

11680



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“CLONACION Y EXPRESION DE UN GEN DEL
ESTADIO DE ADULTO DE *Trichinella spiralis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A :

M. en C. PATRICIA BEATRIZ GARCIA REYNA

DIRECTORA: DRA. MA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES

ASESOR: DR. PASCAL BOIREAU

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

2005

m. 345249



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

**A MIS PADRES. Sr. Agustín García Mercado
Sra. Cecilia Reyna Albarrán**

“Gracias a ustedes existo”

A MIS HERMANOS: Arturo, Carlos, Silvia, Javier y Verónica

**A MIS SOBRINOS: Osam, Nestor, Nadis, Aranza, Normita, Akeem,
Montze, Angy, Min, Cesarito y Sofi**

**“Su presencia y su apoyo han hecho fácil y divertido este
camino”**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres:

Por la confianza, apoyo, consejos y sobre todo el cariño y paciencia para ver finalizado este trabajo. Porque representa un gran ejemplo a seguir y es un honor el conocerla.

Al comité tutorial y jurado:

Por su gran apoyo en la revisión de este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN:

A la Biol. Rocío Fonseca Liñán y Biol. Arturo Pérez Taylor (Guerito): Por ser más que compañeros y por haberme escuchado y dado sus consejos en tantas y tantas ocasiones. Por haberme ayudado en el desempeño de mis actividades dentro del laboratorio. Gracias, los quiero.

Al Dr. Raúl Arguello García por su gran amistad y siempre sabios consejos.

A Maricela, María Luisa, José, Romel, Luigui y Betty por los grandes momentos que pasamos trabajando juntos. Fue divertido estar en su compañía. Gracias por su amistad.

Al Sr. René López Bolaños y a la Tec. Blanca Herrera Ramírez por la valiosa ayuda técnica y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Lilián Yépez y la Dra. Camila Arriaga por su amistad, palabras de apoyo, y sobre todo los conocimientos aportados durante este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Parasitología en CNEVA- Maison-Alfort Francia:

Al Dr. Pascal Boireau por su calidez y paciencia durante mi estancia en su laboratorio.

A mis compañeros de estancia: Li Chengyao, Catherine Trap, Danielle Le Run y Jean Francoise Fabien por su amistad y conocimientos transmitidos. Por haberme apoyado en todo momento y hacer mi estancia en Francia menos pesada.

A los Integrantes de la Unidad de Investigación Médica del Centro Médico la Raza:

Al Dr. César González Bonilla. Por las facilidades para permanecer en su laboratorio.

A la Dra. Araceli Santiago Machuca y al Dr. Fernando Ruíz Pérez, por todos los conocimientos sobre expresión de proteínas. Por las partidas de boliche y tantos momentos agradables.

A la Química Alicia Ocaña, Dr. Felipe González por su gran, gran amistad y apoyo.

A todos mis compañeros y amigos de la FES-Cuautitlán:

A la Dra. Lucía García Camacho, Dr. Fernando Osnaya y MVZ. Víctor Quintero. Gracias por la amistad de tantos años, por tolerarme y aceptarme durante este tiempo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), el Laboratorio de Parasitología de CNEVA-Maison-Alfort, Francia y el Laboratorio de Investigación Médica del Centro Médico Nacional de la Raza. En la realización del mismo, se contó con el apoyo de SEP-CONACYT como parte del proyecto ECOS-ANUIES-M01-AM-02N-10 a cargo de la Dra. Guadalupe Ortega-Pierres y del Dr. Pascal Boireau.

JURADO

Presidente: Dr. OSWALDO FROYLAN IBARRA VELARDE

Primer Vocal: Dra. MARIA DOLORES CORREA BELTRN

Segundo Vocal: Dra. CAMILA ARRIAGA DIAZ

Tercer Vocal: Dra. LILIAN YEPEZ MULIA

Secretario: Dr. FERNADO ALBA HURTADO

Primer Suplente: Dra. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

Segundo suplente: Dra. MARIA GUADALUPE ORTEGA PIERRES

ÍNDICE	Pag.
TABLAS	i
FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>Trichinella</i>	2
1.2 CICLO DE VIDA	3
1.3 SINTOMATOLOGÍA	5
1.4 DIAGNÓSTICO	5
1.5 CONTROL	8
1.6 RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO	9
1.7 RESPUESTA INMUNE INTESTINAL CONTRA <i>Trichinella spiralis</i>	11
II. JUSTIFICACIÓN	18
III. OBJETIVO GENERAL	21
IV. OBJETIVOS PARTICULARES	21
V. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 MANTENIMIENTO DEL CICLO DE <i>T. spiralis</i>	22
5.2 Obtención de la larva muscular	22
5.3 Obtención de adultos y larvas recién nacidas	22
5.4 Determinación de Prolifidadad <i>in vitro</i> de <i>T. spiralis</i>	23
5.5 Preparación de ARN total	23
5.6 Preparación de ARNm poly (A) ⁺	24
5.7 Transcripción <i>in vitro</i> de ADNc a ARNm poly (A) ⁺	25
5.8 Cuantificación de ARN por tiras reactivas	25
5.9 Cuantificación de ARN en geles de Agarosa	26
5.10 Cuantificación de ARN por espectrofotometría	26
5.11 CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADNc en λ ZAPII	26
5.11.1 Principios para la construcción de bibliotecas en el vector λ ZAPII ...	27

5.11.2 Síntesis de la primera cadena de ADNc	28
5.11.3 Síntesis de la segunda cadena de ADNc	29
5.11.4 Ligadura de adaptadores	29
5.11.5 Fosforilación de las terminales de <i>Eco</i> R I	29
5.11.6 Digestión con la enzima <i>Xho</i> I	30
5.11.7 Ligadura del ADNc al vector Uni-ZAP™ XR	30
5.11.8 Empaquetado	30
5.11.9 Titulación	31
5.11.10 Amplificación de bibliotecas de ADNc	31
5.11.11 Principios para la escisión <i>in vivo</i> del fagémido pBluescript del vector UNI-ZAP XR	32
5.11.12 Excisión <i>in vivo</i> con el fago cooperador ExAssist y la cepa bacteriana SOLR	33
5.11.13 Protocolo para la escisión <i>in vivo</i> del fagémido pBluescript del vector UNI-ZAP XR	33
5.12 CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS SUSTRACTIVAS	34
5.12.1 Principios para la sustracción de genes estadio-específicos	34
5.12.2 Metodología para la construcción de las bibliotecas sustractivas	35
5.12.3 Síntesis de la primera cadena de ADNc	36
5.12.4 Síntesis de la segunda cadena de ADNc	36
5.12.5 Digestión del ADNc con la enzima <i>Rsa</i> I	37
5.12.6 Ligadura de adaptadores	39
5.12.7 Primera hibridación	41
5.12.8 Segunda hibridación	42
5.12.9 Amplificación por PCR	42
5.12.10 Clonación al vector pTAdv	44
5.12.11 Selección de clonas positivas	45
5.12.12 Preparación de sondas de ADNc a partir de bibliotecas sustractivas ..	46
5.12.13 Hibridación, autoradiografía y análisis de transformación	47
5.12.14 Criterios para la selección de clonas positivas	47

5.13 ANÁLISIS DE CLONAS SUSTRACTIVAS	49
5.13.1 Southern y Northern Blot	49
5.13.2 Tamizaje de las bibliotecas de ADNc de la fase de adulto	49
5.13.3 Determinación del porcentaje de genes estadio específicos	49
5.13.4 Selección de clonas para expresión de proteínas	50
5.14 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	51
5.14.1 Características de los plásmidos de expresión pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP) ₄	51
5.14.2 Diseño de Iniciadores para la clonación en pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp-(NANP) ₄	52
5.14.3 Amplificación por PCR de la clona T1T2-52-4 para expresión	55
5.14.4 Recuperación de productos de PCR de geles de Agarosa	55
5.14.5 Digestión del inserto T1T2-52-4 con <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI	56
5.14.6 Linearización y desfosforilación de plásmido pnir-LTB H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP) ₄	56
5.14.7 Ligadura del producto T1T2-52-4 a los vectores de expresión	57
5.14.8 Preparación de células competentes	57
5.14. 9 Transformación de células competentes	57
5.14.10 Inducción de la expresión en bacterias transformadas	58
5.14. 11 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ...	58
5.14.12 Inmunoelectrotransferencia (Western Blot)	58
VI. RESULTADOS	61
6. 1 Obtención de LM, adultos y LRN	61
6.2 Determinación de la Prolificidad <i>in vitro</i> de hembras adultas de <i>T. spiralis</i> .	62
6.3 Extracción de ARN total y ARNm	62
6.4 Transcripción <i>in vitro</i> de ADNc a ARNm poly (A) ⁺	63
6.5 Construcción de Bibliotecas de ADNc empleando el vector λ ZAPII	64
6.6 Preparación y tamizaje de bibliotecas sustractivas de ADNc	65

6.7 Determinación del porcentaje de genes estadio específicos	75
6.8 Análisis de clonas para expresión	75
6.9 Análisis de restricción de los insertos obtenidos de la clona T1T2-52.....	77
6.10 Expresión de clonas de la fase adulta de <i>Trichinella spiralis</i>	81
VII. DISCUSIÓN	85
VIII. CONCLUSIONES	91
IX. PERSPECTIVAS	92
X. REFERENCIAS	93

TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Trichinella</i> y su distribución a nivel mundial	3
Tabla 2. Condiciones de ARNm poli A ⁽⁺⁾ para el desarrollo de bibliotecas.....	
Sustractivas.....	36
Tabla 3. Bibliotecas sustractivas de ADNc de <i>T. spiralis</i> cepa N°2/HN (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit)	39
Tabla 4. Reacción de ligadura	40
Tabla 5. Reacción de ligadura	40
Tabla 6. Componentes para la Primera Hibridación	42
Tabla 7. Componentes de la mezcla madre 1 para PCR	43
Tabla 8. Componentes de la mezcla madre 2 para PCR	44
Tabla 9. Criterios para la selección de clonas positivas estadio específicas ...	48
Tabla 10. Condiciones para la amplificación por PCR	50
Tabla 11. Condiciones de PCR para expresión de la clona T1T2-52-4	55
Tabla 12. Componentes utilizados para la digestión con <i>Xba</i> I y <i>Bam</i> HI	56
Tabla 13. Número de larvas adultas recuperadas de animales infectados con <i>T. spiralis</i>	59
Tabla 14. Número de parásitos adultos de las cepas N2/HN y ISS-406 de <i>T. spiralis</i> recuperados de animales infectados	59
Tabla 15. Valores sobre el rendimiento en la extracción de ARN total y purificación de ARNm de larvas adultas de <i>T. spiralis</i> de las cepas N2/HN y ISS-406 y LM de la cepa N2/HN	61
Tabla 16. Valores sobre el rendimiento en la obtención de ARNm por transcripción <i>in vitro</i> en la cepas N2/HN y ISS-406 de <i>T. spiralis</i> ...	61
Tabla 17. Características de las bibliotecas expresadas en λ ZAPII de la fase adulta y de LM de <i>T. spiralis</i> (N2/HN y ISS-406)	62
Tabla 18. Código de identificación de clonas estadio específicas de la fase adulta y algunas de la LRN de la cepa china de <i>T. spiralis</i> obtenidas por hibridación sustractiva	70
Tabla 19. Secuencias seleccionadas de la biblioteca sustractiva.....	71
Tabla 20. Clonas de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de <i>T. spiralis</i>	72

FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico doméstico de *Trichinella spiralis*

Figura 2. Flujo antigénico de *Trichinella spiralis*

Figura 3. Esquema del procedimiento para la obtención de genes estadio específicos mediante la estrategia de hibridación sustractiva

Figura 4. Características del plásmido de expresión pFRAS

Figura 5. Características del plásmido de expresión pnir-LTBsp (NANP)₄

Figura 6. Enriquecimiento de bibliotecas post-amplificación por PCR comparado con las bibliotecas antes de la sustracción

Figura 7A. Autorradiografía del primer tamizaje para la evaluación de clonas estadio específicas de la fase adulta de *T. spiralis* obtenidas por Hibridación Sustractiva

Figura 7B. Autorradiografía del primer tamizaje para la evaluación de clonas estadio específicas de la fase adulta de *T. spiralis* obtenidas por Hibridación Sustractiva

Figura 8A. Electroforesis de los productos obtenidos por digestión enzimática con *Eco* RI de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis*

Figura 8B. Electroforesis de los productos obtenidos por digestión enzimática con *Eco* RI de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* cepa N2/HN

Figura 8C. Electroforesis de los productos obtenidos por digestión enzimática con *Eco* RI de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* cepa N2/HN

Figura 9. Análisis Dot Blot de las colonias estadio específicas del adulto y la LRN de la cepa N2/HN de *T. spiralis* seleccionadas por hibridación sustractiva

Figura 10. Southern Blot del ADN plasmídico hibridado a la sonda de clona T1T2 52 específica de la fase adulta de *T. spiralis* cepa N2/HN

Figura 11. Northern Blot con la sonda de la clona T1T2 52

Figura 12. Productos del tamizaje de la biblioteca del adulto en λ ZAP II de *T. spiralis* después de la amplificación por PCR utilizando los iniciadores T3 y T7

Figura 13. Esquema que muestra el tamaño y posición de las clonas derivadas de la T1T2 52

Figura 14. Secuencia sentido con marco de lectura abierto de la clona T1T2-52-4

Figura 15. Secuencia y proporción de aminoácidos del fragmento T1T2 52 4 de *T. spiralis*

Figura 16. Predicción de la localización de la proteína T1T2 52 4 según el programa PSORT WWW server

Figura 17. Identidad de la secuencia T1T2 52 4 con secuencias de proteínas del Gene Bank según el programa de computación SIS BLAST 2 software of network service (ExPaSy-NCBI)

Figura 18. Electroforesis en agarosa al 1% del producto de PCR de la clona T1T2-52-4.

Figura 19. Esquema de la ligadura del fragmento T1T2-52-4 al plásmido de expresión pFRAS

Figura 20. Esquema de la clonación del fragmento T1T2-52-4 al plásmido de expresión pnir-LTB (NANP)₄

Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra 3 clonas de pFRAS-T1T2-52-4

Figura 22. Western Blot de las clonas expresadas con el plásmido pnir-LTB (NANP)₄

Figura 23. Western Blot de la expresión de la proteína T1T2-52-4 en el vector pFRAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LTB	Toxina Termolábil de <i>Escherichia coli</i>
DHB	Acido dihidroxibenzoico
BHI	Infusión Cerebro Corazón
LB	Medio Luria Bertani
TB	Medio Terrific Broth
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
PM	Peso molecular
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
μ l	Microlitro
ng	Nanogramos
NANP	Péptido de Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina
kDa	Kilodaltones
kb	Kilobases
D.O.	Densidad óptica
g	Gravedades
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino
SDS	Duodecil Sulfato de Sodio
EDTA	Acido Etilén Diamino Tetra-acético
<i>pnir</i>	Promotor de nitrato reductasa
p.i.	Post-infección
UPF	Unidades Formadoras de Placa
LM	Larva muscular
LRN	Larva Recién Nacida
DEPC	Dietilpirocarbonato
UV	Ultravioleta
DMSO	Dimetilsulfóxido
ORF	Open reading frame (marco de lectura abierto)
CSP	Proteína circunsporozoítica de <i>Plasmodium falciparum</i>

RESUMEN

La triquinellosis producida por el nemátodo *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) es una zoonosis de re-emergencia a nivel mundial. Durante su ciclo biológico se inducen respuestas inmunes a nivel intestinal y sistémico derivadas de la exposición de antígenos liberados por la larva muscular (LM), el adulto y las larvas recién nacidas (LRN). En modelos animales se han caracterizado componentes del parásito relevantes en la inducción de una respuesta inmune protectora que se induce preferencialmente hacia el estadio de adulto y determina el tiempo en que permanece éste en el intestino. Por ello es importante analizar los antígenos del estadio adulto en cuanto a la inducción de respuestas inmunes así como en la relación huésped-parásito.

Con esta finalidad, en este trabajo se identificaron antígenos estadio específicos de la fase adulta de *T. spiralis* y se clonaron en un sistema de expresión de procariontes. Para ello se empleó el método de hibridación sustractiva y se desarrolló una biblioteca de ADNc del adulto de *T. spiralis* (cepa N2/HN) en la cual se identificaron 124 clonas estadio específicas. De éstas se seleccionó la clona T1T2 52 (de 400 bases), que se empleó como sonda para el tamizaje de una biblioteca de ADNc adulto en el vector lambda ZAP II. La clona obtenida (T1T2 52 4) con una secuencia de 1329 pares de bases y un motivo de dedos de Zinc se clonó en los vectores de expresión pFRAS y pnr LTBsp NANP₄. La expresión de la proteína analizada por Western blot reveló reactividad en una banda de alrededor de 53 kDa. Esta posee alrededor del 32 al 62% de identidad con proteínas de la familia de los receptores nucleares en diferentes organismos. Considerando estas características se sugiere que esta proteína puede participar en la regulación del desarrollo de *T. spiralis* en la fase intestinal.

ABSTRACT

Trichinellosis a disease caused by the nematode *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) is a worldwide re-emerging zoonosis. During the life cycle of this parasite systemic and intestinal immune responses are induced due to host exposure to antigens released by muscle larvae, newborn larvae and adult worms. Some of the relevant components of the parasite that induce a protective immune response in experimental models for trichinellosis have been characterized. This response is preferentially induced to the adult worm and this defines the permanence of the parasite in the host intestine. Based on this, in this work we proposed to analyze antigens from adult parasites which may be important in the induction of protective responses as well as the host parasite relationship.

