas todas aquellas clonas que perdieron los sitios *Spe I* y *Sal I* e incrementaron su tamaño en 108 pb. La estrategia de clonación se representa en la figura 7.

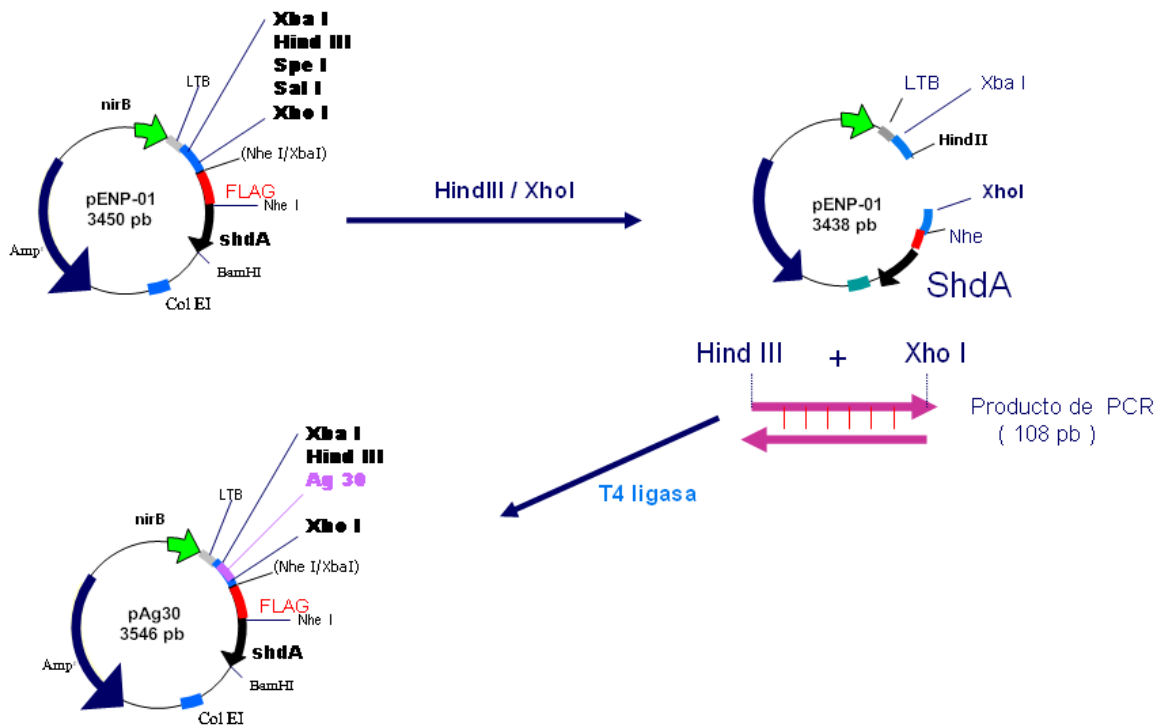


Figura 7. Estrategia de clonación. El plásmido *pENP-01* se cortó con las enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I*. El cual se ligó al producto de PCR que codifica para el antígeno Ag30 de *T. spiralis* (previamente digerido con las enzimas anteriormente señaladas). El plásmido resultante es el *pAg30*.

a) Generación de la secuencia codificante del péptido Ag30.

La generación de la secuencia codificante del Ag30, se llevó a cabo mediante una PCR por acoplamiento en ausencia de templado (fig. 8a). Se preparó una reacción a un volumen final de 30 μ L y que contenía 20 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos *Triqui-1* y *Triqui-2*, amortiguador de amplificación (Tris-HCl/KCl), $MgCl_2$ 1.5 mM, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 2mM, agua destilada estéril y 2.5 U de *Taq polimerasa platimun* (Accesolab[®]). La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient*[®]. El programa de temperaturas empleado en este trabajo es esquematizado en la tabla 4. Es importante aclarar que primero fue necesario llevar a cabo un gradiente de temperaturas en la PCR, con la finalidad de determinar la temperatura de alineamiento (T_m) adecuada. La reacción llevada a cabo durante el gradiente de temperaturas comprendió temperaturas de 65.9 °C a 77 °C. Posteriormente, el producto de la amplificación se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, teñidos con 0.0002% de bromuro de etidio. Se incluyó un marcador de tamaños moleculares de 100 pb (Invitrogen[®]) para verificar el peso del producto. Posteriormente 600 ng de este producto se cortaron con 40 U de las enzimas *Hind III* y *Xho I* (*New England Biolabs*[®]). Previo al siguiente paso, en todos los casos se realiza una purificación por columna Gene-Clean Qiagen[®]. Finalmente la pureza y tamaño del inserto cortado se verificó en electroforesis en geles tanto de agarosa al 2.5%, como de acrilamida al 20% .

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)
Desnaturalización previa	94	3
Desnaturalización	94	0.25
Alinamiento (T_m^*)	77	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	10
Enfriamiento	4	∞

Tabla 4. Programa de temperaturas durante las diferentes etapas de la PCR por acoplamiento en ausencia de templado para la generación de la región codificante del Ag30. T_m^* indica que en esta etapa se aplicó un gradiente de temperaturas, cuyas T_m fueron 65.9, 66.2, 67.2, 68.7, 70.5, 72.6, 74.8 y 77°C.

b) Preparación del vector abierto *pENP-01* para la subclonación de *ag30*.

500 ng de plásmido *pENP-01* purificados mediante columna Plasmid Midi Qiagen[®], se sometieron a una digestión doble con las enzimas *Hind III* y *Xho I*. El plásmido cortado se separó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con 0.0002% de bromuro de etidio. Posteriormente este producto de digestión se purificó a partir del gel mediante columnas comerciales *Qia quick gel extraction* Qiagen[®]. Finalmente se verificó la pureza y el tamaño del vector abierto mediante electroforesis en agarosa al 1%.

c) Construcción de *pAg30*

Se ligaron 100 ng de plásmido *pENP-01* (abierto con enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I*) con 700 ng del producto purificado que codifica para *Ag30*. La reacción de ligación incluyó 10 U de T4 ligasa (*New England Biolabs*[®]), amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, KCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, BSA 200µg/mL y 50% de glicerol. El producto de la ligación se transformó en *E. coli DH5α* por choque térmico (*véase más adelante*). La selección de clonas positivas se realizó mediante la extracción de plásmido por la técnica de miniprep (Sambrook, 2001) y analizando el patrón de restricción con las enzimas *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I*, *Xho I*, *BamHI* y *NheI* (*New England Biolabs*[®]). Se consideraron clonas positivas todas aquellas clonas que perdieron los sitios *Spe I* y *Sal I* e incrementaron su tamaño en 108 pb.

d) Purificación de los productos de PCR y del vector abierto *pENP-01*.

Los fragmentos de PCR amplificados por PCR presentes en cada banda, así como las bandas correspondientes al vector *pENP-01* abierto con las enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I*, deben ser purificados antes de la subclonación y pasos subsiguientes, tales como secuenciación, con la finalidad de eliminar el exceso de dNTPs, buffer de cada una de las enzimas, oligonucleótidos ó enzima. Las bandas escindidas de cada uno de los productos de interés, se purificaron mediante columnas *gene-clean* de *QIAGEN*[®] con algunas modificaciones. La banda de interés se colocó en un tubo eppendorf limpio y estéril con 500 µL de solución QG (solubilization buffer) y se incubó a 55°C por 10 minutos agitando por inversión 2-4 veces ó hasta lograr completa disolución del gel. Se depositó el volumen anterior en la columna en volúmenes de 800 µL y se centrifugó en un microfuga modelo ALC micro Centrigette 4214, a 5000 rpm por un minuto. Se eliminó el

líquido y se trabajó con la columna. Esta última recibió tres lavados con 600 μ L de solución PE (wash buffer, incubando durante 1 minuto con el buffer y centrifugando a 6000 rpm en cada lavado. Secar la columna centrifugando a 13000 rpm con la tapa abierta de columna, eluir con 30 μ L de agua inyectable precalentada a 60 °C e incubando por 1 minuto antes de centrifugar y recuperar el DNA eluido en un tubo eppendorf limpio y estéril. Se analizó el tamaño, la cantidad y calidad del DNA recuperado, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en el caso de plásmido abierto y al 2.5% para los productos de PCR.

e) Electroforesis en geles de agarosa.

Tanto los productos de amplificación por PCR, como los plásmidos de cada una de las clonas fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa. Para la preparación del gel de agarosa 1% y 2.5%, se realizó el siguiente procedimiento: se disolvieron 1 g y 2.5 g, respectivamente de agarosa (grado biología molecular, Promega[®]) en 100 mL de solución TAE 1X en un matraz de Erlenmeyer, se calentó la mezcla en un horno de microondas (Samsung[®]) hasta disolver completamente la agarosa y se adicionó bromuro de etidio (Invitrogen[®]) a una concentración final de 0.625 mg/mL. La mezcla fué vaciada en un portageles de una cámara de electroforesis (modelo Mini-Sub Cell GT electrophoresis Biorad[®]). Una vez formado el gel, este se cubrió en su totalidad con TAE 1X. Las muestras de DNA por correr se mezclaron 1:1 con buffer de carga (ver apéndice) y se depositaron en cada uno de los pozos del gel. Un pozo fué utilizado para depositar 3 μ L de marcador de pesos moleculares de 1 kb ó 100 pb, según el tamaño esperado. Se aplicó una voltaje para el corrimiento de 75 V hasta lograr que el frente corrimiento llegara a $\frac{3}{4}$ partes del gel. Los geles fueron observados en un trasiluminador de luz U.V., fotografiados con una cámara digital Kodak[®] EDAS 290 y evaluados en un analizador de imágenes Kodak[®] versión ID 3.6.

f) Transformación de *E. coli DH5 α* por choque térmico.

Células competentes de *E. coli DH5 α* , mezcladas con 100 ng del producto de ligación (inserto ag30 + plásmido abierto pENP-01) se sometieron a choque térmico de 42 °C por un minuto en un Block Thermomixer compact Eppendorf[®], sin agitación e inmediatamente se colocó en hielo (4 °C) por 30 minutos. Posteriormente la mezcla

bacteria / plásmido se transfirió a 2 mL de medio SOC (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, MgCl₂, KCl 2.5 mM, NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron a las transformantes por 2 horas a 37 °C en el agotador orbital Shaker®. Al final, el crecimiento bacteriano de las transformantes se plaquearon en cajas petri con medio BHI agar suplementado con ampicilina 100µg/mL y se incubó a 37°C toda la noche. Los controles empleados en este experimento se muestran en la tabla 5.

MEDIO	CULTIVO	FUNCIÓN
BHI	Células competentes	Control de viabilidad
BHI+Ampicilina	Células competentes	Control de viabilidad/Resistencia
BHI+Ampicilina	Recombinantes	Transformación
BHI+Ampicilina	Recombinantes diluidas.	Transformación

Tabla 5. Controles usados en la transformación de *E. coli DH5α*

g) Técnica de Miniprep para seleccionar clonas positivas.

Al día siguiente, a partir de la placa con las transformantes, se seleccionaron 50 colonias y se tomó una asada de cada una y se crecieron durante 10 horas a 37°C, en medio líquido caldo BHI (suplementado con ampicilina 100µg/mL). Se tomó 1.0 mL de estos cultivos y se pasaron de forma independiente a microtubos de 1.5 mL. Posteriormente se cosechó el botón a 10000 rpm y se resuspendió en 200 µL de buffer P1 (Tris-Cl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM, 100µg/mL de RNAasa). Con ayuda del vórtex se mezcló y se centrifugó a 10000 rpm 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 200 µL de buffer P2 (NaOH 200mM; SDS 1%). Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, mezclando ocasionalmente por inversión. Se adicionó 200 µL de buffer P3 (Acetato de potasio 3 M; pH 5.5) y se incubó en hielo por 10 minutos. Para recuperar el plásmido, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 30 min a 4°C. El DNA plasmidico en el sobrenadante resultante se precipitó con isopropanol frío y se lavó con etanol al 70%. Las muestras con los plásmidos se concentraron a 45°C y al final el plásmido se resuspendió con 30 mL de agua inyectable. Se analizaron los plásmidos de cada una de las colonias (clonas) por patrón electroforético en geles de agarosa al 1%.

h) Técnica de Midiprep para obtención de plásmido pAg30 puro.

Se realizó según las recomendaciones del kit comercial QIAGEN Filter Plasmid Midi[®]. A partir de una caja con crecimiento de no más de 24 horas, se inoculó una asada de la clona positiva para pAg30 a un matraz con medio caldo BHI suplementado con ampicilina a una concentración de 100 mg/mL. Se centrifugó a 6000 rpm. durante 15 minutos a 4°C y se recuperó el botón bacteriano para resuspenderlo en 10 mL. de buffer P₁. con vortex. Se adicionaron 10 ml. de buffer de lisis P₂ a temperatura ambiente y se homogenizó por inmersión 4-6 veces hasta observar la formación de un liquido claro transparente viscoso (máximo 5 minutos). Se adicionó 10 mL de buffer P₃ y se incubó a 4°C por 10 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 13000 rpm a 4°C y se pasó a través de una columna tip 100 Qiagen[®], previamente equilibrada con buffer QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM; pH 7.0; isopropanol 15%; Tritón X-100 0.15%). La columna se lavó 2 veces con 10 mL de buffer QC (NaCl 1.0 M; MOPS 50 mM; pH 7.0; isopropanol 15%). Finalmente se eluyó el plásmido de la columna con 7 mL buffer QF (NaCl 1.25 M; Tris-Cl 50 mM; pH 8.5; isopropanol 15%). Se centrifugó a 13000 rpm (30 min, 4°C) y se lavó con etanol al 70%. El plásmido se secó toda la noche a 37°C y al día siguiente se resuspendió en 400 µL de agua inyectable. Este plásmido puro se usó para secuenciar.

i) Análisis de restricción de las clonas positivas.

La selección de clonas positivas se realizó mediante análisis de restricción con la enzimas *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I*, *Xho I*, *BamHI* y *NheI* (New England Biolabs[®]). Para ello, 150 ng de plásmido se digirieron con 10 U de cada una de las enzimas. Se consideraron clonas positivas todas aquellas clonas que perdieron los sitios *Spe I* y *Sal I* e incrementaron su tamaño en 108 pb.

j) Secuenciación automatizada del plásmido pAg30.