The aim of this work was therefore to analyze stage specific antigens from *T. spiralis* adult worm. This was approached by cloning adult stage specific cDNAs in bacterial expression system. For this purpose a subtractive hybridation method was used and a cDNA library from the *T. spiralis* (strain N2/HN) adult worms was obtained. In this a total of 124 adult stage-specific clones were identified. One clone referred as T1T2 52 (contained 400 base pair) was selected out of the 124 clones and used as a probe for screening an adult cDNA library in the lambda ZAP II vector. The selected clone had (T1T2 52 4) 1329 base pairs and a zinc finger motif. The selected sequence was cloned in the pFRAS and pnir LTBsp NANP₄ expression vectors. The fusion protein expressed was analyzed by Western blot and reactivity was detected in a band of approximately 53 kDA. This protein has around 32 to 62% identity with proteins of the nuclear receptor family of various organisms. Based on these features it can be suggested that this adult worm protein may participate in regulating the development of the adult stage of *T. spiralis* at the intestinal level.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias generan la muerte de millones de personas en el mundo cada año, lo cual representa un problema grave en la salud a nivel mundial, así también los parásitos son patógenos que tienen gran importancia económica. Se considera que una de cada diez personas padece una de las principales enfermedades parasitarias identificadas en el mundo (malaria, schistosomiasis, leishmaniasis, ascariasis, filariasis linfática, onchocerciasis, enfermedad de Chagas, etc.) (Hirst y Stapley, 2000; Viney, 2001). Estas enfermedades son ocasionadas por una gran diversidad de organismos entre los que se encuentran protozoarios y helmintos. Dentro de estos últimos se encuentran los nemátodos, que son causantes de la infección de millones de personas en el mundo y se relacionan con padecimientos en los que se presenta una alta morbilidad o presentaciones crónicas de la enfermedad (Hirst y Stapley, 2000).

La trichinellosis es una enfermedad reconocida desde el siglo XIX, y desde entonces se considera un problema de salud pública, así mismo, representa una zoonosis de re-emergencia en muchas áreas del mundo por el impacto epidemiológico que genera este parásito (Murrell y Pozio, 2000; Blancou, 2001)

La infección por *Trichinella* afecta tanto a seres humanos como a animales y se ha reportado en países de América Latina incluyendo México, Argentina, Chile y muy recientemente en Bolivia (Ortega-Pierres y cols., 2000). En México desde 1952 hasta la fecha se han reportado un poco más de 800 brotes de trichinellosis en humanos en distintos estados del país, tales como Sonora, Chihuahua, Durango, Nuevo León, Colima, Jalisco, San Luis Potosí, Zacatecas, Veracruz, Guanajuato, Aguascalientes, Querétaro, Estado de México, Oaxaca, Michoacán, Guerrero y el Distrito Federal. La mayoría de los brotes de trichinellosis en humanos tanto en México como en otros países de América Latina se deben al consumo de carne de cerdo mal cocida, así como de productos derivados del mismo o de animales provenientes de rastros clandestinos, mantenidos en condiciones muy deficientes de higiene (Ortega-Pierres y cols., 2000).

En México existen reportes de estudios de incidencia de esta infección en seres humanos (de la Rosa y cols., 1998), en cerdos (Arriaga y cols., 1995) y en caballos de rastro (Arriaga y cols., 1996). Por otra parte hay evidencias que indican que animales herbívoros pueden ser infectados por *Trichinella* (Murrell, 1994). En otras investigaciones se han encontrado también ratas, perros y

gatos infectados con *Trichinella* por lo que se consideran un riesgo para la transmisión de la infección hacia cerdos y otros animales utilizados para el consumo humano.

1. 1 CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO *Trichinella*

Los parásitos clasificados en el género *Trichinella* se identifican de la siguiente manera:

Phylum: Nemátoda

Clase: Adenophores

Orden: Edrollamairida

Superfamilia: Trichinoloidea

Familia: Trichuridae

Subfamilia: Trichirinae

Género: *Trichinella*

En un principio se consideró que el género *Trichinella* agrupaba a una sola especie, sin embargo por estudios comparativos de diferentes aislados obtenidos de distintas regiones, se demostró la existencia de otras especies. A pesar de ello, se desconoce hasta la fecha como ocurre el proceso de especiación.

Datos recientes del Centro de Referencia Internacional para la Trichinellosis consideran dentro del género *Trichinella* a siete especies y diez genotipos entre los que se incluye a especies encapsuladas como *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murreli*, *T. nelsoni* y *T. papuae* y a especies no encapsuladas como *T. pseudospiralis* (Tabla 1). Ambas especies se ubican en diferentes localizaciones geográficas y se han identificado a su vez en humanos, como en un gran número de animales carnívoros, herbívoros o bien en hospederos incidentales (Pozio y cols., 2001).

En México, así como en países del Centro y Sur de América la trichinellosis humana se ha asociado a la especie *T. spiralis*. Sin embargo, existen pocos reportes referentes a la especiación por lo cual sería necesario llevar a cabo estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia real de la infección.

Tabla 1. Especies de *Trichinella* y su distribución a nivel mundial

Especie	Genotipo	Distribución
<i>T. spiralis</i>	T1	Cosmopolita
<i>T. nativa</i>	T2	Región ártica y subártica
	T6	Región subártica y norte de América
<i>T. britovi</i>	T3	Áreas templadas de Europa y Asia
	T8	Sudáfrica y Namibia
	T9	Japón
<i>T. pseudospiralis</i>	T4A	Región Paleártica
	T4B	Australia
	T4C	Región Neártica
<i>T. murrelli</i>	T5	Áreas templadas del norte de América
<i>T. nelsoni</i>	T7	Sur de África del Sahara
<i>T. papuae</i>	T10	Papua Nueva Guinea

1.2 CICLO DE VIDA

La trichinellosis se distribuye ampliamente tanto en zonas con clima ártico, tropical o bien clima templado. Su ciclo de vida puede ser doméstico o selvático y se ha demostrado que puede haber transmisión de un ciclo al otro.

En el ciclo de vida doméstico (Figura 1) se presenta en primer lugar una fase intestinal o entérica representada por el adulto y posteriormente una fase sistémica o parenteral, la cual involucra a la larva muscular (LM) y a la larva recién nacida (LRN).

La fase intestinal se inicia después de la ingestión de carne contaminada con la LM infectante, la cual dentro del estómago, se libera del quiste del tejido muscular debido a la acción de los jugos gástricos. La LM pasa al intestino delgado donde en un lapso de 36 a 48 horas sufre cuatro mudas hasta convertirse en parásito adulto. Durante este periodo, el parásito se aloja en el epitelio intestinal, lugar donde se desarrolla, madura y reproduce. Los machos y las hembras copulan y mientras que los machos son expulsados, las hembras fecundadas penetran la mucosa y liberan a las LRN.

En la fase sistémica, las LRN migran por la lámina propia del intestino para alcanzar las circulaciones sanguínea y linfática. A través de estas vías llegan y se establecen en las células del músculo estriado y se desarrollan nuevamente como LM dentro de un nicho al que se le conoce

como “célula nodriza”. En este sitio la LRN genera una serie de cambios en donde se forma esta estructura particular y así mismo asegura un hábitat apropiado para el crecimiento, desarrollo y sobrevivencia del parásito. Una paradoja es el caso de *T. pseudospiralis* donde no hay formación de célula nodriza. El ciclo de vida del parásito se completa cuando otro huésped consume la carne de un animal infectado.

En algunos huéspedes como la rata y el ratón la célula nodriza puede mantener al parásito durante toda su vida, sin embargo, en el humano esta estructura eventualmente se calcifica y tanto la célula nodriza como el parásito mueren. Así mismo, el parásito sobrevive en la célula nodriza el tiempo suficiente para asegurar la dispersión de los animales infectados dentro del ecosistema, tanto como la distribución de la LM a otros animales carnívoros, ya sea por depredación, por actos de rapiña o por canibalismo.

I. FASE ENTÉRICA

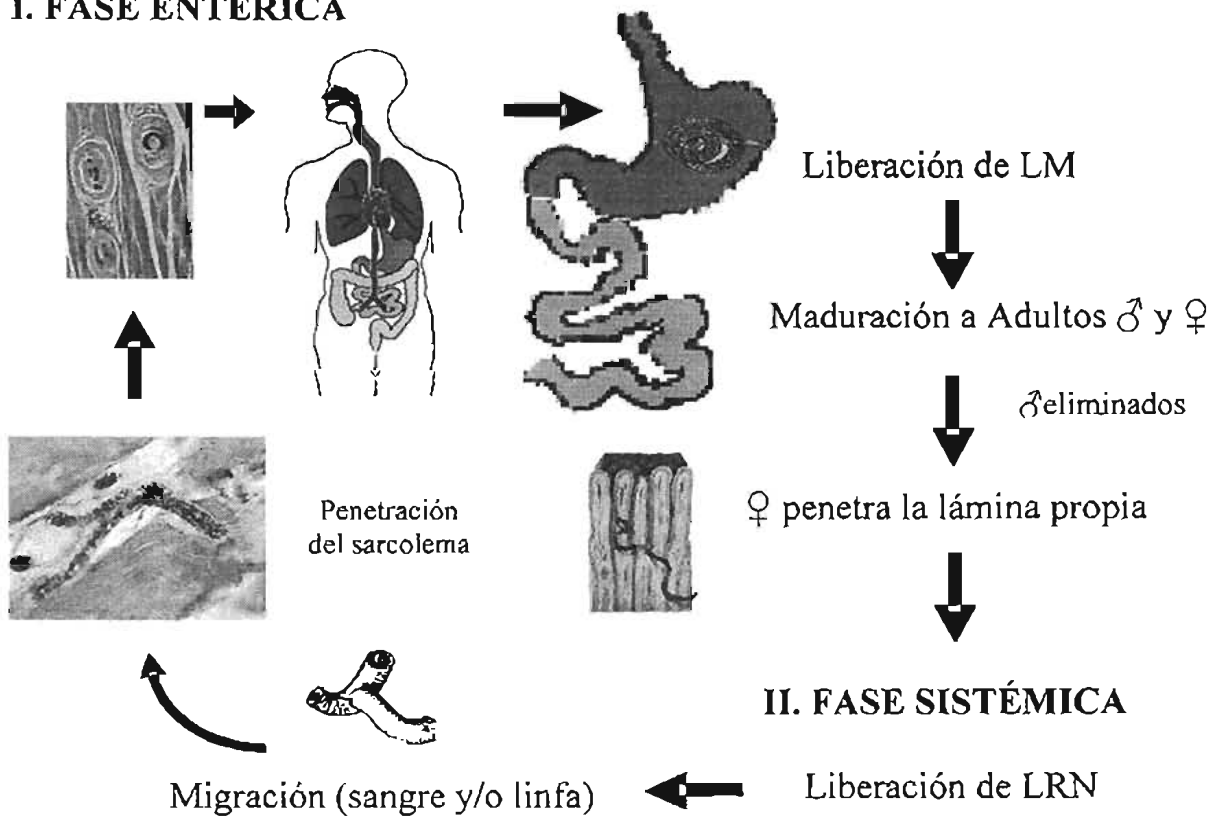


Figura 1. Ciclo biológico doméstico de *Trichinella spiralis*

1.3 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas durante los primeros días post-infección son principalmente molestias gastrointestinales que causan náusea y dolor abdominal. Posteriormente otras manifestaciones como mialgias, edema orbital, fiebre y fatiga muscular se relacionan con la migración de la LRN y la respuesta inmune del hospedero hacia la LM. En algunos casos las larvas pueden invadir el miocardio y causar daño cardíaco (Lazarevic y cols., 1999).

La sintomatología depende en gran medida del número de larvas que se ingieren, así la ingestión de 500 larvas ó más, puede producir una enfermedad de moderada a grave. Los síntomas como el dolor abdominal, diarrea, vómito, pérdida de peso y el exantema se consideran inespecíficos, ya que pueden presentarse en otros padecimientos. Otros criterios clínicos característicos de la infección por *Trichinella* son la presentación de mialgias generalizadas, mialgias oculares, edema de párpados, cara y manos y finalmente postración. Cabe mencionar que los síntomas relacionados con la infección por una determinada especie de *Trichinella* pueden ser diferentes a los desarrollados por otra (Capo y Despommier, 1996).

1.4 DIAGNÓSTICO

La detección de la infección por *Trichinella* constituye un aspecto muy importante en el desarrollo de medidas de control y erradicación de esta parasitosis. Actualmente, en los rastros el diagnóstico de trichinellosis en cerdos y otras especies se realiza mediante métodos de detección directa del parásito como son: la triquinoscopia y la digestión artificial. En ambos métodos el parásito se rastrea en muestras de músculo y por tanto la sensibilidad de las pruebas depende de la cantidad de tejido examinado y del sitio de donde éste se obtiene. Por esta razón, el tamaño de la muestra puede restringir la detección del agente, aunque el animal presente cargas parasitarias altas. Así mismo, animales con cargas parasitarias bajas suelen pasar desapercibidos (Van Knapen y cols. 1981; Touratier, 1991).

En la actualidad, otra alternativa empleada en el diagnóstico de la trichinellosis es el uso de métodos serológicos, que permiten la demostración indirecta del parásito en muestras de suero u otros fluidos corporales. El propósito de la serología es determinar la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en las muestras de animales sospechosos. La técnica de ELISA es

uno de los métodos más empleados que permiten el diagnóstico de la trichinellosis de manera sensible (Gamble y cols., 1983).

En la búsqueda de mejorar el diagnóstico, los ensayos de ELISA han empleado antígenos purificados de *Trichinella*, que permitan la detección sensible y específica del parásito. En este sentido, algunos autores han demostrado que tanto los antígenos de superficie, así como los productos de secreción/excreción (S/E) de la larva muscular de *Trichinella*, permiten la detección sensible y específica de la infección en cerdos, caballos y seres humanos (Arriaga y cols., 1989; Salinas-Tobón y cols., 1994).

En análisis realizados por inmunoelectrotransferencia (IET) se determinaron los principales componentes de la LM de *T. spiralis* que son reconocidos por sueros de cerdos infectados experimentalmente con el parásito. En este sentido se identificaron cinco proteínas con pesos moleculares de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa que corresponden a las proteínas reportadas por Ortega-Pierres y cols. (1989), de los componentes de S/E purificados mediante la utilización del anticuerpo monoclonal NIM-M1.

Debido a la necesidad de recuperar antígenos definidos en formas puras y en cantidades suficientes para la gran tarea en la detección y control de la infección por *T. spiralis*, se han desarrollado diferentes estrategias. Un mecanismo empleado es la purificación de antígenos por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales, sin embargo, el costo y el rendimiento del método, pueden presentar dificultades para la obtención constante y en cantidades suficientes de estos antígenos.

Por otro lado, con la finalidad de definir antígenos que favorezcan la especificidad en el diagnóstico de *Trichinella*, actualmente se trabaja en la preparación de péptidos sintéticos y el empleo de técnicas de ingeniería genética para realizar la clonación de los genes que codifican para los antígenos de interés y que pueden ser expresados en sistemas bacterianos, permitiendo su producción eficiente.

En este contexto, algunos autores se han dado a la tarea de identificar antígenos, que puedan ya sea ser utilizados en el diagnóstico, o bien para el desarrollo de vacunas. En este sentido se realizó la clonación y expresión de péptidos recombinantes con pesos moleculares de 46, 49 y 54 kDa, que comparten determinantes antigénicos con componentes de secreción-excreción, los cuales reaccionan específicamente en ELISA e IET con sueros de animales infectados con *Trichinella* (Sugane y Matsura, 1990; Zerlanga y Gamble, 1990; Su y cols., 1991).

Por otro lado Yépez y cols. (1989), desarrollaron un banco de expresión de la larva muscular de *Trichinella* en el vector lambda gt11. A partir de este banco se seleccionaron cuatro clonas recombinantes (Ts-1, Ts-2, Ts-3 y Ts-4), las cuales expresan proteínas híbridas con pesos moleculares entre 118 y 121 kDa. Asimismo, se determinó mediante el empleo de anticuerpos seleccionados con las proteínas de fusión producidas por las clonas seleccionadas, que éstas comparten determinantes antigénicos con los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella*. Las proteínas de fusión se purificaron y se probaron en ELISA, demostrándose que el péptido recombinante producido por la clona TS-3 era reconocida por sueros de cerdos infectados experimentalmente con *Trichinella*. Posteriormente, con la finalidad de expresar y purificar eficientemente el péptido recombinante de *Trichinella*, se procedió a subclonar el inserto de cDNA de la clona TS-3 en el vector pGEX-3X. Así, el péptido recombinante expresado en este vector se purificó y se probó en ELISA empleando sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito. El ensayo desarrollado tuvo una sensibilidad del 81% y una especificidad del 100%, sugiriéndose el uso potencial de este péptido recombinante en el diagnóstico de trichinellosis porcina (Yépez-Mulia y cols., 1994).

En otros estudios, Zerlanga y Gamble (1990) describieron a la clona TsA-12 que codifica para la proteína de fusión beta- galactosidasa de 123 kDa la cual está presente en la LM y el adulto, sin embargo, no se encuentra en los productos de E/S. Sugane y Matsaura (1990) reportan una proteína de fusión beta-galactosidasa de 46 kDa que es un producto de excreción/secreción de *Trichinella*. Otro componente específico de *T. spiralis* que se sugiere como candidato para su uso en el diagnóstico, es la proteína N-glicosilada de 49 kDa (Su y cols., 1991). Por otra parte, Sun y cols. (1994) identifican una proteína de fusión denominada Ts39 procedente de la LM de *T. spiralis* la cual proponen para el desarrollo de una vacuna. En trabajos recientes Zerlanga y cols. (2002) reportan dos interesantes antígenos de secreción producidos por la LRN que se identifican como proteínas ricas en ácido glutámico y que pueden ser candidatos para el desarrollo de inmunógenos, sin embargo, aún deben ser evaluados. Por otro lado Romaris y cols. (2002), describieron la interacción de anticuerpos monoclonales (mAbs) obtenidos de ratones inmunodeficientes Btk (xid) dirigidos contra la glicoproteína 53 (gp53) que es parte del grupo de los antígenos TSL-1. En este trabajo se observa que el mAbs US5 reconoce específicamente a un péptido glicano-0 identificado en la cutícula y β -esticosoma de la LM de *T. spiralis*. Por último, Nagano y cols. (2003) clonaron y caracterizaron a una proteinasa de serina denominada Ts23-2 de

42.3 kDa, la cual es específica de la larva muscular y la sugieren como candidata para su uso en el diagnóstico.