Este procedimiento fue llevado a cabo por el personal del secuenciador del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En este proceso, se realizó una reacción adicional de PCR en la que se utilizó el kit *Big Dye terminator* (Applied Biosystems[®]) y plásmido pAg30 como templado (purificado por la técnica de Midiprep). La reacción se realizó

preparando un volumen de 30 μL el cual contenía 10 ng de plásmido pAg30, 4 μL de la solución *kit Big Dye terminator*, 20 pmoles de oligonucleótido PNIR-1 y cuanto bastase para 20 μL de agua destilada estéril libre de DNAasa. El programa de amplificación incluyó: desnaturalización a 97°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 15 segundos, extensión a 60°C por 4 minutos. El producto de amplificación se purificó en una columna *Centrisep*[®]. El producto de amplificación recuperado se resuspendió en 25 μL de amortiguador de carga TSR (Applied Biosystems[®]) y se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos. Finalmente, la muestra se colocó en el secuenciador automatizado Genetic Analyzer 310 de Applied Biosystems[®], y se inició el análisis siguiendo las indicaciones del equipo.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

a) Inducción en condiciones anaeróbicas in vitro.

Las cepas (congeladas a -80°C) fueron descongeladas y sembradas en medio sólido Infusión cerebro-corazón (BHI agar BIOXON[®]) suplementado con 2 μL de 2,3-ácido dihidroxibenzoico (DHB) al 0.01% (Sigma, St. Louis, Mo) y 3 μL de ampicilina (Sigma[®]) por cada mL de medio de cultivo. La incubación se llevó a cabo a 37°C por 24 h en una incubadora Precision-Economy Incubator (Modelo 5EG). Para inducir las, a partir del cultivo en medio sólido, se tomó una asada en condiciones de esterilidad, y se inocularon las cepas en 45 mL de medio líquido tioglicolato (un medio reductor que favorece la inducción de la expresión proteica de todas las cepas, ya que estas se encuentran bajo el control del promotor *nirB*, el cual es inducible en anaerobiosis). Los 45 mL de medio tioglicolato, fueron suplementados con 135 μL de ampicilina y 90 μL de DHB al 0.01%. Se incubó a 37°C con agitación constante de 250 rpm en un aparato Orbit Lab-line Environ-Shaker[®]; hasta lograr un crecimiento bacteriano cuya densidad óptica $\text{DO}_{540\text{ nm}}$ de 1.0 (aproximadamente 5-6 horas de incubación).

b) Extracción de proteínas totales (PT)

A partir de los cultivos anteriores, se tomó una alícuota de 1 mL (equivalentes a 1×10^9 UFC/mL) de cada uno de los cultivos inducidos y no inducidos y se centrifugó en una microcentrífuga (modelo ALC micro Centrigette 4214) a 6000 rpm a T°C ambiente.

Se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano se lavó 4 veces con 1.5 mL de SSI. La pastilla bacteriana final, se resuspendió con 50µL de agua destilada y se adicionó 50µL de buffer muestra para proteínas (ver apéndice). Las muestras se desnaturalizaron por ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar, se pasaron por jeringa Hamilton a fin de homogenizar. Se tomó una alícuota de 3 µL para cuantificar según el método de Bradford.

c) Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).

Las muestras de proteínas con una concentración de 30µg/mL, se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12.5%, en condiciones reductoras según el método de Laemmli (51). La separación fue llevada a cabo en una cámara de electroforesis vertical (BioRad®, modelo Mini-Protean 3 Cell). Se utilizó buffer de corrimiento Tris-Glicina y las condiciones del corrimiento fueron a 35 mA por una hora. De los 2 geles resultantes, uno se fijó (por 3 horas), se tiñó con colorante azul de Coomassie por 30 min y se decoloró hasta obtener una visualización nítida ó clara de las bandas de las proteínas. Finalmente el gel de poliacrilamida se secó en medio de una membrana (Gel drying Promega) que se encuentra en un soporte de acrílico.

Por otro lado, el segundo gel de poliacrilamida, fue de utilidad para realizar el ensayo tipo Western-blot.

d) Western-blot ó Inmunoelectrotransferencia (IET)

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa ó de nylon cargada positivamente (Boehringer-Mannheim^R), usando una cámara vertical de transferencia (BioRad Mini Trans-Blot Cell 2005). La transferencia fue llevada a cabo a 150 V por una hora. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con 10 mL de PBS-leche descremada Sveltis[®] al 5% toda la noche. Al día siguiente se lavó con 10 mL de PBS 1X y se incubó durante toda la noche con 5mL del anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado Sigma-Aldrich[®] en dilución 1:250. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno, con 10 mL con PBS 1X. Se adicionaron 5 mL de Streptavidina Zymed[®] conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) diluído 1:500. Se incubó durante dos horas. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS 1X de 10 mL de 5 minutos cada uno.

Todas las incubaciones y los lavados se realizaron en un horno de hibridación Amersham Pharmacia Biotech, a temperatura ambiente y a 25 rpm. Finalmente se reveló con peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol, (ver apéndice). La reacción se detuvo con agua destilada ó PBS.

e) Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de *E. coli DH5α*

Se cultivaron las cepas bajo condiciones reductoras (anaerobiosis) hasta lograr un $D.O_{540\text{ nm}}$ de 1.0. Se tomó una alícuota equivalente a 1×10^8 bacterias y se depositó en microtubo eppendorf de 1.5 mL. Se lavó tres veces con PBS 1X estéril, centrifugando a 6000 rpm en cada caso. El botón bacteriano se resuspendió en 60 μ L de Ac Mo anti-FLAG biotinilado Sigma-Aldrich[®] dilución 1:50. Se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación constante a 600 rpm en un Block Thermomixer compact Eppendorf[®]. Se lavó dos veces las bacterias con 1.5 mL de PBS 1X estéril, centrifugando a 6000 rpm en cada caso. El botón bacteriano, se resuspendió con 60 μ L del segundo anticuerpo, una IgG de cabra antiratón-FITC conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) en una dilución 1:100. Se incubó a 37°C con agitación y en la oscuridad. Se centrifugó a 6000 rpm y el botón bacteriano se lavó dos veces con PBS 1X para retirar el exceso del segundo anticuerpo sin reaccionar. Al final el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ L de PBS, se realizaron frotis en portaobjetos y se analizaron en microscopio de fluorescencia Olympus BX40.

RESULTADOS

Amplificación de la secuencia codificante del péptido derivado de la gp-43 kDa

El uso de megaprimers para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por acoplamiento en ausencia de templado (50), requiere de usar una temperatura de alineamiento (T_m) superior a 50°C. Lo anterior obliga a realizar un gradiente de temperaturas, para establecer la T_m óptima a la cual los megaprimers estarán alineados entre sí. En la figura 8A se muestra como se alinean entre sí y cómo la secuencia codificante será completada en ambas cadenas de DNA por la polimerasa termoestable (*Taq polimerasa platinum* Invitrogen®). Por otra parte, se probaron 8 temperaturas, 65.5, 66.2, 67.2, 68.7, 70.5, 72.6, 74.8 y 77°C, siendo que la de 77°C fué la óptima por dos razones: se obtuvo mayor cantidad de producto amplificado y del tamaño deseado (120 pb), además de que a ésta T_m , no se detectaron productos de amplificación inespecífica (fig. 8B).

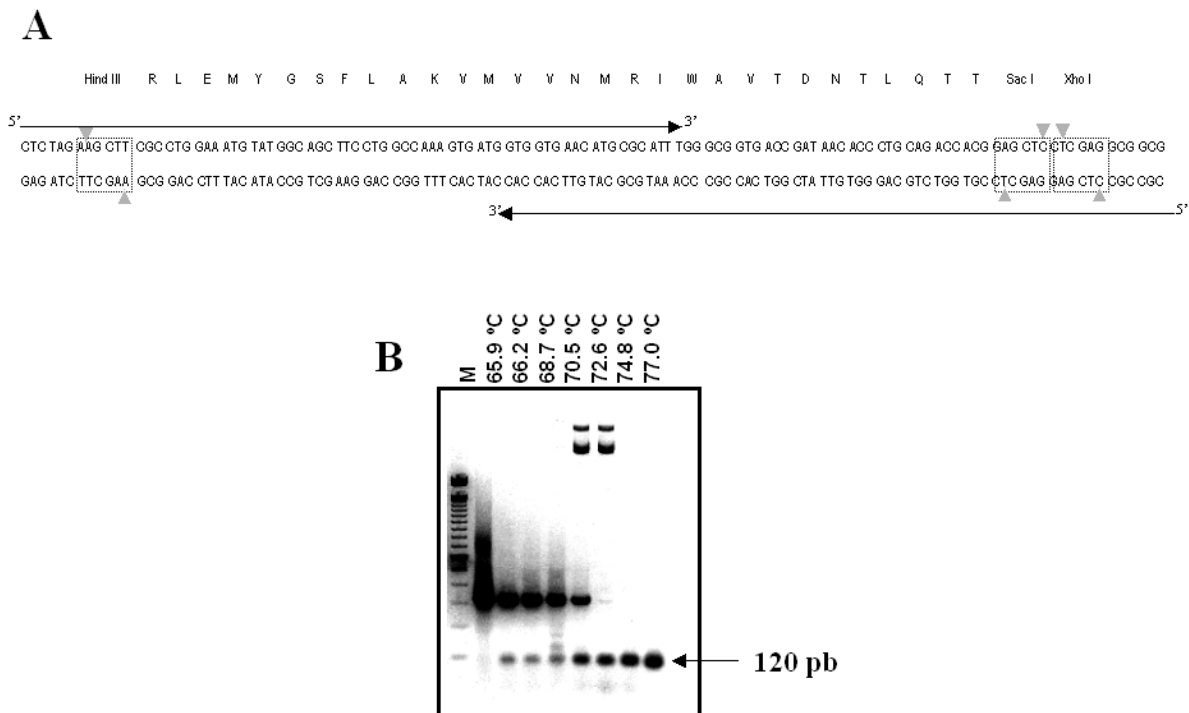


Figura 8. Amplificación de la secuencia codificante del epítipo Ag30. (A) Alineamiento de los megaprimers de 70 pb durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las flechas indican la longitud de estos, mientras que los recuadros muestran los sitios de restricción para las enzimas *Hind III*, *Sac I* y *Xho I*, respectivamente. (B) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos de un gradiente de temperaturas de PCR. Abreviaturas: M: Marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen®).

Digestión de la secuencia ag30.

Con la finalidad de subclonar la secuencia que codifica para el péptido derivado de la gp-43 kDa (ag30), posterior a la amplificación por PCR, se procedió a realizar una digestión doble con las enzimas *Hind III* y *Xho I*. El producto de digestión, se analizó por electroforesis en gel de acrilamida al 20% (figura 9-A). Los resultados muestran que hubo una reducción en tamaño del inserto, lo que resultó en una pérdida aproximada de 12 pb, con respecto al control (carril 2, figura 9-A) dando como tamaño final del inserto 108 pb (carril 3, figura 9-A).

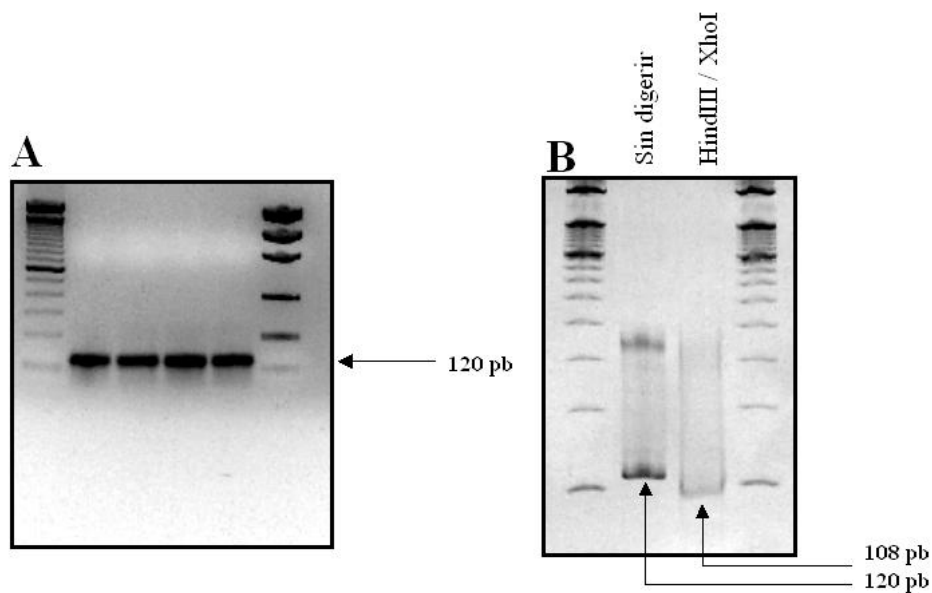


Figura 9. Caracterización del inserto (secuencia Ag 30). (A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los productos de PCR de 120 pb que codifican para Ag30 obtenidos a una T_m de 77°C. (B) Electroforesis en gel de acrilamida al 20% que muestra el tamaño del producto ag30 digerido con las enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I*. En ambos casos, los productos están flanqueados por el marcador de tamaño molecular de 100 pb de (Invitrogen®).

Obtención del plásmido abierto pENP-01

El plásmido pENP-01 (usado en este trabajo como punto de partida) tiene un tamaño de 3450 pb (figura 10 A). Está compuesto por los siguientes elementos: un promotor inducible en condiciones de anaerobiosis llamado *nirB*, seguida por el gen de la secuencia señal de la toxina termolabil (LTB) de *E. coli*, río abajo de esta, se encuentra una región polilinker (con sitios de corte para las enzimas de restricción *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*,

Sac I y *Xho I*) seguida por la región que codifica para el péptido bandera FLAG fusionado al gen del AT ShdA. Con la finalidad de insertar la secuencia ag30 (que codifica para el epítipo de *T. spiralis*) se procedió a realizar una digestión doble con las enzimas de restricción *Hind III* y *Xho I*. Posteriormente se comprobó por un corrimiento electroforético la apertura del vector con extremos *HindIII/XhoI*, lo que resulta en un peso de 3438 pb, perdiéndose los sitios *Spe I* y *Sac I* (datos no mostrados), lo que equivale a un fragmento de 12 pb del resto del sitio múltiple de clonación (figura 10 B).