A pesar de grandes esfuerzos, hasta la fecha continúan los estudios encaminados a identificar componentes de las diferentes fases de *Trichinella spiralis* que sean útiles para un diagnóstico preciso.

Finalmente, otras alternativas que se han desarrollado para el diagnóstico de *Trichinella*, son la detección del material genético del parásito empleando sondas de ácidos nucleicos y la amplificación del DNA del parásito por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es una metodología mediante la que ha sido posible detectar al parásito en ratones, cerdos y caballos infectados experimentalmente con *Trichinella* (Dupouy Camet y cols., 1991; Dick y cols., 1992; Viveros y cols., 2001).

En avances recientes sobre las técnicas moleculares, se incluye el desarrollo de una adaptación al PCR, que se conoce como amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD). Esta técnica se ha empleado para la caracterización de aislados obtenidos de diferentes localidades (Soulé y cols., 1993; Dupouy Camet y cols., 1994; Monroy y cols., 2000; Viveros y cols., 2000).

Es claro que la aplicación de herramientas moleculares ha contribuido de forma muy importante a la identificación de focos de infección, así como al conocimiento de la prevalencia real de la trichinellosis porcina y equina. Esto a su vez permitirá contar con elementos indispensables para establecer programas de control efectivo para la erradicación de esta parasitosis.

1.5 CONTROL

Considerando que el consumo de carne de cerdo o sus derivados así como la carne de caballo son las vías principales de infección para el humano, un aspecto de gran importancia para el control y erradicación de la trichinellosis es su detección de manera sensible y específica.

Actualmente una de las medidas de control en la transmisión de *Trichinella* a humanos es la utilización de los métodos de detección directa que permiten la identificación de LM en biopsias de músculo (triquinoscopia) así como a la digestión artificial de porciones del diafragma o lengua de los animales destinados al consumo. Otra alternativa mencionada también es la detección por métodos serológicos de anticuerpos específicos en el suero de animales infectados, sin embargo la

ocurrencia de brotes ha demostrado que la sensibilidad de estos métodos es baja (Yépez-Mulia y Ortega-Pierres, 1994).

Por otra parte también se ha aplicado la quimioterapia para el control de la infección por *Trichinella*, en este sentido para el tratamiento de la enfermedad se ha propuesto el uso de dosis altas y reguladas de corticosteroides ó el uso de flubendazol o albendazol dirigido a las fases digestivas o parenterales de la parasitosis. Sin embargo, la larga duración de los tratamientos, las dificultades de distribución de los fármacos, así como la emergencia de cepas de parásitos resistentes, ha dificultado el control efectivo de esta parasitosis (Vojnikovic y cols., 2001; Chung y cols., 2001).

En este contexto, una alternativa en la que trabajan diversos grupos dedicados a la investigación en trichinellosis es sobre la inmunización de los animales que viven en zonas de riesgo. Sin embargo, para la obtención de vacunas efectivas se requiere en primera instancia estudiar los mecanismos de defensa del hospedero, la biología misma del parásito y la caracterización de los diferentes componentes del mismo, con la finalidad de dilucidar y entender las respuestas protectoras que se generan en los individuos infectados.

1.6 RELACIÓN HUÉSPED-PARÁSITO

En base al establecimiento de modelos animales para el estudio de la trichinellosis se ha favorecido el poder caracterizar a los tres estadios de desarrollo del parásito, así como la relación que tienen con el huésped tanto a nivel intestinal como sistémico. A este respecto se han caracterizado componentes del parásito que son importantes para la inducción de una respuesta inmune protectora. Así, se ha determinado que los componentes de la superficie de la LM y los de excreción/secreción (E/S), son moléculas inmunodominantes reconocidas por una gran variedad de hospederos, entre los cuales están las ratas, ratones, cerdos, caballos y otros animales silvestres (Ortega-Pierres y cols., 1989; Robinson y cols., 1991; Yépez-Mulia y cols., 1996) y que además son capaces de inducir inmunidad protectora contra la infección (Bell y cols., 1979; Gamble y Graham, 1984; Appleton y cols., 1988; Ortega-Pierres y cols., 1989).

De acuerdo a la reactividad de diferentes anticuerpos monoclonales contra los componentes de superficie, gránulos de los esticocitos y productos de excreción-secreción (E/S) de *Trichinella spiralis*, estos antígenos se han clasificado dentro del grupo de los TSL-1, los cuales comparten un

carbohidrato único que es la base de su inmunodominancia (Dankers y cols., 1991; Appleton y cols., 1991; Ortega-Pierres y cols., 1996; Appleton y Romaris., 2001).

En estudios realizados acerca de la naturaleza bioquímica de las moléculas de superficie y de E/S, se demostró que el epítipo responsable de la inmunodominancia es el azúcar 3,6-didesoxi-D-arabinohexosa (β -Tivelosa). Este azúcar inusual se describió inicialmente en bacterias gram negativas como *Salmonella* de la serovariedad D y en huevos de *Ascaris* (Dea-Ayuela y cols., 2001; Appleton y Romaris, 2001), así mismo se ha comprobado que es estadio específica de LM de *Trichinella*. La presencia específica de tivelosa en el estadio de LM de *Trichinella* se demostró cuando al comparar los N-glicanos de la larva adulta con los N-glicanos de la LM, a pesar de las similitudes entre ambos, se encontró que el adulto carece de tivelosa o fucosa, lo que sugiere que las glicosil transferasas no se expresan, ó no son funcionales en este estadio (Morelle y cols., 2000a). Por otra parte la tivelosa constituye el 24% de los residuos glicosídicos de estos antígenos (Wisnewski, y cols., 1993), entre otros carbohidratos importantes como la fucosa y la manosa que representan el 36% y el 22% respectivamente.

El efecto protector de los anticuerpos anti-tivelosa indica que este azúcar, o la proteína a la cual se asocia, desarrolla alguna función vital dentro de la supervivencia del parásito en el hospedero. Así mismo es posible que a su vez le confiera protección contra la acción de glicosidasas y proteasas que se liberan en el intestino destinadas a impedir la llegada del parásito a su nicho intraepitelial (Carlisle y cols., 1991; ManWarren y cols., 1997; Appleton y Romaris., 2001).

Debido a la importancia de definir el papel de los antígenos inmunodominantes del tipo TSL-1, sobre la respuesta inmune a *T. spiralis* algunos autores se han dado a la tarea de identificar y producir estos mediante herramientas moleculares. A este respecto se han clonado y caracterizado algunos productos de E/S (Zerlanga y Gamble., 1990; Su y cols., 1991; Vassilatis y cols., 1992; Arasu y cols., 1994). Uno de estos productos es una glicoproteína con peso molecular entre 41-45 kDa y corresponde al componente principal de los productos de E/S, el cual se restringe a la LM (Su y cols., 1991; Vessilatis y cols., 1992; Arasu y cols., 1994).

Así también se ha reportado que en la fase inicial de la infección por *Trichinella* existe una respuesta específica a antígenos unidos a fosforilcolina (FC) (Ubeira y cols., 1987). Los antígenos unidos a FC en contraste con los antígenos unidos a tivelosa, no se presentan en los productos de E/S debido a que se encuentran ubicados en estructuras internas de la larva, razón por la que los

anticuerpos anti-antígenos unidos a FC no poseen un efecto protector (Lim y cols., 1994; Ortega-Pierres y cols., 1996).

1.7 RESPUESTA INMUNE INTESTINAL CONTRA *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis tanto en su fase entérica como en su fase sistémica se considera un parásito intracelular (Despommier, 1990; Despommier, 1993) que tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a varios mecanismos de inmunidad. Así mismo, dada la diversidad y estadio-especificidad de los antígenos que presenta, constituye un estímulo antigénico complejo para el hospedero, el cual establece respuestas inmunes humoral y celular específicas (Alcántara y cols., 1992).

La respuesta intestinal del hospedero provocada por la infección de *T. spiralis* se caracteriza por cambios en la arquitectura de la mucosa e inflamación que se asocian con la expulsión de larvas. Esta expulsión de larvas se relaciona con la patología intestinal, así como con la respuesta del sistema inmunológico local, que de acuerdo a sus propiedades y funciones particulares se diferencia del sistema inmune sistémico.

Existe una gran variedad de células localizadas en la mucosa del intestino y que son actores en la respuesta inmune local. Estas células incluyen enterocitos, exocrinocitos caliciformes secretores de moco, células M de las placas de Peyer, linfocitos T y B, células plasmáticas (CP), macrófagos (Mφ), eosinófilos, células cebadas (CC) o también llamadas mastocitos y varios tipos de células presentadoras de antígeno (CPA) como por ejemplo las células dendríticas. Algunas de estas células se encuentran localizadas en el epitelio, en la lámina propia (LP) de las vellosidades o de las criptas intestinales, o bien en acúmulos organizados de linfocitos como las placas de Peyer .

En el estudio de la infección primaria por *Trichinella* en roedores se demuestra la expulsión de los parásitos adultos después de tres semanas, la cual coincide con el desarrollo de una fuerte respuesta inmune protectora que se expresa con la expulsión rápida de adultos o preadultos del intestino (Love y cols., 1976; Despommier y cols., 1977; Bell y cols., 1979). Durante este proceso se induce una memoria inmunológica que se ha demostrado cuando, animales inmunes desafiados inmediatamente después de la expulsión de *Trichinella* pueden desarrollar una respuesta inmune en contra de los parásitos infectantes previniendo su establecimiento y reduciendo la sobrevivencia de los mismos. En el caso de la infección secundaria en ratas, los parásitos pueden ser eliminados del intestino en 24 hr.

A nivel intestinal se consideran tres mecanismos que participan en la expulsión de parásitos helmintos (Brandtzaeg y cols., 1985):

1. La exclusión inmune que representa la “primera línea” de defensa y se refiere a la protección dada por factores innatos y por anticuerpos en la superficie de las mucosas, principalmente IgA secretora e IgM.
2. La regulación inmune que es un mecanismo complejo de defensa de “segunda línea”. Este implica respuestas celulares específicas, especialmente en las placas de Peyer y en otros tejidos linfoides asociados al intestino e incluye la diferenciación y activación de linfocitos B y su interacción con varias subpoblaciones de linfocitos T.
3. La eliminación inmune, que involucra reacciones inflamatorias específicas e inespecíficas. Esta se genera por varios tipos celulares y por sus productos, los cuales amplifican la actividad protectora en la superficie de las mucosas.

El primero y tercer mecanismos, se encuentran regulados por procesos inflamatorios y en el caso de la exclusión inmune la inmunidad innata juega un papel importante.

Como se ha mencionado, en la respuesta intestinal que se genera contra *T. spiralis* en roedores, “el mecanismo principal de defensa es la expulsión del adulto”. Durante este proceso, una proporción de LM se elimina, mientras que las larvas sobrevivientes se establecen y maduran a adultos. Posteriormente se observa que después de que los adultos copulan, los machos se eliminan y permanecen particularmente las hembras, las cuales liberan sus LRN y a su vez estas inician la fase sistémica.

En la infección secundaria en ratas el proceso de expulsión se produce de manera más rápida y se dirige principalmente en contra de las LM y de los pre-adultos de *T. spiralis* (Bell, 1998). A este respecto se ha reportado que en roedores infectados con *T. spiralis*, existe una gran variedad de mecanismos que implican una compleja respuesta del intestino a la invasión por este parásito, observándose una interacción entre los mecanismos de inmunidad celular e inmunidad adaptativa.

Durante la invasión del epitelio intestinal se inducen modificaciones tanto en estructura como en función de los enterocitos. En estos cambios se incluye un transporte reducido de hexosa, secreción del ion cloro y la salida de agua de los enterocitos, lo que explica la presentación de diarrea.

En el análisis *in vitro* de la interacción de células epiteliales humanas Caco-2, T84 y HT29 con la LM de *T. spiralis* se demostró que la invasión a dichas células produjo un daño significativo y se encontraron incrementos de ARNm para las citocinas IL-1 β al día 2 post-infección (p.i.), IL-8 y

ENA 78 (Stadnik y cols., 1996). Estos niveles de citocinas podrían estar asociados a la fase aguda de la respuesta inflamatoria dado que la IL-1 β actúa como quimiotáctico y activador de macrófagos, linfocitos B, T y células NK; por otro lado la IL-8 es quimiotáctico de neutrófilos los cuales al degranular atraen células T y monocitos y en el caso de ENA 78 también es quimiotáctico de neutrófilos. El daño que se presenta en estas células provoca la pérdida de la continuidad de la membrana plasmática, lo que origina una pérdida del control osmótico y la consecuente entrada de agua. El incremento en el tamaño de la célula da como resultado final la necrosis de la misma (Wakelin, 1998). Estos fenómenos también los observaron Dunn y cols. (1985) en células epiteliales *in vivo*.

Por otra parte, al fenómeno de expulsión se han asociado también los cambios en la contracción del músculo liso del intestino como dependientes de linfocitos T CD4⁺, y se relacionan con la expulsión temprana o tardía del parásito. En este sentido, Vallance y cols. (1998) observaron que ratones eutímicos y atímicos reconstituidos con linfocitos T provenientes de bazo, presentan un pico de contracción muscular al día 6 p.i., mientras que en los ratones atímicos se presenta un pico de contracción al día 12 p.i. Así mismo en los ratones eutímicos no se encuentra carga parasitaria al día 21 p.i. no obstante en los otros dos casos aun se encuentra carga parasitaria.

En otros estudios donde se evaluaron nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) provenientes de ratones infectados con *T. spiralis*, se reportó la presencia de células Th1 al segundo día p.i. (Ishikawa y cols., 1997). Esta respuesta se observó después de la interacción inicial del parásito con la mucosa intestinal y probablemente implique la producción de citocinas como mediadores de la señal. Sin embargo aún se desconoce si la fuente inicial de estas citocinas son los linfocitos T ó células de la inmunidad innata como los mastocitos (Arizmendi y cols., 2001).

Se ha observado también una asociación temporal entre la expulsión de parásitos y los cambios patológicos del intestino, entre los que se identifica la atrofia de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas, eosinofilia y mastocitosis. El desarrollo de dicha patología es dependiente de IL-4, aunque se sugiere que la inflamación intestinal no es un requerimiento esencial para la expresión de respuesta inmune protectora y para la expulsión del parásito (Lawrence y cols., 1998).

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la expulsión de parásitos es dependiente de células T y está relacionada con la producción de citocinas tipo Th2 entre las que se incluyen IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que participan en la inducción de mastocitosis,

eosinofilia y producción de IgE, contracción muscular y resistencia a la infección (Bancoft y cols., 1998; Vallance y cols., 1999). Cabe resaltar que existen reportes acerca de que la IL-4 generada en el intestino favorece el traslado de IgE específica a través del epitelio intestinal (Ramaswamy y cols., 1994; Negrao-Correa y cols., 1996).

En estudios sobre la cinética de aparición de citocinas como la IL-4, IL-5, IFN- γ y TNF- α en la linfa del intestino de ratas a partir de la infección hasta el día 12 p.i., se ha demostrado la presencia simultánea de IL-4 e IL-5 (respuesta Th2) así como de IFN- γ (respuesta Th1) durante los primeros días después de la infección y un incremento en los niveles de estas citocinas en los días 11 y 12 p.i. lo cual se asocia con la expulsión del parásito. En contraste, Scales y cols. (2004) reportaron que durante el bloqueó del coestimulador inducible (ICOS) en los linfocitos B se presenta una disminución en TNF- α y las citocinas IL-4 e IL-5, así como una disminución de los niveles de IgE en suero y que a su vez este fenómeno no afectó la expulsión del parásito adulto. Por otro lado, los niveles de IL-9, IL-13 e IL-10 se elevaron y se observó un incremento en la protección hacia la LM.

A pesar del predominio de la respuesta Th2, los niveles de producción de IFN- γ muestran varios ciclos de aumento y disminución durante los primeros 7 días p.i., lo que sugiere que esta citocina se asocia con la penetración del parásito en el epitelio intestinal (Ramaswamy y cols., 1996). Asimismo, se ha visto una relación entre el papel de la IL-4 y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), la cual se asocia a la patología intestinal y sugiere que el TNF pudiera estar bajo la regulación de IL-4. En contraste con estos datos, Urban y cols. (2000) observaron que al utilizar ratones deficientes de IFN- γ e infectarlos con *T. spiralis* se expulsa más frecuentemente el parásito en comparación a los ratones normales.

En relación a la producción de anticuerpos en el intestino de animales infectados con *T. spiralis* se ha reportado la detección de los isotipos IgG, IgE e IgA. La respuesta de IgA se ha observado durante las dos primeras semanas de infección y de acuerdo a los estudios realizados por Bell (1998) sobre áreas distintas a las placas de Peyer (PP) del intestino, se detectaron incrementos en la concentración de IgE que en conjunto con la IgA impiden la penetración de las larvas adultas a las células epiteliales.

En estudios recientes empleando un modelo *in vitro* de invasión de células por *T. spiralis* desarrollado por Appleton y Usack (2000) se observó que los anticuerpos monoclonales contra tivelosa (componente de antígenos localizados en la superficie y también de secreción/excreción

de la LM) dificultan el movimiento de la LM dentro de las células y también interfieren con el desarrollo del parásito.

En 1999 Mc Vay y cols. mostraron que la reacción cruzada de los productos de E/S y antígenos de superficie de la LM es necesaria para la protección de células epiteliales contra la infección con *T. spiralis* y Negrao-Correa y cols. (1999) reportaron que la IgE obtenida a partir de lavados del epitelio intestinal de ratas LEWIS al día 12 p.i., reacciona con un conjunto de antígenos metabólicos con pesos moleculares por arriba de 60 kDa y con antígenos >200 kDa de extracto total del adulto.

Hua Wang y cols. (1999) describieron que el antígeno 9D4 del adulto promueve una respuesta específica de anticuerpos al día 5 p.i. en ratas infectadas con *T. spiralis*, la cual es producida por células B localizadas en lugares distintos a las placas de Peyer del intestino delgado.