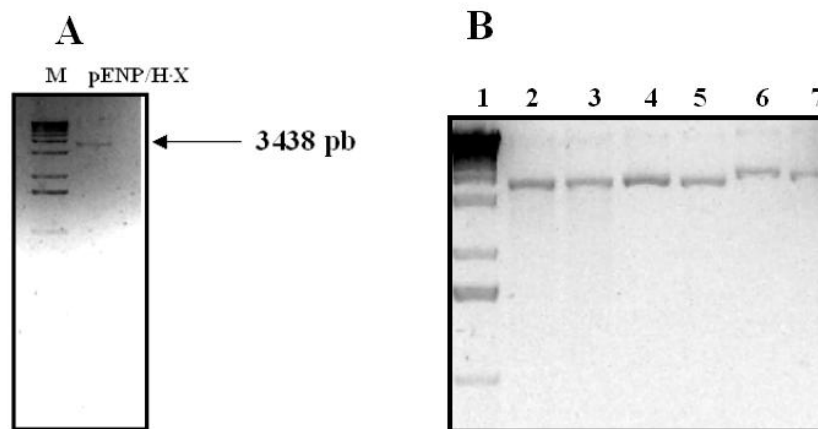


Figura 10. Caracterización del vector y patrón electroforético de las clonas positivas. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con el vector plasmídico pENP-01 digerido doblemente con las enzimas *Hind III* y *Xho I*. La flecha indica que el tamaño del vector corresponde a 3438 pb. (B) Análisis de restricción de los plásmidos pENP-01 y pAg30; carrilea 1) Marcador de tamaño molecular de 1 kb de (Invitrogen®), 2) pAg30/ *Hind III* y *Xho I*, 3) pENP-01/ *Hind III* y *Xho I*, 4) pAg30/ *Hind III*, 5) pENP-01/ *Hind III*, 6) pAg30 sin digerir y 7) pENP-01 sin digerir.

Transformación con el plásmido pAg30

Una vez listos tanto inserto como vector, se procedió a ligarlos en presencia de T4 ligasa. El producto resultante de esta reacción inmediatamente se usó para transformar por choque térmico a 42°C, células competentes de *E. coli* DH5 α . Nuestros resultados mostraron que 42 UFC (clonas) crecieron en presencia de ampicilina (agente de selección). Como controles de la transformación se usaron los plásmidos pENP-01 y pUC19 (positivos), que generaron un crecimiento masivo (por tratarse de plásmidos puros). Por otra parte las células competentes (control negativo) únicamente sometidas al choque térmico, no crecieron.

Análisis de restricción de las clonas positivas

Se obtuvo DNA plasmídico de cada una de las 42 clonas por la técnica de miniprep. Se analizó el tamaño de cada uno de los DNAs de las clonas, siendo que aquellas que retrasaran su patrón de corrimiento electroforético, serían preseleccionadas para un análisis de restricción posterior. En la figura 11 se muestra en geles de agarosa al 1%, el corrimiento de cada uno de los plásmidos de las clonas (sin digerir), usando siempre como control el plásmido pENP-01.

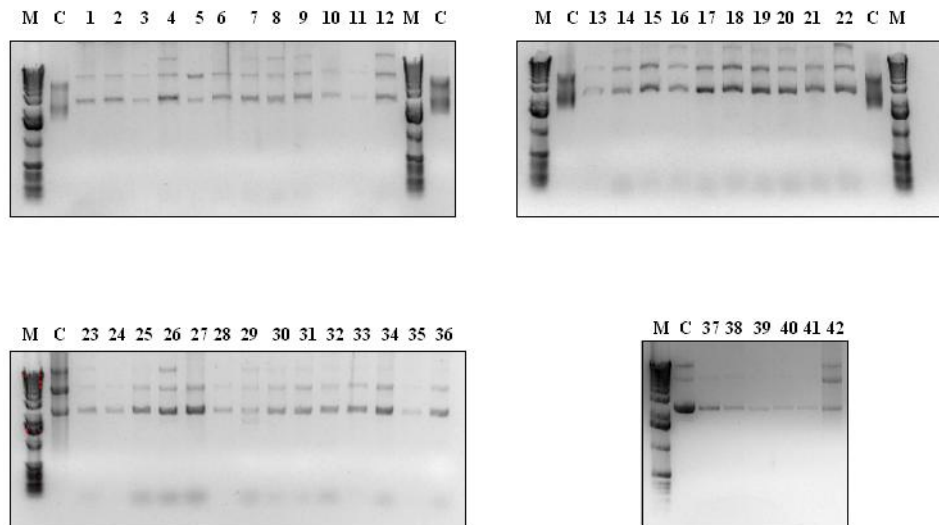


Figura 11. Tamizaje de clonas positivas. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los plásmidos correspondientes a las clonas de *E. coli* transformadas con el producto de ligación que contiene al inserto ag30. En cada caso se usó como control el plásmido pENP-01 y marcador de tamaño molecular de 1 kb, anteriormente señalado

Posteriormente, se seleccionaron 6 clonas (números 1, 6, 20, 29, 40 y 42) para ser analizadas por restricción con las enzimas *Sac I*, *Spe I* (datos no mostrados), *Hind III* y *Xho I*. Estas clonas cumplieron con el patrón de restricción señalado en la figura 10 B. A este respecto, Se puede apreciar que las clonas transformadas con el plásmido pAg30, muestra un ligero retraso con respecto al plásmido pENP-01 (carriles 6 y 7, fig. 10 B). Por su parte, las digestiones dobles con *Hind III* y *Xho I* realizadas a cada uno de los plásmidos arriba mencionados, muestran que ambos plásmidos linearizados tienen el mismo tamaño (carriles 2 y 3, fig. 10 B). Finalmente la diferencia entre los tamaños de pAg30 y pENP-01,

solo pudo ser ligeramente evidenciada cuando estos son linearizados con digestión sencilla usando enzima *Hind III* (carriles 4 y 5, fig. 10).

Secuencia del plásmido pAg30

Debido a que el análisis de restricción no es suficiente para demostrar la correcta subclonación del gen de interés, se recurrió a realizar la secuenciación automatizada del plásmido pAg30. La figura 12 muestra que el inserto se encontró en la dirección adecuada y flanqueada por elementos anteriormente descritos.