En relación con el isotipo de anticuerpos producidos en la mucosa intestinal de ratas infectadas con *T. spiralis* en 1996 Negrao-Correa y cols. reportaron que la inducción de una respuesta intestinal específica de anticuerpos en ratas infectadas con *T. spiralis* se asoció con la expulsión del parásito adulto de animales infectados. En 1998 McVay y cols. determinaron *in vitro* que existe protección a las células epiteliales MDCK por los anticuerpos monoclonales de las subclases IgG2a e IgG2c específicos para tivelosa. En este estudio, las células epiteliales se cultivaron previamente con los anticuerpos anti-tivelosa y se observó que eran protegidas al exponerlas a la infección con la LM.

Peters y cols. en 1999 mostraron que las células productoras de IgG2c de nódulos linfáticos mesentéricos promueven la respuesta temprana en ratas PVG infectadas con *T. spiralis* y los anticuerpos utilizados fueron específicos para proteínas con fosforilcolina de la LM.

En 1998 Hua Wang y cols. revelaron que los linfocitos B activados durante la infección de *T. spiralis* en ratas en regiones diferentes a las Placas de Peyer del intestino delgado expresan todos los isotipos de anticuerpos contra antígenos de *T. spiralis*. Los anticuerpos de los isotipos de IgG e IgE se produjeron en los dos primeros días p.i. siendo mayor la producción de IgE. En estudios posteriores se observó que estos isotipos drenan a los nódulos linfoides mesentéricos de ratas infectadas con *T. spiralis* del día 3-5 p.i.

Santamarina y cols. (1988) observaron que los antígenos de las fases pre-adulto y adulto inducen la producción de IgE y Ahmad y cols. (1991) demostraron que la transferencia pasiva de IgE purificada de sueros de ratas infectadas con *T. spiralis* media la expulsión temprana de organismos adultos en ausencia de otras inmunoglobulinas. Así mismo, Negrao-Correa (1996)

observó que la IgE obtenida de lavados intestinales al día 11 p.i. es capaz de reconocer antígenos de adulto y de la LM y sugiere que la IgE específica participa en el recubrimiento y posiblemente en la expulsión del parásito del intestino. Posteriormente, Bell y cols. (1999) observaron que durante la infección con *T. spiralis* en ratas LEWIS y LOU se incrementó significativamente la IgE en el intestino en comparación a los niveles encontrados en el suero, lo cual se relaciona con la expulsión rápida del parásito en estas cepas de ratas.

Un componente importante en la respuesta inmune primaria que participa en la expulsión de *T. spiralis* son las células cebadas (CC) de la mucosa intestinal. Las CC sintetizan y secretan varias moléculas con actividad farmacológica, proinflamatoria y de regulación del sistema inmunitario. En estas células se encuentran moléculas preformadas como histamina, heparina, condroitín-sulfato, TNF y proteasas de serina (también serotonina en ratas), además se sintetizan de novo otras moléculas como: leucotrienos, prostaglandinas, citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN- γ) y quimiocinas (MCP-1, MIP-1 y RANTES).

Las CC pueden vivir meses ó años y esto les permite sintetizar otra “reserva” de mediadores y participar en nuevas respuesta después de haber recibido una estimulación específica y haber liberado el contenido de sus gránulos (Abraham y Malaviya, 1997).

Las moléculas preformadas se acumulan en gránulos los cuales se pueden liberar por degranulación progresiva (gránulo a gránulo) ó por degranulación anafiláctica, en donde los gránulos se fusionan dentro de la célula antes de ser liberados. El modo de degranulación depende del estímulo que recibe la CC como sucede con la estimulación por medio de IgE en donde se produce una degranulación de tipo anafiláctica (Kirillova y cols., 1993).

Los productos liberados por las células cebadas participan en la modificación de la absorción, la secreción y la movilidad a nivel intestinal, así mismo, tienen efectos a nivel sistémico como la vasodilatación (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄), así como la modificación en la adhesión de ciertas células (Abraham y Malaviya, 1997). Es importante mencionar que se ha demostrado que el TNF es quimiotáctico para los neutrófilos y las CC son las únicas que pueden almacenar esta molécula y liberarla en el momento en que reciben una estimulación adecuada. También moléculas como el LTB₄ y la IL-8 liberadas por las CC participan en la atracción de neutrófilos al sitio de infección (Malaviya y cols., 1996).

Entre las moléculas pro inflamatorias liberadas por células cebadas de animales infectados con *T. spiralis* se encuentran los leucotrienos (LTC₄ y LTB₄), que como se mencionó, promueven la

secreción de moco e incrementan el peristaltismo del intestino, lo cual puede impedir el establecimiento del parásito y promover su expulsión (Moqbel y cols., 1987).

Además, en estudios realizados con ratones, se observó una correlación entre la presencia de mastocitosis intestinal, la expulsión del parásito y la liberación de una proteasa específica de CC de mucosa (IMCP) (Tuohy y cols., 1990). Así mismo, se ha demostrado una correlación directa entre el nivel de resistencia a la infección y la presencia de mastocitosis y producción de IMCP. Por otro lado, se ha sugerido que la función de este tipo de proteasas (rIMCP y rMCP II en el caso de CC de mucosa intestinal de rata) está relacionada con el incremento en la permeabilidad intestinal, permitiendo de esta forma la transferencia de anticuerpos y otras proteínas del plasma al lumen del intestino de los animales infectados con el parásito.

La utilización de ratones transgénicos deficientes en células cebadas (W/W^v) y en el gene para la IMCP, ha permitido comprobar la participación de estas células y en particular de esta proteasa en el proceso de expulsión, ya que en estos animales la eliminación del adulto es más lenta (Alizadeh y Murrel, 1984; Knight y cols., 2000).

Por otro lado, la participación de CC y de IgE en la inducción de la expulsión del parásito adulto ha sido documentada ampliamente (Woodbury y cols., 1978; Alizadeh y Murrel, 1984; Oku y cols., 1984; Tuohy y cols., 1990; Ahmad y cols., 1991). Gurich y cols. (2004) reportaron que la infección con *T. spiralis* promueve una respuesta intensa de IgE con aumento significativo de CC a nivel del bazo e intestino. Así mismo sugieren que este evento promueve la expulsión del parásito del intestino y que la IgE es capaz de reconocer diferentes estadios del parásito. La interacción de estos dos componentes con moléculas del parásito induce la liberación por parte de las CC de moléculas pro-inflamatorias, probablemente responsables de los cambios fisiológicos que se observan en el intestino de animales infectados durante la expulsión del adulto. De esta forma se sugiere que el proceso de expulsión del adulto se realiza como resultado de un proceso inflamatorio en el intestino de animales infectados.

Si bien se tienen evidencias sobre la participación de diversos mecanismos de inmunidad innata y adquirida en la respuesta del intestino hacia el parásito adulto de *T. spiralis*, se requiere identificar los antígenos de este estadio que sean capaces de inducir este tipo de respuestas inmunes. La identificación y posteriormente el estudio del papel que tienen los antígenos específicos del estadio adulto de *T. spiralis* en la inducción de una respuesta inmune durante la infección intestinal nos permitiría dilucidar aspectos sobre la interacción de este estadio del parásito con mecanismos inmunes del huésped. Esto último permitirá en un futuro diseñar las

estrategias adecuadas para el diagnóstico, control y prevención de la trichinellosis así como el diseño adecuado de inmunógenos orales.

II. JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado, en la respuesta intestinal que se genera contra *T. spiralis* en roedores, “el mecanismo principal de defensa es la expulsión del adulto”. A ese respecto, se ha demostrado que durante la infección primaria en roedores, el estadio adulto se expulsa después de la tercera semana y se desarrolla una marcada resistencia a la reinfección (Love y cols., 1976; Bell y Despommier, 1979). En las primoinfecciones en el cerdo, que es el hospedero definitivo, la fase adulta puede permanecer en el intestino por períodos de más de 60 días (Marti y Murrell, 1986) y aún se desconocen los mecanismos que participan en la permanencia de los adultos a nivel intestinal. Así mismo, esta especie desarrolla una fuerte resistencia a la reinfección expulsando los parásitos adultos en alrededor de tres semanas y se ha descrito la inducción de una inmunidad efectiva contra las LRN y la LM además de una reducción de la fertilidad de las hembras adultas, lo cual evita el establecimiento de los nuevos parásitos en el huésped (Marti y Murrell, 1986).

Hasta ahora se cuenta con una amplia información acerca de la respuesta inmune generada hacia la LM en roedores. Estos estudios se han enfocado principalmente al análisis de la inmunidad sistémica y poco se sabe de la relación hospedero-parásito a nivel intestinal. Sin embargo, dada la relevancia del fenómeno de expulsión de la fase adulta como mecanismo inmunitario a nivel intestinal, es de gran importancia definir la participación de los antígenos provenientes del estadio de adulto del parásito hacia los cuales se establece esta respuesta por parte del hospedero.

Se ha mencionado que el sistema inmune mucosal intestinal posee los mismos componentes que el sistémico, sin embargo, existen diferencias importantes en su función y su regulación (Kioyono y cols., 1992). Del mismo modo, a nivel intestinal se pueden detectar elementos potencialmente nocivos para el organismo e inducir respuestas inmunes en contra de ellos. Por otro lado, el sistema inmune de la mucosa intestinal es capaz de regular las respuestas inmunológicas no deseadas contra los componentes de la alimentación, que aunque son antigénicos, son vitales para la existencia del mismo (Bienenstock y cols., 1987).

Por lo tanto y considerando que la permanencia del estadio adulto en el intestino induce mecanismos inmunes que son relevantes durante la primera fase del ciclo biológico del parásito, resulta de gran importancia en primera instancia identificar los antígenos específicos de este estadio del parásito. Posteriormente se podrá analizar el papel de estos antígenos en la activación

de la respuesta inmune intestinal que permiten el establecimiento del adulto en la mucosa del intestino y a su vez inducen resistencia a la reinfección.

Para la identificación de antígenos estadio específicos del estadio adulto de *T. spiralis* se requiere en primer lugar estrategias que permitan la diferenciación entre este estadio y los estadios de LM ó LRN. Así mismo, es importante la obtención de estos antígenos en formas puras para posteriormente analizar su participación en la inducción de la respuesta inmune intestinal.

Una alternativa para la identificación y obtención de antígenos puros específicos del estadio adulto del parásito es mediante el empleo de métodos recombinantes. Los métodos recombinantes tienen la ventaja que permiten reducir los costos de producción de antígenos y aseguran el abasto de los mismos en cantidades ilimitadas.

Los antígenos recombinantes se pueden evaluar en ensayos de inducción de la respuesta inmune intestinal hacia *T. spiralis* mediante la activación *in vitro* de aquellas células que se conoce están involucradas (células cebadas, linfocitos etc.). El conocimiento que se tenga de la interacción de los antígenos específicos del estadio adulto con el huésped permitirá establecer estrategias más adecuadas para el diagnóstico, así como en la prevención o el control de la trichinellosis a través del desarrollo de vacunas.

Una desventaja en el aislamiento de transcritos estadio específicos en parásitos nemátodos es la cantidad tan reducida de larvas de que se dispone en los métodos de obtención convencionales para utilizarse en la extracción de ARN total.

En el caso de *Trichinella spiralis* la obtención de LM puede ser relativamente fácil, sin embargo, para recuperar cantidades suficientes de los estadios de adulto y de LRN se requiere tanto de un número grande de animales infectados como de procedimientos laboriosos para la separación de estas fases. Así mismo, se debe considerar la existencia de genes compartidos entre la LM, adulto y la LRN. En ese sentido, se contempla la existencia de un porcentaje reducido de genes específicos de cada estadio que se manifiestan en un flujo antigénico determinado dentro de las diferentes etapas del desarrollo del parásito (Figura 2).

Existen alternativas en los métodos moleculares en donde se utilizan cantidades mínimas de ARN total a partir de las cuales se pueden desarrollar bibliotecas de ADNc. Algunas de ellas permiten la identificación de genes que se expresan diferencialmente entre dos distintas poblaciones (ej. Hibridación sustractiva, Reacción en Cadena de la Polimerasa para expresión diferencial, etc.) (Devaney y cols., 1996).

FLUJO ANTIGÉNICO DE *T. spiralis*

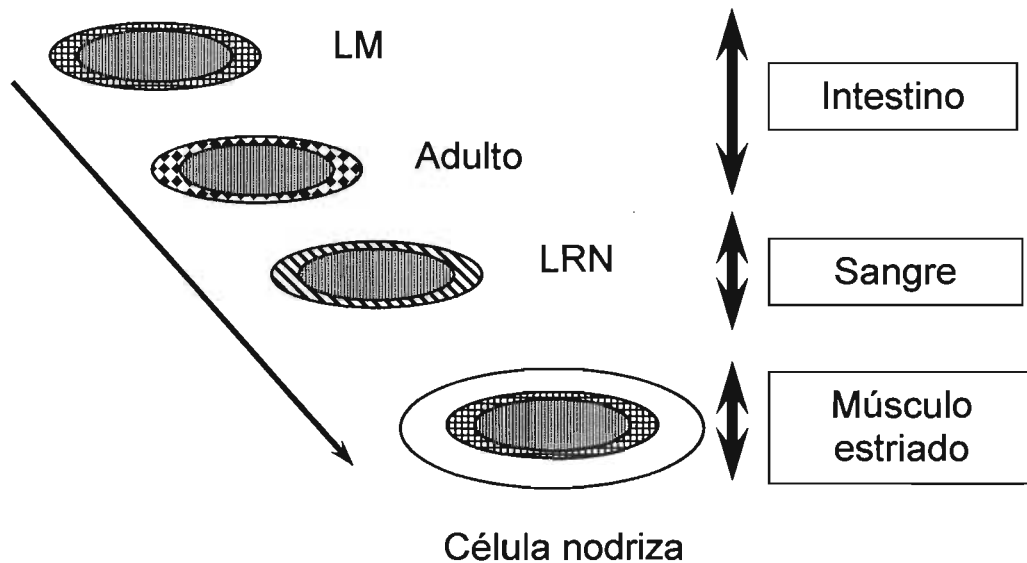


Figura 2. Flujo antigénico de *Trichinella spiralis*

El método denominado “Supresión de la Hibridación Sustractiva” (SSH) (Diatchenko y cols., 1996) se ofrece en el mercado actualmente como un kit comercial (Clontech, Palo Alto, CA) y es la técnica mas utilizada para identificar genes expresados diferencialmente. Este método de Hibridación Sustractiva se describió desde los 80’s (Sargent y Dawid, 1983; Davis y cols. 1984) y los avances en el mejoramiento de esta técnica dieron lugar a la SSH. Entre las ventajas en esta tecnología se encuentra la posibilidad de aislar genes desconocidos, raros o en bajas proporciones dentro de una población al compararse con otra. Así mismo, los procedimientos empleados no requieren de equipo especializado.

De acuerdo a estas características, la técnica de Hibridación Sustractiva se seleccionó como la estrategia indicada para la identificación de genes específicos del estadio adulto de *Trichinella spiralis*. De acuerdo a las propiedades ya mencionadas, esta técnica permite utilizar cantidades mínimas del ARNm para iniciar el protocolo de sustracción de genes. Esto evita la necesidad de separar frecuentemente larvas adultas, lo cual representa una gran labor y a su vez disminuye el sacrificio de gran número de animales.

OBJETIVOS

III. OBJETIVO GENERAL

Clonar y expresar un gen estadio específico de la fase adulta de *Trichinella spiralis*.

IV. OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar una biblioteca sustractiva para la obtención de genes de la fase adulta de *Trichinella spiralis*.
- Seleccionar y caracterizar secuencias de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *Trichinella spiralis* empleando sondas específicas
- Clonar y expresar un gen específico de la fase adulta de *Trichinella spiralis* en un vector de expresión de procariontes.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 MANTENIMIENTO DEL CICLO DE *T. spiralis*

Las cepas de *T. spiralis* ISS 406 y N2/HN se mantuvieron por pases continuos en ratones hembras Swiss OF1, las cuales se infectaron vía oral con 400 LM/animal.

5.2 Obtención de la larva muscular

Para la obtención de la LM, se infectaron ratones por vía oral con 400 LM/ratón y se sacrificaron por desnucamiento a las 6 semanas p.i. Después de retirar la carcasa, el tejido muscular y óseo se trituró finamente en una procesadora de alimentos (Moulinex). El macerado se digirió a 45°C durante 1 hr en una solución de pepsina-HCl al 1% (10 ml/g). La solución con el material digerido se colocó en un matraz de decantación y se dejó sedimentar durante 15 min. Para determinar el número de larvas, se colectaron 100 ml del sedimento y se realizó una dilución 1:1000, la cual se utilizó para el conteo por medio del triquinoscopio. Las larvas destinadas para la extracción de ARN total se lavaron 4-5 veces con RPMI-1640 y se almacenaron a -70°C (Dennis y cols. 1970).

5.3 Obtención de adultos y larvas recién nacidas

Las larvas adultas provenientes de ratones hembras Swiss OF1 infectadas por vía oral con la LM de *T. spiralis* (2000 LM/ratón), se colectaron al día 3, 5 y 6 p.i. A la necropsia, se extrajo el intestino delgado de cada ratón infectado, el cual se abrió longitudinalmente para exponer la mucosa. Posteriormente las larvas se lavaron con PBS 1x para retirar el contenido intestinal y se incubaron en PBS 1 x por 1 hr a 37°C. Al término de la incubación las larvas adultas se colectaron individualmente con pipeta Pasteur, se colocaron en tubos de centrifuga de 15 ml y para empaquetarlas se centrifugaron a 1000 x g durante 15 segundos. Las larvas adultas del día 3 p.i. se lavaron 6 veces en RPMI 1640 (Gibco BRL) complementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 UI/ml de estreptomicina. Al finalizar los lavados se retiró el sobrenadante hasta el tope y se resguardaron a -70°C hasta su utilización.

Para la obtención de LRN, las larvas adultas colectadas los días 5 y 6 p.i. se incubaron a 37°C durante 2 días en RPMI 1640. La separación de las LRN de cada día del cultivo se realizó por centrifugación a 1000 x g y las larvas se resguardaron a - 70°C hasta su uso.

5.4 Determinación de Prolificidad *in vitro* de *T. spiralis*

Para determinar la pureza de las larvas adultas con respecto a la presencia de LRN, se realizó un ensayo para determinar la prolificidad *in vitro* de las hembras. En este contexto se utilizaron larvas adultas obtenidas del tracto intestinal de ratones hembras (OF1 Swis), al 3er y 4to día p.i. con *Trichinella spiralis*. Las larvas se lavaron previamente y se diluyeron en 5 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino. La dilución de larvas adultas se colocó en microplacas de 96 pozos a razón de 250 µl/pozo, y posteriormente se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los cultivos se evaluaron durante 7 días realizando el conteo de las LRN en los pozos individuales. Para determinar el porcentaje de prolificidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de prolificidad} = \frac{\# \text{ de LRN}}{\# \text{ de hembras adultas}}$$

5.5 Preparación de ARN total

En la preparación de ARN total de la fase adulta de *T. spiralis* se utilizaron aproximadamente 20,000 larvas de cada cepa (ISS-406 y N2/HN), las cuales se obtuvieron del tracto intestinal de ratones sacrificados al día 3 p.i. (p.i). (2000 LM/ratón) y para el ARN total de la LM se utilizaron aproximadamente 15,000 larvas de la cepa china obtenidas por digestión con pepsina-HCl del músculo esquelético de ratones de 6 semanas p.i. con *T. spiralis* (400 LM/ratón).

La extracción del ARN total se realizó como lo describieron Chomezynski y Sacchi en 1987 empleando cloroformo-fenol e isotiocianato de guanidina. En primer lugar se preparó una solución madre con 250 g de isotiocianato de guanidina (SIGMA, cat. G-9277), 17.6 ml de citrato de sodio (pH 7.0, 0.75 M) y 26.4 ml de sarcosil (10 % a 65°C). La solución se solubilizó en una platina caliente con agitación y finalmente se almacenó hasta por 3 meses a 4°C.

En la primera extracción de ARN el paquete de larvas adultas se colocó en un homogenizador estéril, inmediatamente se le adicionó 1 ml de solución D (50 ml de solución madre + 0.36 ml de β -mercaptoetanol), 133 μ l de acetato de sodio (pH 5.2 3 M), 2 ml de fenol y 0.4 ml de cloroformo-iso-amil-alcohol (IAA) (24:1). La mezcla se homogenizó en un baño de hielo durante 10 min hasta destruir las larvas. Posteriormente para la segunda extracción de ARN, las paredes del homogenizador se lavaron con 0.5-1 ml de solución D, 3.3-7 μ l de acetato de sodio (pH 5.2, 3 M), 0.5-1.0 ml de fenol y 100-200 μ l de cloroformo-IAA (24:1). El homogenizado se mantuvo en reposo 20 min a 4°C, se colocó en tubos de 1.5 ml y se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4°C en una micro centrífuga marca Jovan A-14. La fase acuosa obtenida en el centrifugado se colectó sin tocar la pastilla del fondo, se pasó a un tubo de 1.5 ml y se adicionó isopropanol (V fase acuosa) volumen a volumen. La preparación se agitó suavemente y se precipitó a -20°C durante 1 hr. Para la recuperación del ARN la muestra se centrifugó a 10,000 x g, 20 min a 4°C. El paquete obtenido se solubilizó con 0.7 ml de solución D, se adicionó isopropanol y se mantuvo a -20°C durante 1 hr. Enseguida se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, el paquete se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y enseguida se centrifugó a 10,000 x g por 10 min a 4°C. La pastilla de ARN se secó a -55°C durante 15 min en una bomba de vacío y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

5.6 Preparación de ARNm poly (A)⁺

El ARNm poly (A)⁺ se purificó por medio de cromatografía de afinidad utilizando un kit de OligotexTM direct ARNm Midi (QIAGEN cat. 70042). Durante este procedimiento se utilizaron aproximadamente 1,1 mg de ARN total obtenidos del estadio adulto (N2/HN e ISS-406) y 1,3 mg de la LM (N2/HN). El ARN se separó en dos tubos de micro centrífuga de 1.5 ml y cada muestra se ajustó a un volumen de 500 μ l utilizando agua tratada con DEPC (H₂O-DEPC) (SIGMA cat. D-5758). Posteriormente se adicionaron 500 μ l de amortiguador de ligadura 2x (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1000 mM NaCl, 2 mM EDTA y 0.2 % SDS) y 45 μ l de suspensión de Oligotex (10 % w/v de partículas de Oligotex en 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS y 0.1% NaN₃). Las muestras se incubaron en baño María durante 3 min a 65°C y posteriormente se mantuvieron 10 min a temperatura ambiente. La suspensión de Oligotex se centrifugó a 10,000x g, 2 min y se retiró el sobrenadante. El paquete obtenido se resuspendió dos veces para su lavado en 500 μ l de amortiguador OW2 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM Na Cl y 1 mM de EDTA) y

se colocó en la columna de cromatografía, la cual se centrifugó a 10,000 x g 30 min. El ARNm poly (A)⁺ se eluyó de la columna utilizando 100 µl (en dos pasos) de amortiguador de elución (5 mM Tris-HCl pH 7.5) precalentado a 70°C. Para precipitar el ARNm poly (A)⁺ se adicionó acetato de sodio 3 M pH 5.2 (SIGMA cat. S-7899) en proporción 1:10 y 600 µl de etanol absoluto, posteriormente la muestra se mantuvo a -20°C durante toda la noche. Para recuperar el ARNm se centrifugó la muestra por 1 hr a 10,000 x g a 4°C y el paquete obtenido se lavó con etanol al 75%. La muestra se secó empleando bomba de vacío y se almacenó a -70°C hasta su utilización.

5.7 Transcripción *in vitro* de ADNc a ARNm poly (A)⁺

El ARNm poly (A)⁺ se obtuvo también mediante transcripción *in vitro* a partir de bibliotecas de ADNc, para este propósito se empleó el kit AmpliScribe™ T3, (TEBU, Epicentre Technologies).

Durante el protocolo se utilizaron aproximadamente 8 µg de ADNc plasmídico proveniente de bibliotecas de ADNc de la fase adulta, adulto+LRN y LM de la cepa china. El ADNc en solución se precipitó con etanol durante 18 hr y posteriormente se centrifugó a 10,000 x g durante 1 hr a 4°C. Después de remover el sobrenadante, el paquete se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. El ADN de la muestra, se resuspendió en 8 µl de H₂O-DEPC y se agregaron 2 µl de amortiguador de reacción de T3 (10 x), 1.5 µl de ATP 100 mM, 1.5 µl de CTP 100 mM, 1.5 µl de GTP 100 mM, 1.5 µl de UTP 100 mM, 2 µl de DTT 100 mM y 2 µl de la enzima de T3 en solución (AmpliScribe). La mezcla se agitó suavemente, se incubó a 39°C durante 2.5 hr y se adicionó 1 µl de ADNasa (1MBU) libre de ARNasas para nuevamente incubar por 15 min a 37°C. La extracción del ARNm obtenido se realizó con cloroformo-fenol y se precipitó con acetato de sodio. Posteriormente el ARNm se purificó en columnas cromato-spin 100 (Clontech Laboratories, Inc, cat. 1332-2) y el producto se almacenó a -70°C hasta su uso.

5.8 Cuantificación de ARN por tiras reactivas

De acuerdo al tipo de ARN utilizado (ARN total ó ARNm) y a la cantidad disponible de cada muestra se utilizaron diversos métodos para cuantificar el ARN.

Una estrategia de cuantificación del ARN total utilizada fue mediante el Kit IBI-DNA Quik STRIP (Kodak-Laboratory and Research Products cat. IB73000). Durante el procedimiento se utilizó 1 μ l de la muestra a cuantificar, la cual se homogenizó en un 1 μ l de amortiguador TE pH 8.0. Posteriormente se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 del homogenizado y de las cuales se tomó 1 μ l de cada dilución para colocarse en tiras reactivas proporcionadas en el Kit. Después de secar las tiras, las marcas reveladas por el ARN presente se compararon con tiras control preparadas con ARN de referencia para determinar su concentración.

5.9 Cuantificación de ARN en geles de Agarosa

Otro método utilizado en este trabajo fue la cuantificación de ARN en geles de agarosa al 0.8%. Durante este protocolo, la agarosa (Sigma cat. A-9539) se homogenizó en amortiguador Tris acetato (TAE) a una temperatura de 95°C. El homogenizado se enfrió hasta 50°C y se adicionaron 10 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) (AMRESCO Interchim, France cat. E406). La agarosa en solución se adicionó a cajas Petri de 150 mm, las cuales al enfriarse se incubaron a 37°C por 30 min y se almacenaron a 4°C cubiertas con papel aluminio hasta su uso. Para la cuantificación de ARN, se adicionó la muestra como sigue: 1 μ l de solución concentrada y 1 μ l de las diluciones 1:10 y 1:100. La muestra se virtió en forma de punto sobre el gel de agarosa y los puntos se compararon con las diluciones de referencia 1:50, 1:100 y 1:200 de ARN total control preparadas previamente sobre el mismo gel.

5.10 Cuantificación de ARN por espectrofotometría

Esta metodología se utiliza sobre todo para ARN total, ya que es poco sensible el espectro en bajas cantidades de ARN, como es el caso del ARNm. En este método se realizaron diluciones 1:100 y 1:200 de la muestra de ARN y se cuantificaron en un espectrofotómetro a 260 nm de absorbancia. La concentración de las muestras de ARN se calculó con la fórmula siguiente: $40 \times A_{260} / \text{factor de dilución}$. Considerando que una absorbancia de 1 corresponde a 40 μ g de ARN/ml ($A_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$).

5.11 CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE ADNc en λ ZAPII

Debido a que las técnicas de separación de larvas adultas y de LRN son complicadas y consumen tiempo, se desarrollaron previamente tres bibliotecas de ADN complementario (ADNc) para utilizarlas durante el tamizaje con sondas de genes específicos de estadio. En ese sentido se prepararon dos bibliotecas de ADNc correspondientes a los aislados ISS-406 (cepa francesa) y N2/HN (cepa china) de la fase adulta de *T. spiralis* y una biblioteca de ADNc del aislado N2/HN (cepa china) de la LM de *T. spiralis*.

Por otro lado también se utilizaron dos bibliotecas de ADNc de la fase adulta más la LRN (adulto+LRN) de las cepas ISS-406 y N2/HN, las cuales se prepararon previamente por Liu Minguyan (CNEVA-Alfort Francia).

La construcción de bibliotecas de ADNc se realizó en el vector λ ZAPII utilizando el Kit ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] II Gold Cloning (Stratagene) partiendo con 5 μ g ARNm Poli (A)⁺ de acuerdo a la estrategia descrita más adelante.

5.11.1 Principios para la construcción de bibliotecas en el vector λ ZAPII

Las bibliotecas de ADNc representan la información presente en el ARNm de un tejido en particular. Debido a que las moléculas de ARN son excepcionalmente lábiles y difíciles de amplificar en su forma natural, es necesario convertirlas a ADNc estable, el cual para este caso se inserta en el vector de replicación lambda. La biblioteca de ADNc entonces contendrá copias completas de la población original de ARNm que pueden ser examinadas e interpretadas con facilidad.

El kit de síntesis ZAP-ADNc utiliza un oligonucleótido híbrido para ligar “oligo [dT]”, el cual contiene un sitio *Xho* I. En la síntesis de la primera cadena de ADN se prepara el templado de ARNm con el oligo (dT) y se transcribe utilizando la enzima MMLV-RT con 5-metil dCTP. El 5-metil dCTP tiene como objetivo hemimetilar el ADNc y así protegerlo de la digestión por ciertas endonucleasas de restricción tales como *Xho* I. De esa manera la digestión posterior del ADNc con *Xho* I ataca únicamente el sitio no metilado con el oligo (dT). De esta manera el ADN hemimetilado se puede introducir en cepas bacterianas como *McrA*⁺ *McrB*⁺ (ej. XL1-Blue MRF⁺) y ser sujetas así a la digestión con sistemas de restricción *mcrA* y *mcrB* internos.

La síntesis de la primera cadena de ADNc inicia cuando la transcriptasa reversa (RT) en presencia de nucleótidos (dATP, dGTP, dTTP más el análogo 5-metil dCTP) y un amortiguador, encuentra un templado y un oligonucleótido. El templado es el ARNm y el oligonucleótido es una secuencia de 50 bases como sigue:

5' GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'

Secuencia "GAGA"

Xho I

Poli (dT)

Este oligonucleótido posee una secuencia "GAGA" para proteger el sitio *Xho* I y una secuencia poli (dT) de 18 bases. El sitio de restricción *Xho* I permite insertar el ADNc en el vector Uni-ZAP XR en un sentido de orientación (*Eco*R I-*Xho* I) con respecto al promotor *lacZ*. La región poli (dT) se une a la región 3' poli (A) del ARNm y entonces la RT-MMLV inicia la síntesis de la primera cadena.

Durante la síntesis de la segunda cadena se utiliza ARNasa, la cual corta el ARN unido al ADNc de la primera cadena y produce una multitud de fragmentos que sirven como oligos para que la ADN polimerasa I promueva la síntesis de la segunda cadena de ADNc. En este caso se incorpora dCTP para reducir la probabilidad de que el 5-metil dCTP se incorpore a la segunda cadena. Esto asegura también que los sitios de restricción en el oligo de ligadura, serán susceptibles a la digestión con enzimas de restricción. Las terminaciones irregulares del ADNc de doble cadena se nivelan con *Pfu* ADN polimerasa y entonces las terminaciones romas se pueden ligar a los adaptadores *Eco*R I que poseen la siguiente secuencia:

5' AATTCGGCACGAG 3'

3' GCCGTGCTC 5'

Estos adaptadores se componen de 9 y 13-mer oligonucleótidos, los cuales son complementarios y poseen terminaciones cohesivas *Eco*R I. Posteriormente la digestión con *Xho* I libera el adaptador *Eco*R I y el oligo de ligadura residual de la porción 3' del ADNc. Los fragmentos se separan con columnas de Sephacryl® S-500 y posteriormente el ADNc fraccionado se precipita para ligarse a los brazos del vector Uni-ZAP XR.

El vector Uni-ZAP XR posee un plásmido en su sistema que permite la selección de las colonias bacterianas transformadas por color (azul-blanco). Así mismo permite la escisión *in vivo* del fagémido (plásmido) pBluescript®. El polilinker del fagémido pBluescript contiene 21 sitios de clonación únicos flanqueados por los promotores T3 y T7 y 6 diferentes sitios con oligos que

facilitan la secuenciación. El fagémido tiene también el origen de replicación fl del bacteriófago que permite el rescate de ADN de cadena sencilla.

5.11.2 Síntesis de la primera cadena de ADNc

Durante la síntesis de la primera cadena se utilizaron 5 µg de ARNm Poli (A)⁺ a los que se les agregaron 5.0 µl de amortiguador 10 x de primera cadena, 3 µl de mezcla de nucleótidos metilados de primera cadena (dATP, dGTP y dTTP 10 mM más 5-metil-dCTP 5 mM), 2 µl de oligonucleótido de ligadura (1.4 µg/µl), 1 µl de inhibidor de ribonucleasas (40 U/µl) y agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) ajustando a un volumen final de reacción de 50 µl. La mezcla se agitó suavemente para permitir la alineación del templado a los oligonucleótidos y se incubó a temperatura ambiente 10 min. Posteriormente se añadió 1.5 µl de la enzima transcriptasa reversa del virus de leucemia Maloney del murino (MMLV-RT-50 U/µl). La reacción se incubó durante 1 hr en baño María a 37°C.

5.11.3 Síntesis de la segunda cadena de ADNc

En la síntesis de la segunda cadena, a la mezcla obtenida de la primera cadena se le agregaron 20 µl de amortiguador 10 x de segunda cadena, 6 µl de mezcla de nucleótidos (dNTP) de segunda cadena (dATP, dGTP y dTTP 10 mM y dCTP 26 mM), 88.9 µl de agua con DEPC y 2 µl de [α -³²P] dNTP (800 ci/mmol). La mezcla se agitó suavemente y se incorporaron 2 µl de RNAsa H (1.5 U/µl) y 11.1 µl de ADN polimerasa I (9.0 U/µl). Para finalizar la muestra se incubó a 16°C durante 2 ½ hr y el tubo se colocó en hielo.

Con el fin de recortar las terminales del ADNc se agregó a la muestra 23 µl de mezcla de dNTP's de recorte y 2 µl de ADN polimerasa clonada en *Pfu*. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 30 min a 72°C, posteriormente se agregaron a la reacción 200 µl de fenol (pH 7-8)-cloroformo [1:1 (v/v)], se agitó en un vortex y se centrifugó por 2 min a 10,000 x g. El sobrenadante de la reacción se tomó cuidadosamente, se colocó en un tubo de micro-centrífuga de 1.5 ml y se agregó cloroformo. Después de agitar la muestra, se centrifugó por 2 min a 10,000 x g y se tomó el sobrenadante para su precipitación, para lo cual se agregaron 20 µl de acetato de sodio 3 M y 400 µl de etanol al 100 %. Después de agitar la muestra, se centrifugó a 10,000 x g durante 1 hr a 4°C y el paquete obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70% (v/v) sin agitación y se centrifugó a 10,000 x g por 2 min a temperatura ambiente.

5.11.4 Ligadura de adaptadores

Durante la ligadura de los adaptadores, el paquete con el ADNc se secó completamente en una bomba de vacío, se resuspendió en 9 μ l de adaptadores de *EcoR* I y el ADNc se incubó a 4°C por 30 min. A la reacción se agregó 1 μ l de amortiguador 10 x de ligadura, 1 μ l de ATPr 10 mM y 1 μ l de ligasa T4 ADN. La mezcla se agitó suavemente y se incubó durante toda la noche a 8°C. Para inactivar la ligasa, la muestra se calentó en un baño María a 70°C por 30 min, se centrifugó suavemente y se estabilizó a temperatura ambiente por 5 min.