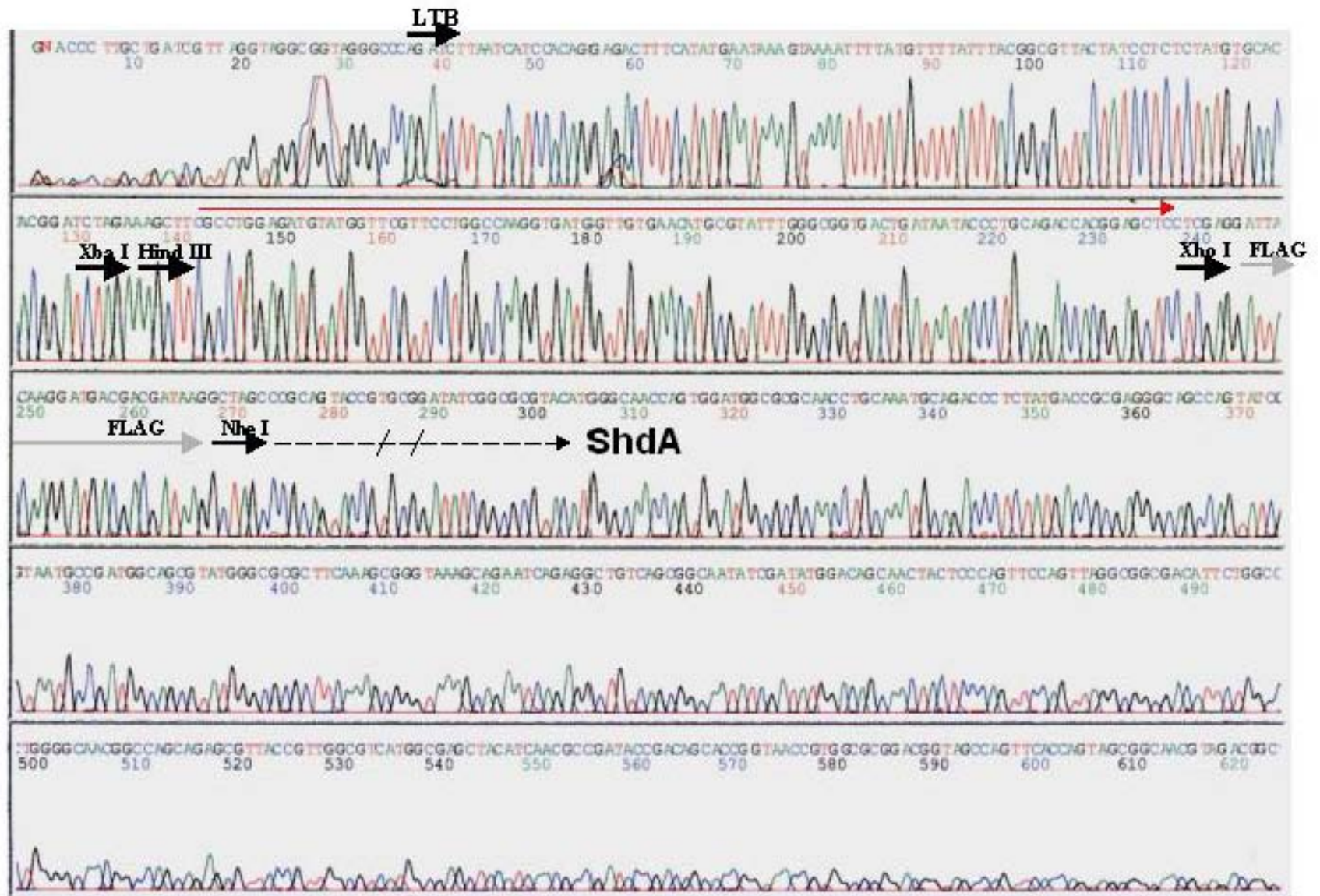


Figura 12. Secuencia del plásmido pAg30. Se muestran todas las regiones clonadas: promotor *mir B*, secuencia LTB, parte del polilinker (*Xba I* y *Hind III*), secuencia *ag30* (flecha roja), secuencia FLAG (flecha verde) y el gen del AT *ShdA* a partir de 274 (flecha discontinua).

Expresión de la proteína de fusión ShdA-FLAG-Ag30

El plásmido pENP-01 codifica para una proteína de fusión que se usó como control. Una vez que se demostró la subclonación de ag30, corresponde a analizar la expresión de esta en extractos totales de la bacteria. En la figura 13 se muestra en el carril 2 un extracto total de *E. coli* transformada con pENP-01. La proteína de fusión codificada por este plásmido, tiene un peso aproximado de 35 kDa, mientras que las clonas que expresaron a la proteína de fusión ShdA-FLAG-Ag30 (codificada por el plásmido (pAg30) tiene un tamaño aproximado de 40 kDa (carriles 4, 5, 6 y 8, figura 13). Es importante notar que las clonas 29 y 42 no expresaron a la proteína de fusión (carriles 7 y 9, figura 13).

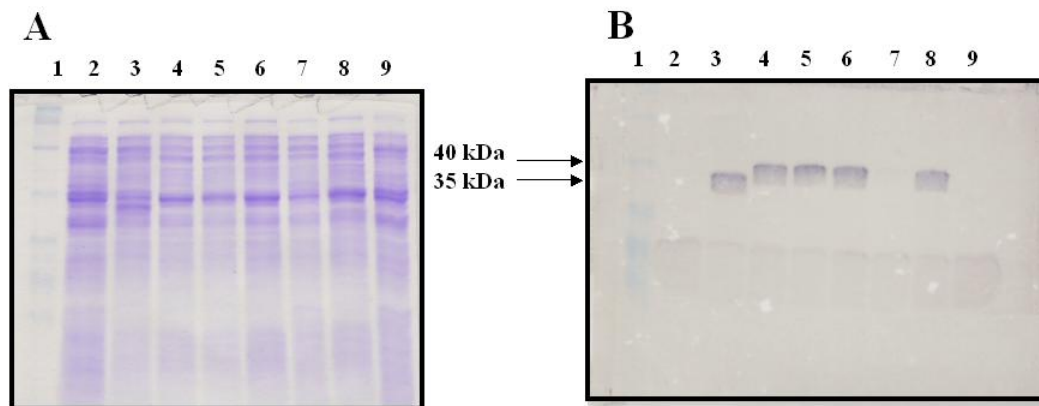


Figura 13. Análisis de la expresión de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos pENP-01 y pAg30 en extractos totales de *E. coli* . (A) SDS-PAGE de proteínas teñidas con azul de Coomassie, carriles: 1) Marcador de tamaños moleculares, 2) extracto total de bacterias transformadas con el plásmido pnr B LTB (control negativo), 3) extracto total de bacterias transformadas con el plásmido pENP-01, 4) extracto de clona 1, 5) extracto de clona 6, 6) extracto de clona 20, 7) extracto de clona 29, 8) extracto de clona 47 y 9) extracto de clona 49. (B) Electroinmunotransferencia (Western-blot) de los extractos señalados en A. En cada caso se indica el tamaño de la proteína de fusión codificada por pENP-01 y pAg30 de 35 y 40 kDa, respectivamente.

Expresión de FLAG-Ag30 en la superficie de E. coli DH5α

Una vez demostrado que al menos 4 clonas expresaron a la proteína de fusión ShdA-FLAG-Ag30, se demostró por inmunofluorescencia indirecta (IFA); si ésta se insertaba correctamente en la membrana externa (OM) de la bacteria mediante el AT ShdA y de esta manera, se translocaba a la fusión FLAG-Ag30 hacia la superficie bacteriana. Al igual que en el ensayo western-blot, se usó anticuerpo monoclonal anti-FLAG para evidenciar a las proteínas codificadas por los plásmidos. La cepa control de *E. coli* DH5α transformada con el plásmido pnrB LTB ShdA (que no posee péptido bandera FLAG), no mostró fluorescencia (figura 14-A); mientras que las cepas transformadas con pENP-01 y pAg30 si lo hicieron (figura 14-B y C), respectivamente.