5.11.5 Fosforilación de las terminales de *EcoR* I

Para la fosforilación de las terminales de *EcoR* I, se preparó por separado 1 μ l de amortiguador de ligasa, 2 μ l de ATPr 10 mM, 6 μ l de agua estéril y 1 μ l de polinucleótido-cinasa de T4 (10 U/ μ l). Esta preparación se agregó a la ligadura y se incubó a 37°C durante 30 min. La cinasa de la reacción se inactivó en un baño María por 30 min a 70°C.

5.11.6 Digestión con la enzima *Xho* I

Las muestras fosforiladas se digirieron con la enzima *Xho* I (40 U/ μ l) a la que se agregaron 28 μ l de amortiguador de *Xho* I y se incubó a 37°C durante 1.5 hr. Finalmente se dejó enfriar la reacción a temperatura ambiente y se le agregaron 5 μ l de amortiguador STE 10 x (NaCl 1 M, Tris-HCl 200 mM pH 7.5 y EDTA 100 mM).

Para separar el ADNc de la mezcla se utilizaron columnas Chroma spin-400 (CLONTECH Laboratories, Inc cat. 13332-2). La muestra se mezcló con la matriz de las columnas, las cuales se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y a su vez se pusieron en tubos de 15 ml de vidrio para centrífuga. La centrifugación de la muestra se realizó a 700 x g durante 5 min en un aparato Jovan E96 Saint Naizare, France. Para la extracción de la muestra se adicionó fenol (pH 7-8)-cloroformo [1:1 (v/v)], se lavó con etanol y se precipitó el ADN con acetato de sodio como se refiere anteriormente.

Las cuentas radioactivas presentes en la muestra de ADN se valoraron utilizando un contador manual de radioactividad BP 220 marca LEMAN, para determinar una pérdida posible de ADNc marcado radiactivamente durante la estrategia. Así mismo la cuantificación del ADN se realizó utilizando tiras reactivas Quik Strip con el mismo protocolo utilizado para ARN.

5.11.7 Ligadura del ADNc al vector Uni-ZAP™ XR

La ligadura del ADNc a los brazos del vector UNI-ZAP™ XR se realizó empleando 100 ng de ADNc, 1 µl del vector digerido con *EcoR* I-*Xho* I (tratado con CIAP), 0.5 µl de amortiguador de ligadura 10 x, 0.5 µl de ATP_r 10 mM (pH 7.5), agua estéril para un volumen de 4.5 µl y 0.5 µl de ligasa T4 de ADN (4 U/µl). La reacción de ligadura se incubó a 12°C durante toda la noche.

5.11.8 Empaquetado

Para el empaquetado del vector ligado al ADNc de *T. spiralis* se utilizó el kit ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning kit. Se utilizaron tubos de extracto de empaquetamiento almacenados a -80°C y se colocaron en hielo para una descongelación paulatina. Al descongelar los tubos se agregó inmediatamente la reacción de ligadura y se agitó suavemente. La mezcla se incubó a 22°C durante 2 hr y posteriormente se adicionaron 500 µl de amortiguador SM, 20 µl de cloroformo. Para terminar se centrifugó la muestra, se tomó el sobrenadante y se almacenó a 4°C antes de titular.

5.11.9 Titulación

Para la titulación y determinación de las unidades formadoras de placas (UFP) contenidas en el producto ligado al vector UNI-ZAP™ XR, se preparó previamente la bacteria *E. coli* RecA⁻ cepa XL1-Blue MRF' Δ (*mcrA*) 183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ Δ MI5 Tn 10* (Tet^r)]. La bacteria *E. coli* cepa XL1-Blue MRF' se sembró en medio LB con tetraciclina (12.5µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se seleccionó una colonia del cultivo y se agregó a 100 ml de caldo LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y maltosa al 0.2% (w/v). La bacteria se incubó en agitación a 100 x g 37°C durante ~6 hr hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1.0, se centrifugó a 700 x g para recuperar el paquete de bacterias y se resuspendió en MgSO₄ 10 mM para alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5.

Se prepararon por separado tres tubos con 200 µl de bacterias de la cepa XL1-Blue MRF' a una OD₆₀₀ de 0.5 y se mezclaron con 1 µl de la reacción de ligadura concentrada y 1 µl de las diluciones 1:10 y 1:100 de la misma reacción respectivamente. Para permitir la transformación de la bacteria, la mezcla se incubó por 15 min a 37°C en baño María y se añadió inmediatamente en 3 ml de top agar NZY a 48°C con 15 µl de IPTG 0.5 M (*Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranos*) y

50 μ l de X-gal (*5-Bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranososa*) [250 mg/ml en dimetil formamida (MERCK cat. 9684.1000)].

Después de la transformación las bacterias se plaquearon en cajas Petri de 150 mm preparadas con agar NZY, permitiendo una incorporación homogénea y dejando que la placa secase durante 10 min. Las cajas se incubaron en posición invertida durante toda la noche a 37°C y las colonias recombinantes positivas (blancas) se seleccionaron diferenciándolas del fondo (colonias negativas azules). Para determinar el título de UFP se realizó el conteo de las colonias positivas obtenidas tanto en la muestra concentrada como en las diluciones y se determinó el número de cuentas por 1 μ l de reacción.

5.11.10 Amplificación de bibliotecas de ADNc

Una vez determinado el número de UFP, la amplificación de las bibliotecas se inició combinando 20 alícuotas de la mezcla de empaquetamiento conteniendo $\sim 5 \times 10^4$ UFP de bacteriófago con 600 μ l de células XL1-Blue MRF' cada una en tubos Falcon 2059 de polipropileno. Los tubos conteniendo el fago y las células hospederas se incubaron a 37°C durante 15 min. A cada tubo se le agregaron 6.5 ml de top agar NZY precalentado a 48°C, e inmediatamente después de mezclar suavemente el contenido, este se vertió sobre cajas Petri de 150 mm con agar NZY, procurando que el medio se esparciera homogéneamente sobre el agar NZY. Posteriormente a la solidificación del agar sobre las cajas Petri, estas se incubaron a 37°C durante 6-8 hr procurando que el crecimiento de las placas no excediera de 2 mm.

Después del crecimiento de las placas del fago se agregaron ~ 8 -10 ml de amortiguador SM. Las cajas Petri se resguardaron a 4°C toda la noche en una agitación muy suave que permitiera el desprendimiento del fago y su agregación al amortiguador SM. Al día siguiente la suspensión del fago de cada caja se colectó cuidadosamente en un contenedor de polipropileno estéril y las cajas se lavaron utilizando 2 ml de amortiguador SM. A la suspensión se le agregó cloroformo a una concentración final de 5 % (v/v), la cual se homogenizó suavemente y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se removieron los detritus por medio de centrifugación durante 10 min a 500 x g. Después de recuperar el sobrenadante de la centrifugación en un contenedor estéril, se agregó cloroformo al 0.3 % (v/v) a la suspensión y se almacenó una porción a 4°C, a otra parte se le agregó dimetil-sulfóxido (DMSO) al 7 % (v/v) y se almacenó a -80°C.

Al término de la amplificación se determinó nuevamente el título de las bibliotecas para lo cual se realizaron las diluciones correspondientes y los resultados se expresaron en UFP/ml.

5.11.11 Principios para la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript del vector UNI-ZAP XR

Se eligió el vector UNI-ZAP XR porque su diseño permite la escisión *in vivo* y recircularización de cualquier inserto clonado contenido en el vector lambda y así forma un fagémido (pBluescript) que poseerá el inserto clonado. La escisión *in vivo* depende de una secuencia de ADN que se encuentra en el genoma del fago lambda y de la presencia de ciertas proteínas, incluyendo las proteínas derivadas del bacteriófago f1. Las proteínas del fago f1 reconocen la región del ADN que sirve como “origen de replicación” del fago f1 para la síntesis de la primera cadena de ADN. El origen de replicación de la primera cadena puede dividirse en dos partes: el sitio de iniciación y el sitio de terminación de la síntesis de ADN. Estas dos regiones del origen de replicación se subclonaron separadamente dentro del vector Uni-ZAP XR. El fago lambda, por el efecto de las proteínas derivadas de f1, se torna accesible para infectar una cepa de *E. coli* con el vector lambda y el bacteriófago f1.

Dentro de la bacteria *E. coli* las proteínas cooperadoras (helper) (del fago f1 o el fago M13), reconocen el ADN del sitio de iniciación de la primera cadena presente en el vector lambda. Una de estas proteínas corta una de las dos cadenas de ADN y en el sitio de corte inicia la síntesis de ADN nuevo, donde los duplicados de ADN se incorporan río abajo (3') en el sitio de corte del vector lambda. La síntesis de la nueva cadena sencilla de ADN continua a través del inserto clonado hasta encontrar la señal de término posicionada en la región 3' de la señal del iniciador y encontrada con la construcción del vector lambda. La molécula de ADN de cadena sencilla se circulariza por el gene II producto del fago f1, formando una molécula de ADN que contiene todo entre el iniciador y el terminador. En el caso del vector Uni-ZAP XR, este incluye todas las secuencias del fagémido pBluescript SK (-) y “nuestro inserto” deseado si es que está presente. Esta conversión es el paso de subclonación donde todas las secuencias asociadas con el vector lambda se posicionan fuera de las señales de iniciación y terminación y no se contienen dentro del ADN circularizado. En suma, la circularización del ADN automáticamente crea un origen f1 funcional que se encuentra en el bacteriófago o el fagémido.

5.11.12 Escisión *in vivo* con el fago cooperador ExAssist y la cepa bacteriana SOLR

Para separar y circularizar nuestro fagémido pBluescript del vector Uni-ZAP XP, el protocolo utiliza un fago cooperador ExAssist en combinación con la cepa bacteriana *E. coli* SOLR que a su vez impide la coinfección con fago cooperador. El fago ExAssist contiene una mutación que evita la replicación del genoma del fago en las células de la cepa *E. coli* SOLR. Esto permite que solo el fagémido separado se replique en la célula hospedera (SOLR) y que se elimine la posibilidad de que el fago cooperador Ex Assist produzca coinfección. Cabe mencionar que como el fago cooperador no puede replicar en la cepa SOLR, el rescate de la cadena sencilla de este mismo no se puede desarrollar en esta cepa.

5.11.13 Protocolo para la escisión *in vivo* del fagémido pBluescript del vector UNI-ZAP XR

De acuerdo a los principios anteriores se desarrolló la escisión *in vivo* del vector UNI-ZAP XR con el protocolo de escisión masiva de acuerdo con el proveedor. En primer lugar las cepas XL1-Blue-MRF' suplementadas con 0.2% de maltosa y 10 mM MgSO₄ y SOLR se crecieron en medio LB a 30°C. Los cultivos se centrifugaron a 1000 x g y se resuspendieron en una solución de MgSO₄ 10 mM a una DO₆₀₀ de 1.0 (8x10⁸ células/ml). En un tubo Falcon de 50 ml se colocaron, la cantidad en ml de cada biblioteca que se amplificó en el bacteriófago lambda (10 x el tamaño de la biblioteca que representa estadísticamente las clonas escindidas) y las células XL1-Blue MRF' a 10:1 células por el radio del fago lambda. A esta mezcla se le adicionó el fago cooperador ExAssist a una concentración 1:1 células por radio del fago. El tubo falcon se incubó a 37°C durante 15 min para permitir la absorción. Se adicionaron 20 ml de medio LB broth y el tubo se incubó por 2½-3 hr a 37° en agitación. Posteriormente el tubo se incubó nuevamente a 65-70°C por 20 min y para retirar los detritus y poder decantar el sobrenadante en un tubo nuevo, se centrifugó a 1000 x g durante 10 min. Este sobrenadante con el fagémido pBluescript empaquetado en partículas de fago filamentoso se almacenó a diferentes temperaturas para su utilización 4°C (duración 1-2 meses) y a -70°C en DMSO (duración años). Por otro lado para multiplicar el fagémido obtenido de la escisión se combinó 1 µl del producto de escisión en un tubo de 1.5 ml con 200 µl de bacterias SOLR frescas (DO₆₀₀=1.0). El tubo se incubó a 37°C durante 15 min y la solución se plaqueó en agar LB con ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas se seleccionaron posteriormente para diferentes análisis.

5.12 CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS SUSTRACTIVAS

Las bibliotecas de ADNc de la cepa china construidas en λ ZAPII se eligieron para desarrollar las bibliotecas sustractivas debido a que las unidades formadoras de placa (UFP) fueron mayores que las obtenidas en la cepa francesa antes y después de ser amplificadas.

5.12.1 Principios para la sustracción de genes estadio-específicos

La construcción de bibliotecas sustractivas de ADNc estadio específicas se basa en la comparación de dos poblaciones de ARNm, en las que se obtienen clonas de genes que son expresados en una población pero no en la otra (Figura 3).

Para iniciar la sustracción de genes, las poblaciones de ARNm a comparar se transforman en ADNc. El ADNc de interés, el cual posee los transcritos específicos para expresarse diferencialmente se denomina “tester” ó ADNc de prueba y el ADNc con el que se compara la muestra se denomina “driver” ó ADNc de referencia.

Los ADNc “tester” y “driver” se digieren previamente por separado con la enzima *Rsa* I, la cual corta a cuatro bases y produce terminaciones romas.

El ADNc “tester” se divide en dos porciones y cada porción se liga a un adaptador de ADNc diferente (1 y 2R). Las terminaciones de los adaptadores carecen de un grupo fosfato de tal manera que solo una cadena ataca a la porción 5' del ADNc, y por otra parte poseen tramos de secuencias idénticas que le permiten alinearse a oligonucleótidos específicos diseñados para dos amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Durante la primera hibridación, se mezcla un exceso de la muestra “driver” a las muestras “tester” ligadas a los adaptadores. Las mezclas se desnaturalizan y posteriormente se permite su alineación.

De acuerdo a la teoría de la cinética de hibridación de segundo orden, “la concentración de secuencias de abundancia baja y alta se iguala debido a que la realineación es más rápida para las moléculas más abundantes”.

En la segunda hibridación las muestras “tester” con los dos tipos de adaptadores se mezclan y sin desnaturalizar se adicionan al ADNc “driver” fresco y desnaturalizado. En este sentido, solo el remanente igualado y los ADNc de cadena sencilla se pueden reasociar y formar nuevos tipos de

híbridos. Estos nuevos híbridos son moléculas “tester” de doble cadena con diferentes terminaciones, las cuales corresponden a las secuencias de los adaptadores 1 y 2R.

La polimerasa de ADN completa las secuencias “tester” que tienen diferentes sitios de alineación para los oligonucleótidos elegidos sobre las terminaciones 5' y 3'. De tal modo que sólo las moléculas que poseen los dos tipos de adaptadores (1 y 2R) se amplifican exponencialmente durante los ciclos de PCR.

5.12.2 Metodología para la construcción de las bibliotecas sustractivas

De acuerdo a los principios anteriores se construyeron cuatro bibliotecas sustractivas de ADNc utilizando el kit ADNc PCR-Select™ (CLONTECH, cat. K1804-1). En la preparación de cada biblioteca se emplearon 2 µg de ARNm poly (A)⁺. El ARNm utilizado se preparó como se describió anteriormente utilizando la técnica modificada de Chomezynski y Sacchi en 1987 o bien se empleó ARNm elaborado por transcripción *in vitro* (T3) a partir de las bibliotecas de ADNc del adulto+LRN (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de ARNm poli A⁽⁺⁾ para el desarrollo de bibliotecas sustractivas

Bibliotecas	Estadio	ARNm poli A ⁽⁺⁾ (2µg)
1	Adulto	fresco
2	LM	fresco
3	LRN+Ad	transcripción T3
4	LRN+Ad	transcripción T3

5.12.3 Síntesis de la primera cadena de ADNc

En la estrategia para la síntesis de la primera cadena de ADNc se agregó para cada muestra tester, driver y el control de ARN Poly A (de músculo esquelético humano) suplementado por el proveedor, de 2-4 µl (2 µg) de ARN Poly A⁺ a los cuales se les adicionó 1 µl de oligonucleótidos de síntesis de ADNc. La muestra se completó a un volumen final de 5 µl con agua estéril y se centrifugó a 10,000 x g durante 3 seg. Posteriormente se realizó una incubación a 70°C durante 2 min en el termociclador Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480 y los tubos con la muestra se enfriaron en hielo por 2 min. Después de este periodo la muestra se centrifugó nuevamente por 3

seg y se completó con 2 μl de amortiguador de primera cadena 5x, 1 μl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 1 μl de agua estéril y 1 μl de transcriptasa reversa (20 U/ μl). Después de agitar la muestra, se centrifugó y se incubó a 42°C 1.5 hr. en atmósfera de CO₂ y los tubos se colocaron en hielo hasta el siguiente paso.

5.12.4 Síntesis de la segunda cadena de ADNc

La síntesis de la segunda cadena para las muestras tester, driver y el control se inició al agregar a cada muestra 4 μl de agua estéril, 16 μl de amortiguador de segunda cadena 5x, 1.6 μl de mezcla de dNTP (10 mM) y 4 μl de un coctel de enzimas de segunda cadena. Los componentes se mezclaron y centrifugaron durante 3 seg antes de incubarlos a 16°C durante 2 hr y se adicionaron 2 μl (6 U) de polimerasa de DNA T4. La reacción se detuvo al completar con 4 μl de una mezcla de EDTA/glicógeno 20X a cada muestra.

Al final de la síntesis de la segunda cadena se adicionaron 100 μl de fenol-cloroformo-IAA (25:24:1), se agitó la muestra y se centrifugó a 1000 x g 10 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se removió la fase acuosa y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml, al que se le agregaron 100 μl de cloroformo-IAA (24:1), para volver a centrifugar durante 10 min, retirar nuevamente la fase acuosa y colocarla en un tubo de 0.5 ml. A cada tubo se agregaron 40 μl de NH₄OAc 4 M y 300 μl de etanol, se agitaron suavemente, se centrifugaron a 10,000 x g durante 20 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se retiró suavemente. A cada pastilla se le agregaron 500 μl de etanol al 80 %, se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 minutos y se removió el sobrenadante. Para retirar el exceso de alcohol cada pastilla se ADN se secó en una bomba de vacío y se disolvió en 50 μl de agua.

5.12.5 Digestión del ADNc con la enzima *Rsa* I

La digestión con *Rsa* I se realizó para generar fragmentos cortos de ADNc de doble cadena con terminaciones romas, los cuales son óptimos en la sustracción y necesarios para la ligadura con los adaptadores.

Durante este protocolo se utilizaron 44 μl de ADNc de doble cadena preparados anteriormente, a cada uno de los cuales se le agregó 5 μl de Amortiguador de restricción 10x para la enzima *Rsa* I y 1.5 μl (10 U/ μl) de la enzima *Rsa* I. La mezcla se agitó suavemente y se incubó a 37°C durante 1.5 hr. Para realizar un análisis de restricción en geles de agarosa se utilizaron 5 μl de cada muestra y a la solución restante se le agregaron 2.5 μl de una mezcla de EDTA/glicógeno

20 X para terminar la reacción. Para la extracción del ADN se agregaron 50 µl de fenol-cloroformo-IAA (25:24:1), se agitó suavemente y se centrifugaron las muestras a 10,000 x g 10 min para separar las fases. Después de remover la fase acuosa de la muestra y colocarla en un tubo nuevo estéril de 0.5 ml, se adicionaron 25 µl de NH₄OAc 4 M y 187.5 µl de etanol al 95 %, se agitó suavemente y se centrifugó por 20 min a 10,000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se removió del paquete y este se lavó con 200 µl de etanol al 80 %. Las muestras se centrifugaron a 10,000 x g durante 5 min, el sobrenadante se removió cuidadosamente y el paquete se secó en bomba de vacío durante 10 min, posteriormente se disolvió en 5.5 µl de agua estéril y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

5.12.6 Ligadura de adaptadores

Como una estrategia sugerida en el kit “PCR-Select differential screening” con el objeto de confirmar que las clonas obtenidas del tamizaje de una biblioteca substractiva representarían genes expresados diferencialmente, fue necesario desarrollar la sustracción en ambas direcciones. En este sentido se planteó la preparación de dos bibliotecas sustractivas directas denominadas “forward” y dos bibliotecas reversas denominadas “reverse” donde el “tester” se utiliza como “driver” y el “driver” como “tester”. La finalidad de esto fue utilizar el material sustraído de las bibliotecas “reverse” como sonda para hacer el tamizaje de las bibliotecas sustractivas de interés denominadas “forward”. De esta manera se diseñaron las bibliotecas sustractivas como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Bibliotecas sustractivas de ADNc de *T. spiralis* cepa N2/HN (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit)

(tester/driver)	(tester/driver)
1) Adulto/LM	2) LM/Adulto
3) Adulto+LRN/Adulto+LM	4) Adulto+LRN/LM

Para desarrollar la sustracción en ambas direcciones se preparó ADNc tester de cada muestra de ARN Poly A⁺ como se menciona anteriormente, así mismo se utilizó un control positivo de la sustracción en el que se empleó ADNc de músculo esquelético con ϕ X174/*Hae* III ADN y para cada reacción se desarrolló un control negativo de ADNc tester no sustraído.

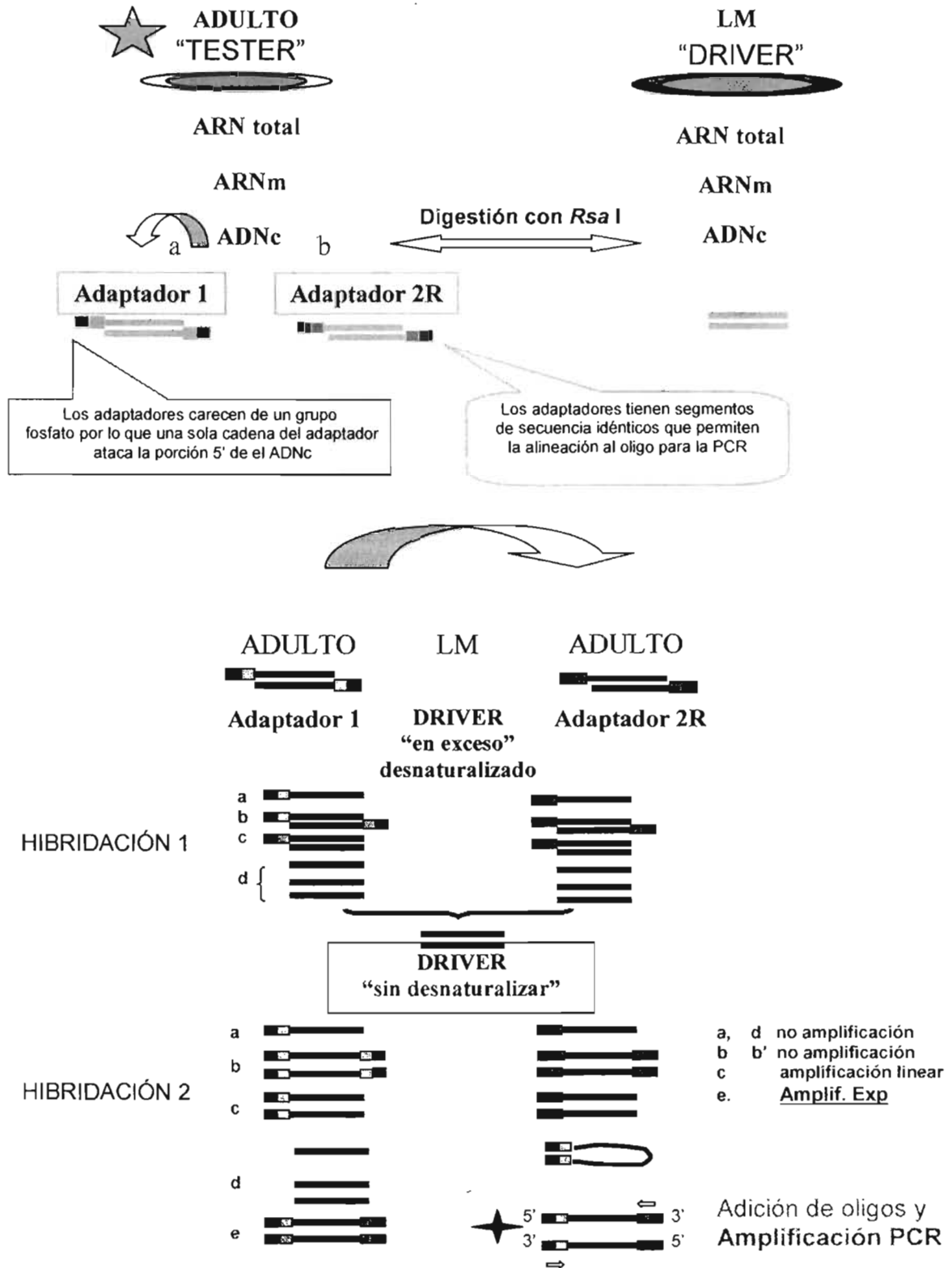


Figura 3. Esquema del procedimiento para la obtención de genes estadio específicos mediante la estrategia de hibridación sustractiva

En el proceso de ligadura de adaptadores, cada muestra de ADNc tester se alicuotó en dos tubos separados. La primera de las alícuotas de cada muestra de ADNc tester se ligó al adaptador 1 y la segunda alícuota se ligó al adaptador 2R (Fig. 3). Después de concluir la reacción de ligadura a los diferentes adaptadores, ambas alícuotas de las muestras de ADNc tester se mezclaron nuevamente. Cabe señalar que en este procedimiento los adaptadores no se ligaron al ADNc driver, ya que para hacer la sustracción se requería el reconocimiento de los adaptadores únicamente de las muestras tester para desarrollar una amplificación dirigida.

La ligadura se inició añadiendo 1 μ l de cada ADNc digerido con Rsa I con 5 μ l de agua estéril. Por otra parte en la preparación del control de ADNc de músculo esquelético se diluyeron 2 μ l de ADNc con 38 μ l de agua estéril (150 ng/ml).

Se preparó una mezcla de ligadura* agregando 3 μ l de agua estéril, 2 μ l de amortiguador de ligadura 5X y 1 μ l de Ligasa T4 de DNA (400 U/ μ l), la cual se utilizó en cada reacción de ligadura y que se preparó con componentes que se muestran en la tabla 4.

La ligadura se inició añadiendo 1 μ l de cada ADNc digerido con Rsa I con 5 μ l de agua estéril. Por otra parte en la preparación del control de ADNc de músculo esquelético se diluyeron 2 μ l de ADNc con 38 μ l de agua estéril (150 ng/ml).

Tabla 4. Reacción de ligadura

COMPONENTES	Tester 1-1 (μl)	Tester 2 (μl)
ADNc tester diluído	2 μ l	2 μ l
Adaptador 1 (10 μ M)	2 μ l	--
Adaptador 2R (10 μ M)	--	2 μ l
*Mezcla de ligadura	6 μ l	6 μ l
Volumen final	10 μ l	10 μ l

Se preparó una mezcla de ligadura* agregando 3 μ l de agua estéril, 2 μ l de amortiguador de ligadura 5X y 1 μ l de Ligasa T4 de DNA (400 U/ μ l), la cual se utilizó en cada reacción de ligadura y que se preparó con los componentes según se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Reacción de ligadura

COMPONENTES	Tester 1 (µl)	Tester 2 (µl)
ADNc tester diluído	2 µl	2 µl
Adaptador 1 (10 µM)	2 µl	--
Adaptador 2R (10 µM)	--	2 µl
*Mezcla de ligadura	6 µl	6 µl
Volumen final	10 µl	10 µl

Una vez adicionados los componentes de las reacciones de ligadura, se mezclaron suavemente. A su vez para comparar con controles sin sustracción, en tubos de micro centrifuga distintos se mezclaron 2 µl de las muestras tester y se procedió de manera igual que para el ADNc control de músculo esquelético.

Después de la ligadura aproximadamente 1/3 de las moléculas de ADNc de cada muestra control tester no sustractiva presentó los dos diferentes adaptadores.

Las reacciones de ligadura se centrifugaron suavemente y se incubaron a 16°C durante toda la noche. Para detener la ligadura se adicionó 1 µl de mezcla de EDTA/glicógeno, las muestras se incubaron por 5 min a 72°C para inactivar la ligasa y se centrifugaron los tubos ligeramente.

De cada muestra control tester no sustractiva se tomó 1 µl el cual se diluyó en 1 ml de agua, las cuales se almacenaron a -20°C para utilizarse posteriormente en la reacción de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5.12.7 Primera hibridación

Como se mencionó anteriormente en la primera hibridación se agregó a la reacción un exceso de ADNc driver a cada muestra de ADNc tester y posteriormente las muestras se desnaturalizaron previamente para permitir su posterior alineación. El procedimiento se realizó como sigue:

Antes de preparar las muestras, el amortiguador de hibridación 4x se descongeló a temperatura ambiente y se estabilizó durante 20 min. Posteriormente para las cuatro bibliotecas propuestas (reacciones “forward”) y sus respectivas reacciones reversas se prepararon 8 muestras tester con el adaptador 1 y 8 muestras tester con el adaptador 2R con los controles respectivos para cada

biblioteca. A estas muestras tester 1 y 2 se agregaron los componentes necesarios para la primera hibridación la cual se realizó en tubos de micro centrífuga de 0.5 ml como se indica en la Tabla 6.

COMPONENTES	Hibridación 1 (μ l)	Hibridación 2 (μ l)
ADNc driver digerido con <i>Rsa</i> I	1.5 μ l	1.5 μ l
Tester 1 con Adaptadores	1.5 μ l	--
Tester 2 con Adaptadores	--	1.5 μ l
Amortiguador de hibridación 4 X	1 μ l	1 μ l
Volumen final	4 μ l	4 μ l

Los tubos se recubrieron con una gota de aceite mineral, se centrifugaron a 700 x g durante 3 seg, se incubaron para desnaturalizar en un termociclador a 98°C durante 1.5 min y posteriormente se alinearon a 68°C durante 8 hr.

5.12.8 Segunda hibridación

En la segunda hibridación se preparó ADNc driver desnaturalizado añadiendo en un tubo de 0.5 ml 1 μ l de ADNc driver digerido previamente con *Rsa* I, 1 μ l de amortiguador de hibridación 4x, previamente estabilizado a temperatura ambiente, y 2 μ l de agua estéril. A cada tubo se le adicionó una gota de aceite mineral y se incubaron a 98°C durante 1.5 min. Las muestras de la primera hibridación sin desnaturalizar se mezclaron por separado, se les agregó rápidamente el ADNc driver desnaturalizado, se incubaron a 68°C durante toda la noche, se añadieron 200 μ l de amortiguador de dilución y se incubaron nuevamente a 68°C durante 7 min para posteriormente almacenar a -20°C hasta el paso siguiente.

5.12.9 Amplificación por PCR

Durante este procedimiento los ADNc que se expresan diferencialmente se amplifican por PCR. En la primera amplificación, únicamente los ADNc de doble cadena (dc) con las secuencias de adaptadores 1 y 2R ubicadas en las terminaciones, se amplifican exponencialmente y en la segunda amplificación se utiliza un PCR anidado para reducir el fondo lo mas posible y enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente.

Para cada biblioteca se desarrollaron siete reacciones, el ADNc tester sustraído “reacción forward” (1), el ADNc tester control no sustraído “reacción forward” (2), el ADNc tester sustraído “reacción reverse” (3), el ADNc tester control no sustraído “reacción reverse” (4), el ADNc control sustraído de músculo esquelético (5), el ADNc control no sustraído de músculo esquelético (6) y el ADNc control positivo de PCR provisto por el kit (ADN ØX174 digerido con *Hae* III) (7).

En la preparación de cada templado para PCR se alicuotó 1 µl de ADNc y se le adicionaron 24 µl de una mezcla madre que se preparó como se indica en la tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la mezcla madre 1 para PCR

Reactivos	Cantidad/reacción	Cantidad/7 reacciones
	(µl)	(µl)
Agua estéril	19.5 µl	156 µl
Amortiguador 10 x de reacción de PCR	2.5 µl	20 µl
Mezcla de dNTP's (10 mM)	0.5 µl	4 µl
Oligonucleótido 1 de PCR (10 µM)	1.0 µl	8 µl
Adventage ADNc Polimerasa Mix 50 x	0.5 µl	4 µl
Volumen total	24.0 µl	192 µl

Después de adicionar la mezcla a cada tubo, se agregaron 50 µl de aceite mineral y las reacciones se incubaron a 75°C 5 min para extender los adaptadores en un termociclador Perkin-Elmer (DNA Thermal Cycler 480). Sin retirar los tubos del termociclador la amplificación se llevó a cabo durante 27 ciclos (94 °C 30 seg, 66°C 30 seg y 72°C 1.5 min).

Para realizar el análisis de la reacción de cada tubo se alicuotaron 8 µl de cada muestra y se analizaron posteriormente en geles de agarosa al 2 %.

En el desarrollo de la segunda amplificación se utilizó el kit recomendado por CLONTECH, Adventage® cDNA Polymerase Mix. En este paso se diluyeron 3 µl de cada tubo de PCR de la primera amplificación, en 27 µl de agua estéril y 1 µl de cada dilución se adicionó a 24 µl de la mezcla madre de la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes de la mezcla madre 2 para PCR

Reactivos	Cantidad/ reacción (μ l)	Cantidad/ 7 reacciones (μ l)
Agua estéril	18.5 μ l	148 μ l
Amortiguador 10 x de reacción de PCR	2.5 μ l	20 μ l
Oligo 1 anidado para PCR (10 μ M)	1 μ l	8 μ l
Oligo 2R anidado para PCR (10 μ M)	1 μ l	8 μ l
dNTP Mix (10 mM)	0.5 μ l	4 μ l
50 x ADNc Polimerasa advantage Mix	0.5 μ l	4 μ l
Volumen total	24.0	192 μ l

Después de agregar los componentes se adicionó una gota de aceite mineral y se realizó entonces la amplificación con 12 ciclos (94°C 30 seg, 68°C 30 seg y 72°C 1.5 min). Al término de la amplificación se alicuotaron 8 μ l de cada reacción los cuales se evaluaron en geles de agarosa al 2 %. Por otro lado el restante se purificó de acuerdo al protocolo GENECLON III de Bio 101, Inc y las reacciones se almacenaron a - 20°C.

5.12.10 Clonación al vector pT-Adv

A partir de los productos del PCR purificados de las bibliotecas (1, 2, 3 ,4) se clonaron únicamente los correspondientes a las bibliotecas 1, 3 y 4, los cuales se emplearon posteriormente para la selección de genes del estadio adulto y de LRN.

En la clonación se utilizó el kit AdventAge™ PCR Cloning (CLONTECH, cat. K1901-1) en donde los productos amplificados por PCR se ligaron al vector pT-Adv y posteriormente se transformaron en células competentes (*E. coli* TOP10F²) con los insertos unidos al vector.

La clonación inició al retirar el vector pT-Adv del congelador y centrifugarlo suavemente (3 seg 700 x g). Para calcular la cantidad requerida producto de PCR para ligar a 50 ng (20 fmol) de vector pT-Adv se utilizó la fórmula siguiente:

$$\frac{x \text{ ng de producto de PCR}}{(\text{tamaño del pTAdv: } \sim 3,900 \text{ pb})} = \frac{(\text{pb de producto de PCR}) (50 \text{ ng pT-Adv})}{(\text{tamaño del pTAdv: } \sim 3,900 \text{ pb})}$$

Después de calcular el volumen de producto de PCR se diluyó este en agua estéril y se adicionaron los siguientes componentes: 1 μ l de amortiguador de ligadura 10 x, 2 μ l del vector pT-Adv (25 ng/ μ l) y 1 μ l de ligasa T4 de DNA (4U), para ajustar a un volumen final de 10 μ l. La reacción de ligadura se incubó a 14°C durante toda la noche, se centrifugó suavemente y se colocó en hielo. Mientras tanto los tubos conteniendo 50 μ l de células competentes (*E. coli* TOP10F') se descongelaron en hielo e inmediatamente después de descongelarse se agregaron 2 μ l de cada reacción de ligadura directamente al tubo de las competentes y se agitó suavemente. Los tubos se incubaron en hielo por 30 min y los remanentes de ligadura se guardaron a -20°C. Posteriormente a la incubación en hielo se dio el choque térmico durante 30 seg a 42°C en un baño María, pasado este tiempo se colocaron inmediatamente en hielo en donde permanecieron 2 min y se agregaron 250 μ l de medio SOC a temperatura ambiente. Los productos transformados se incubaron a 37°C 1 hr a 225 rpm en una incubadora rotatoria, se colocaron en hielo y se plaquearon en cantidades de 50 y 200 μ l en cajas Petri de 150 mm con medio LB/X-Gal/IPTG complementadas con 50 μ g/ml de kanamicina. Las cajas se incubaron a 37°C durante 18 hr e inmediatamente se almacenaron en el refrigerador (4°C) para permitir el desarrollo de color en las colonias.