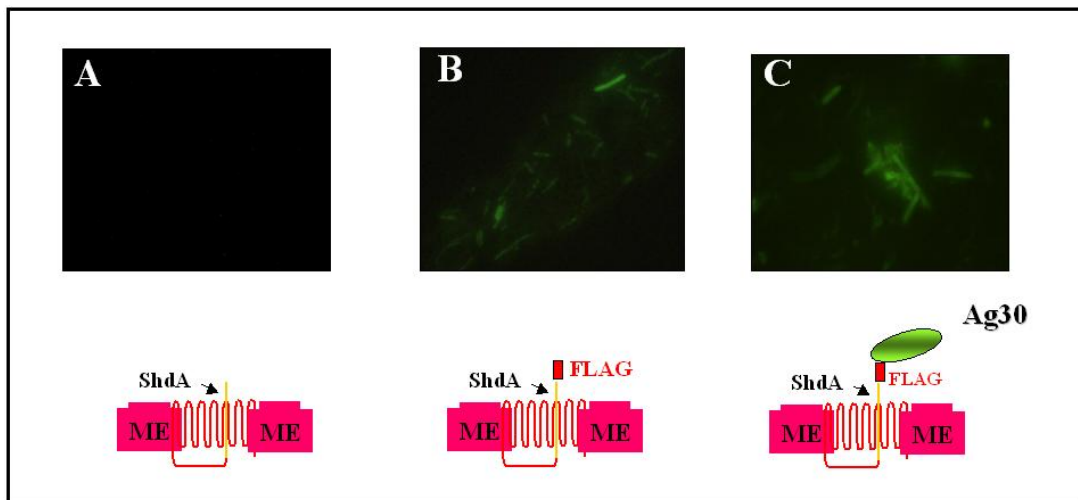


Figura 14. Expresión del péptido bandera FLAG en la superficie de *E. coli* transformada con los diferentes plásmidos. *E. coli* transformada con plásmido: (A) pnrB LTB, (B) pENP-01 y (C) pAg30. En la parte inferior de cada panel se muestra un modelo hipotético de translocación del péptido bandera FLAG fusionado al antígeno Ag30 (si es el caso).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

T. spiralis es un nemátodo de amplia distribución mundial que infecta a la mayoría de los mamíferos, algunas aves y reptiles. La infección en humanos ocurre cuando este consume carne cruda ó mal cocida de un animal previamente infectado (6). En la actualidad esta enfermedad es tratada con bencimidazoles, sin embargo en muchos casos la terapia es inefectiva en áreas endémicas y por esto el desarrollo de vacunas es aparentemente el único medio práctico para el control de la enfermedad. Sin embargo la elaboración de una vacuna basada en parásito atenuado representa una posibilidad muy lejana. Por otra parte, la obtención de suficientes cantidades de antígeno del parásito destinadas a la creación de una vacuna es completamente impráctica y costosa. De aquí que la preparación de inmunógenos relevantes y su preparación, ya sea como sintéticos ó mediante tecnología del DNA recombinante son imperativos para el desarrollo de una vacuna (27, 28, 29, 30). Por ello la importancia de retomar el epitopo ó péptido Ag30 (210-239) de la gp-43 kDa de *T. spiralis* como un candidato a desarrollar una vacuna, puesto que McGuire y colaboradores demostraron que este epitopo parece ser un excelente blanco para la respuesta inmune del huésped, usando ratones NIH como modelo de infección (24). Por otra parte, el mostrar un antígeno heterólogo en la superficie de las bacterias gramnegativas, puede facilitar su reconocimiento por el sistema inmune y mediar un efecto inmunoadyuvante por parte de los componentes de la bacteria (54). Existen diversas estrategias para expresar el epitopo de interés en la superficie bacteriana. Debido a que el sistema de AT (tales como MisL, AIDA-I y ShdA) representan un sistema con relativa simplicidad en su mecanismo de transporte, el dominio β de una serie de AT ha sido empleado para expresar proteínas recombinantes pasajeras en la superficie de enterobacteria, con la idea de inducir ó incrementar la respuesta inmune humoral (42, 49, 55). Por otra parte el número de aplicaciones de la biología molecular y la tecnología del DNA recombinante en parasitología veterinaria se ha incrementado rápidamente. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es importante particularmente para la identificación y diagnóstico así como también para otras aplicaciones (50). En el presente trabajo, se pudo aplicar a la PCR como herramienta de trabajo para obtener una secuencia que codifica para un epitopo procedente de un parásito, sin la necesidad de extraer material genético de este. Por otra parte, la clonación del gen codificante de este epitopo en un vector como lo es un plásmido

(pENP-01), facilitó su producción a nivel de laboratorio del epitopo de interés. Una vez generada la secuencia y subclonada en este vector, se procedió a evaluar la expresión del producto (proteína de fusión ShdA-FLAG-Ag30) en extractos totales de *E. coli* DH5 α . De un total de 42 clonas analizadas por patrón electroforético, se preseleccionaron 6 clonas bajo el criterio de retardar su corrimiento en geles de agarosa, puesto que el incremento en tamaño, es indicativo de que el vector pENP-01 aceptó la secuencia ag30 en estas clonas. Adicionalmente, el análisis de restricción demostró que estas clonas tenían el inserto de manera sitio-dirigida. Sin embargo, al realizar los ensayos de expresión (western-blot), se observó que de las 6 clonas preseleccionadas, solo 4 expresaron la proteína de fusión ShdA-FLAG-Ag30. Esto sugiere la posibilidad de que, aún cuando cumplen con los criterios del análisis de restricción, este último estudio no es suficiente para detectar la presencia de mutaciones en regiones ajenas a las secuencias que son susceptibles al corte de las enzimas empleadas (56). Sin embargo la secuencia del plásmido pAg30, realizada en la clona 1, demostró que la proteína se encontraba en marco de lectura; no así en las clonas 29 y 42. Posteriormente se realizó la secuencia de una de las clonas negativas, mostrando una mutación (por delección) a nivel del promotor *nir B*. El resultado más demostrativo de que este sistema (pAg30) es útil para expresar epitopos, péptidos ó proteínas heterólogas en la superficie bacteriana, queda de manifiesto en los ensayos de IFA, aunque de manera cualilativa. Finalmente, es importante mencionar que la información proporcionada con este trabajo junto con la acumulación de más información acerca de las secuencias de DNA de parásitos podría revelar la presencia de muchas secuencias únicas útiles para identificación, diagnóstico, epidemiología molecular, desarrollo de vacunas y para estudios de biología evolutiva, así como también para la fisiología de las relaciones huésped-parásito (57).

CONCLUSIONES

1. Se logró la clonación del péptido (210-239) derivado de la glicoproteína gp-43 kDa de *Trichinella spiralis*, así como su expresión en la superficie de *E. coli*, empleando el autotransportador ShdA, por lo que el plásmido pENP-01 representa un vector de expresión atractivo para producir epitopos, antígenos ó péptidos heterólogos con la finalidad de que estos sean destinados hacia la superficie bacteriana.
2. Este sistema podría servir como punto de partida para el desarrollo de una estrategia vacunal con fines veterinarios, además de que abre la posibilidad de clonar otras secuencias de antígenos estadio-específicos previamente identificados del mismo parásito ó de otros géneros.
3. Otras de las aplicaciones es que también permitiría la clonación de secuencias blanco a nivel de DNA del parásito para nuevos fármacos, así como con fines de diagnóstico.

REFERENCIAS

1. Gómez-Dantes O, Khoshnood B. Development of the international health in 20th century. *Salud Pública Mex.* Jul-Aug 33(4): 314-329 Grant IF. Insecticides for tsetse and trypanosomiasis control: is the environmental risk acceptable?. *Trends Parasitol.* 2001 17(1):10-4.
2. Wakelin D. Helminths. *Curr Opin Infect Dis.* 2000; 13(5):465-469.
3. Colley DG, Loverde PT, Savioli L. Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science.* 2001; 293(5534):1437-8.
4. Liu LX, Weller PF. Trichinella and other tissue nematodes. En: Harrison's Principles of Internal Medicine. 15 th edition. International edition. New York, USA. 1999. 1231-1233.
5. Dupouy-Camet J, Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol.* 2000; 93(3-4):191-200.
6. Capó VA 1996 Capó VA, Despommier DD. Clinical aspects of infection with Trichinella spp. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9(1):47-54.
7. Bolas-Fernández F. Biological variation in Trichinella species and genotypes. *J Helminthol.* 2003 Jun; 77(2):111-8
8. Despommier DD. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol Today.* 1998. 14(8): 318-323.
9. Phillipp M., Parkhouse RM, Ogilvie BM. Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature.* 1980;287(5782):538-40.
10. Dea-Ayuela M, Bolas-Fernández F. Trichinella antigens: a review. *Vet Res.* 1999; 30(6):559-71.
11. Nagano I, 2004. Nagano I, Wu Z, Boonmars T, Takahashi Y. Molecular cloning and characterisation of two kinds of proteins in excretory-secretory products of Trichinella pseudospiralis. *Int J Parasitol.* 2004; 34(4):491-500.
12. Parkhouse RM, Harrison LJ. Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. *Parasitology.* 1989; 99 Suppl:S5-19.
13. Boireau P, 1997. Boireau P, Vayssier M, Fabien JF, Perret C, Calamel M, Soulé C. Characterization of eleven antigenic groups in Trichinella genus and identification of stage and species markers. *Parasitology.* 1997;115 (Pt 6):641-51.

14. Wisnewski N, 1993. Wisnewski N, McNeil M, Grieve RB, Wassom DL. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 61(1):25-35.
15. Zarlenga DS, 1990. Zarlenga DS, Gamble HR. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 42(2):165-74.
16. Vassilatis DK, 1992. Vassilatis DK, Despommier D, Misek DE, Polvedere RI, Gold AM, Van der Ploeg L. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Biol Chem.* 1992; 267(26):18459-65.
17. Arasu P, 1994. Arasu P, Ellis LA, Iglesias R, Ubeira FM, Appleton JA. Molecular analysis of antigens targeted by protective antibodies in rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 65(2):201-11. Phillip M, 1981.
18. Phillip M, Taylor PM, Parkhouse RM, Ogilvie BM Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Exp Med.* 1981 154(1):210-5.
19. Goyal PK, Wheatcroft J, Wakelin D. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Int.* 2002;51(1):91-8.
20. Vassilatis DK, Polvedere RI, Despommier DD , Gold AM, Van der Ploeg HT. Developmental expression of a 43-kDa secreted glycoprotein from *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996a 78(1-2):13-23.
21. Despommier DD, Gold AM, Burk SW, Capo V, Silberstein D. *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Exp Parasitol.* 1990; 71(1):27-38.
22. Vassilatis DK, Despommier DD, Polvedere RI, Gold AM, Van der Ploeg HT. *Trichinella pseudospiralis* secretes a protein related to the *Trichinella spiralis* 43-kDa glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 78(1-2):25-31.
23. Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology.* 1995a. 86(4):495-8.
24. McGuire C, Weng C, Wakelin D. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 2002; 70(12):7149-52.
25. Jarvis LM, Pritchard DL. An evaluation of the role of carbohydrate epitopes in immunity to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* 1992. 14(5):489-501.

26. Bruschi F, Locci T, Cabaj W, Moskwa B, Castagna B, Kociecka W, Masetti M. Persistence of reactivity against the 45 k Da glycoprotein in late trichinellosis patients. *Vet Parasitol.* 2005;132(1-2):115-8.
27. Vercruyssen J, Knox DP, Schetters TP, Willadsen P. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol.* 2004; 20(10):488-92.
28. Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol.* 2003; 33(5-6):621-40
29. Knox DP. Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology.* 2000; 120 Suppl:S43-61
30. Dalton JP, Mulcahy G. Parasite vaccines: a reality? *Vet Parasitol.* 2001; 98(1-3):149-67 .
31. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10(5):411-21
32. Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, St Geme JW 3rd, Curtiss R 3rd. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect.* 2000; 2(9):1061-72.
33. Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, and Lattmann CT. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun.* 2003;71(4):1944-52.
34. Henderson IR, Navarro-García F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998; 6(9):370-8.
35. Henderson IR, Navarro-García F, Desvaux M, Fernández RC, Ala'Aldeen A. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004 Dec; 68(4):692-744.
36. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001; 69(3):1231-43.
37. Klauser T, Pohlner J, Meyer TF. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays.* 1993;15(12):799-805.
38. Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. The autotransporter secretion system. *Res Microbiol.* 2004;155(2):53-60.

39. Kingsley RA, Van Amsterdam K, Kramer N, Bäumlér AJ. The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun.* 2000;68(5):2720-7.
40. Benz I, Schmidt MA. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun.* 1992;60(1):13-8.
41. Blanc-Potard AB, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 1999;181(3):998-1004.
42. Ruiz-Perez F, Leon-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, Gonzalez-Bonilla C. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect Immun.* 2002. 70(7):3611-20.
43. Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-rondon M, Sansonetti PJ. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(10):3867-71.
44. Kingsley RA, Keestra AM, de Zoete MR, Bäumlér AJ. The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin 13FnIII repeat module: evidence for molecular mimicry of heparin binding. *Mol Microbiol.* 2004; 52(2):345-55.
45. Kingsley RA, Van Amsterdam K, Kramer N, Bäumlér AJ. The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun.* 2000. 68(5):2720-7.
46. Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S, Papaconstantinopoulou A, Dougan G, Baumler AJ. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun.* 2003. 71(2):629-40. 2003
47. Kingsley RA, Santos RL, Keestra AM, Adams LG, Baumler AJ. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol.* 2002. 43(4):895-905.
48. Kingsley RA, Ghanem DA, Puebla-Osorio N, Keestra AM, Berghman L, Bäumlér AJ. Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol.* 2004. 186(15):4931-9.
49. Pompa-Mera EN, Santiago-machuca A, Ruiz-Pérez F, Osorio-León JF, Ocaña-Mondragón A, González-Bonilla CR. Use of ShdA autotransporter to express NANP

and CSP from *P. falciparum* on the surface of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. *Manuscrito en preparación.*

50. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th edition. Cold Spring Harbor Laboratory press. 2001.
51. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227: 680-685
52. Pozio E, Gomez-Morales MA, Dupoy-Camet J. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2003;1(3):471-82
53. Almond JW. Vaccine renaissance. *Nat Rev Microbiol.* 2007. 5: 478-481.
54. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol.* 2007, 5(7):491-504.
55. Ruiz-Olvera, Ruiz-Pérez F, Sepúlveda NV, Santiago-Machuca, Maldonado-Rodríguez R, García-Elorriaga G, González-Bonilla CR. Display and release of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of Salmonella enterica. *Plasmid.* 2003; 50(1):12-27.
56. Wendland J. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. *Curr Genet.* 2003; 44(3):115-23.
57. Prichard R. Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol.* 1997; 71(2-3):155-75.