5.12.11 Selección de clonas positivas

Para la selección de clonas positivas de los productos de transformación de cada biblioteca, se efectuaron diluciones 1:50 y 1:200 de cada muestra y se plaquearon en cajas Petri de 150 mm con agar LB+ ampicilina y adicionadas con X-gal/IPTG. Las cajas Petri se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Las colonias blancas (positivas) que resultaron de la incubación se seleccionaron al azar y se incubaron separadamente a 37°C durante toda la noche en agitación dentro de tubos para centrifuga de 15 ml a los cuales se les agregó 5 ml de medio Terrific Broth (TB) (SIGMA cat. T-0918).

Después de la incubación mediante la técnica Slot blot, se tomaron 2 μ l del cultivo y se colocaron para su adsorción sobre membranas nylon (NYTRAN® 0.45 SOSTuck, DASSEL, Germany cat. D-37582) adheridas en agar LB (LB SIGMA cat. L-2897) preparado en cajas Petri de 75 mm dispuestas por triplicado las que se dividieron en 50 cuadrantes con numeración progresiva.

Otro método utilizado en la separación de colonias positivas se basó en el cultivo de éstas sobre microplacas de 96 pozos a las que se les agregaron 100 μ l de medio TB. Las colonias se incubaron a 37°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente de cada pozo se tomaron 20 μ l del cultivo y se colocaron en un aparato mini folder según la técnica de Dot blot utilizando membranas de nitrocelulosa, las cuales se prepararon por triplicado.

Con el propósito de exponer el DNA de cada colonia seleccionada en las membranas preparadas por Slot y Dot Blot, éstas se dejaron secar y se desnaturalizaron sumergiéndolas en una solución de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M durante 4 min, posteriormente la reacción se neutralizó al agregar las membranas en una solución de NaCl 1.5 M y Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 durante 4 min y después se lavaron en una solución de Tris-HCl 0.2 M pH 7.5 y SSC 2 x durante 30 seg. Las membranas secas se fijaron mediante la exposición a rayos ultravioleta (UV) durante 30 seg en un UV- radiator (APPLIGENE) y se resguardaron hasta su evaluación por autoradiografía.

5.12.12 Preparación de sondas de ADNc a partir de bibliotecas sustractivas

El ADNc sustraído de las reacciones “forward” y “reverse” o bien las clonas estadio específicas utilizadas como sondas se prepararon, retirando previamente los adaptadores para evitar el fondo en la hibridación con los mismos. Así, se utilizaron ~ 40 μ l de cada producto de PCR forward y reverse ó 2 μ g de ADN de plásmido de cada clona estadio específica previamente purificados con el Advantage PCR-Pure Kit (QIAGEN cat. K1111-1, -2). En la purificación se utilizaron 6 μ l de suspensión de perlas de vidrio para el acoplamiento del ADN y las muestras se eluyeron en 15 μ l de agua estéril. El volumen de la muestra se ajustó a 28 μ l con agua estéril y se tomaron 3 μ l para análisis del producto.

Para remover los adaptadores de las terminaciones de las moléculas de ADN se digirieron las muestras con las enzimas de restricción *Rsa* I, *Eag* I, y *Sma* I, para lo cual a cada tubo se agregaron 3 μ l de amortiguador de restricción y 1.5 μ l de *Rsa* I y se incubaron a 37°C por 1 hr. Sin detener la reacción se analizaron por electroforesis 3 μ l de las muestras digeridas, así mismo a los tubos se agregó 1 μ l de enzima *Sma* I y se incubó a temperatura ambiente por 1 hr. Posteriormente se agregaron 61 μ l de agua estéril, 10 μ l de amortiguador de restricción para *Ega* I, 1 μ l de la enzima *Eag* I y se incubó a 37°C por 1 hr. Para separar los adaptadores digeridos se utilizó el Advantage PCR-Pure Kit.

En el marcaje de las sondas con [α -³²P] dCTP se mezclaron 3 μ l del ADN para sonda con 6 μ l de agua estéril. La mezcla se desnaturalizó a 95°C 8 min, se colocó en hielo y se agregaron 3 μ l

de amortiguador de reacción (-dCTP), 2 μ l de una mezcla de oligonucleótidos, 5 μ l de [α - 32 P] dCTP (50 μ Ci, 3000Ci/mmol, en solución acuosa) y 1 μ l de enzima Klenow. Los tubos se incubaron a 37°C por 30 min, la reacción se detuvo con la adición de 5 μ l de solución stop, las sondas se purificaron de los dNTPs no incorporados utilizando columnas CHROMA SPIN-100 (cat. K1302-1, -2) y se evaluó la actividad específica de cada sonda utilizando un contador radioactivo manual.

5.12.13 Hibridación, autoradiografía y análisis de transformación

Las membranas preparadas para hibridación con las técnicas de Slot blot, Dot blot, Southern blot ó Northern blot se desnaturalizaron previamente en una solución 1.5 M de NaCl más 0.5 M de NaOH, se neutralizaron en una solución 1.5 M de NaCl y 0.5 M de Tris-HCl (pH 8.0) y se lavaron en una solución 0.2 M de Tris-HCl (pH 7.5) más SSC 2 x. Una vez secas las membranas el ADN se fijó durante 30 seg en un aparato de rayos UV 120,000 μ J, posteriormente las membranas se hirvieron en SDS al 0.5% por 5 min y se prehibridaron a 42°C durante 1 hr en una 5 ml de solución de prehibridación, la cual se retiró al término de la incubación y se agregaron 5 ml de solución de hibridación. Por otro lado, antes de agregar la sonda a la solución de hibridación, se desnaturalizó previamente a 95°C durante 5 min y se mantuvo en hielo. La hibridación se realizó a 68°C durante toda la noche y posteriormente las membranas se lavaron 4 veces durante 20 min c/lavado, en una solución de baja astringencia. Posteriormente se lavó en una solución de alta astringencia por 2 veces 20 min c/lavado. Las membranas se secaron y se evaluó la reactividad de las mismas a la radiación en un contador manual de radioactividad. Las membranas se acomodaron en cajas para radiografía junto a película Kodak BIOMAXtm MR film (Kodak Scientific Imaging Film cat. 8756447), se dejaron durante toda la noche a -70°C y posteriormente se revelaron.

5.12.14 Criterios para la selección de clonas positivas

Las membranas con las clonas provenientes de las bibliotecas 1, 3 y 4 se hibridaron al material obtenido por sustracción de las bibliotecas 1, 2 y 3 el cual se utilizó como sonda radiomarcada con [α - 32 P] dCTP. Las clonas positivas en la autoradiografía se seleccionaron mediante los criterios que se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Criterios para la selección de clonas positivas estadio específicas

Sondas	Bibliotecas sustractivas		
	1 Adulto/LM	3 LRN+Ad/Ad+LM	4 LRN+Ad/LM
1. Adulto	+	-/+	-/+
2. LM	-	-	-
3. LRN	-	+	+

Las clonas positivas resultantes se crecieron por separado y se realizó la separación del plásmido de las bacterias utilizando el QIAprep 8 Plasmid Kit de QIAGEN Inc. USA. Los plásmidos obtenidos se analizaron para identificar si contenían insertos, para lo cual se utilizó aproximadamente 2µg de ADN plasmídico el cual se digirió con la enzima *Eco* RI. Los productos de la digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % con Bromuro de Etidio. Posteriormente las clonas identificadas como positivas a la presencia de insertos se almacenaron por duplicado en glicerol al 50% ó DMSO a -70°C.

Por otro lado las clonas seleccionadas con insertos de más de 400 pares de bases, se evaluaron separadamente por hibridación utilizando la técnica de Dot blot.

La secuenciación de las clonas analizadas por Dot Blot se realizó en el laboratorio CNEVA-Ploufragan (Francia) y en el Área de síntesis de nucleótidos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, utilizando los oligonucleótidos M13 y M13 reversa. Posteriormente el análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa PC Gene.

5.13 ANÁLISIS DE CLONAS SUSTRATIVAS

5.13.1 Southern y Northern Blot

Después de la secuenciación de las clonas con sus respectivos insertos y posteriormente a el análisis de las mismas con el programa PC gene, se seleccionaron algunas clonas con el marco de lectura abierto (ORF), ligadas de origen a los adaptadores 1 ó 2R y con posibles características antigénicas.

Para determinar la estadio especificidad de las clonas se utilizó la técnica de Southern blot en la que se prepararon geles de agarosa al 1.5 % y se corrieron con plásmido del adulto, la LM, el adulto+LRN y un plásmido control (pBS-33). La transferencia del ADN se realizó a membranas de nylon (NYTRAN® 0.45 SOSTuck, DASSEL, Germany cat. D-37582) y se fijaron con luz UV durante 30 seg como se describe anteriormente. Las membranas se desnaturalizaron, neutralizaron y lavaron según el protocolo de Sambrook y cols. (2001). Después de secar las membranas se hibridaron a las sondas correspondientes a los insertos seleccionados como se describe previamente.

Para cada una de las clonas seleccionadas se realizó un análisis por Northern blot en el cual se prepararon por electroforesis 40 µg de ARN total del adulto+LRN, ARN total de la LM y ARN total de células de eucariontes M13 en un gel con formaldehído. Después de realizar el corrimiento electroforético se realizó la transferencia a membranas Hybond™-NX (Amersham Life Science cat. RPK5026) las cuales se hibridaron a la sonda correspondiente y se realizó la autoradiografía como se describe anteriormente.

5.13.2 Tamizaje de las bibliotecas de ADNc de la fase de adulto

A partir de las clonas evaluadas por Southern y/o Northern Blot, se prepararon las sondas correspondientes de las mismas según el protocolo descrito previamente. Las sondas de las clonas se utilizaron para el tamizaje de la biblioteca de ADNc de la fase de adulto de *T. spiralis*. Durante este proceso se realizó la amplificación de la biblioteca del adulto con el número de placas necesarias para cada sonda y se realizó la hibridación correspondiente. Del tamizaje se recuperaron al azar nuevas clonas de cada sonda utilizada y se resguardaron en amortiguador MgSO₄ con 10 µl de cloroformo a 4°C hasta su utilización. Posteriormente para la purificación de las mismas clonas almacenadas, se amplificaron nuevamente y se hibridaron con las sondas respectivas. Las clonas purificadas se resguardaron en MgSO₄ para su posterior escisión *in vivo* según el protocolo antes mencionado.

5.13.3 Determinación del porcentaje de genes estadio específicos

Con el objeto de determinar el porcentaje de genes estadio específicos presentes en las bibliotecas de ADNc en λ ZAPII del adulto y de adulto+LRN de la cepa N2/HN, se prepararon

membranas de nylon con una dilución de las bibliotecas y las membranas se hibridaron a las sondas radiomarcadas con [α - 32 P] dCTP preparadas de las bibliotecas sustractivas del adulto y la LM obtenidas después del segundo PCR.

5.13.4 Selección de clonas para expresión de proteínas

Después del análisis de secuencias realizado con el programa PC Gene, se seleccionaron cuatro clonas del estadio adulto en base a los criterios como el marco de lectura abierto, la existencia de un motivo dentro del marco de lectura abierta y el porcentaje de identidad de su secuencia con otras proteínas reportadas en el banco de genes.

A partir de las cuatro secuencias seleccionadas se realizó un tamizaje sobre la biblioteca de ADNc en λ ZAPII del adulto con la intención de recuperar clonas con secuencias de mayor tamaño que completaran los genes correspondientes y de este tamizaje se siguieron las de mayor tamaño para análisis más profundos.

Las clonas seleccionadas por tamizaje se evaluaron mediante PCR para determinar los tamaños de los insertos contenidos en ellas, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos 21M13 y M13 reverso (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones para la amplificación por PCR

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Predesnaturalización	94°C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	1 min	35 ciclos
Alineamiento	55°C	1 min	35 ciclos
Extensión	72°C	2 min	35 ciclos
Extensión final	72°C	15 min	1 ciclo

Por otra parte después de la escisión *in vivo* de las clonas de interés, los productos de escisión se transformaron en células SOLR, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. De cada caja petri con las clonas puras correspondientes se tomó una clona para separar el plásmido utilizando el kit EndoFree™ Plasmid Maxi, Mega (QIAGEN).

5.14 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

A partir del tamizaje de la biblioteca de ADNc en λ ZAPII del adulto se eligió una clona para su expresión y evaluación. El inserto denominado T1T2- 52 se utilizó como sonda la cual se preparó para el tamizaje de la biblioteca de ADNc en el vector λ ZAPII del adulto. Durante este tamizaje se obtuvieron nuevas clonas con insertos de diferentes tamaños y se seleccionó el más grande denominado T1T2-52-4 para su expresión en los plásmido pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP)₄ (Figura 4 y 5).

5.14.1 Características de los plásmidos de expresión pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP)₄.

Los plásmidos pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP)₄ contienen el origen de replicación ColE1, un gene de resistencia a la ampicilina, un promotor de la nitrato reductasa (*pnirB*) inducible *in vivo* en condiciones anaeróbicas y río abajo de este, se encuentra clonada la secuencia señal de la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* enterotoxigénica (LTB) que facilita la secreción al periplasma. En el caso de pFRAS la secuencia LTB se encuentra fusionada en marco de lectura con una secuencia que codifica para 6 histidinas y el sitio de corte de la enteroquinasa. El pnir-LTBsp contiene río abajo de la secuencia LTB al epitopo inmunodominante de *Plasmodium falciparum* Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina (NANP)₄. El propósito de clonar T1T2-52 de *Trichinella spiralis* (T1T2-52 Tsp) en plásmidos con estructura semejante radica en que las secuencias de histidinas, así como de NANP, pueden ser reconocidas después de su expresión con diferentes tipos de anticuerpos. En los insertos clonados en pFRAS se requiere para su detección anticuerpos antihistidinas como por ejemplo el anticuerpo monoclonal Penta-His que reconoce proteínas unidas a histidinas, ya sea en el interior de su secuencia, o bien, clonadas en los extremos C-terminal ó N-terminal. La expresión de proteínas en el vector pnir-LTBsp (NANP)₄ permite reconocerlas por el anticuerpo monoclonal anti-NANP 2A10 que tiene una alta afinidad también en cualquiera de las porciones en donde se encuentre anclado el péptido a la proteína expresada.

5.14.2 Diseño de Iniciadores para la clonación en pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP)₄

Se utilizaron los mismos iniciadores para la clonación en los plásmidos de expresión pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP)₄, con una secuencia como sigue:

1) Secuencia sentido (M263):

Xba/Nhe I Secuencia T1T2-52-4 *T. spiralis*

5'- ATT TTA CAT TCT AGA GAA AAC GTG GAA ATA GCA GCA TTG-3'

2) Secuencia antisentido (T1T2-52-4):

Bam HI Secuencia T1T2-52-4 *T. spiralis*

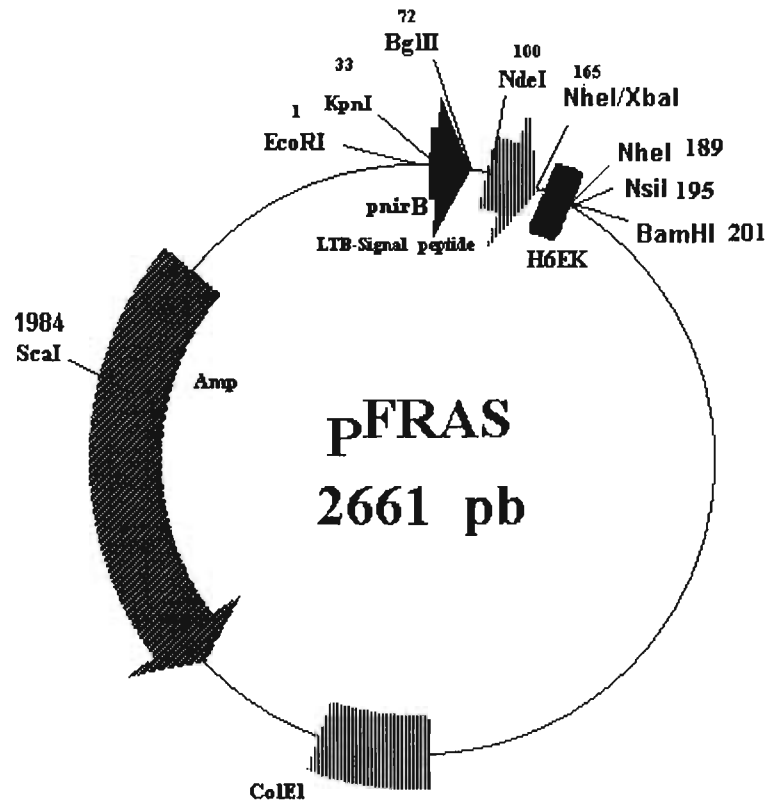
5'- ATT TTA CAT GGA TCC TCA CGT ATT GGA GAA TAA AAA CAA ATA-3'

En el diseño de los iniciadores para la amplificación de la secuencia T1T2-52-4 por PCR se incluyeron 9 bases de soporte al inicio de la secuencia sentido seguidas de los sitios de restricción para *Xba* I y *Bam* HI y finalmente 27 bases correspondientes a la secuencia T1T2-52-4.

De acuerdo al mapa de los plásmidos pFRAS ó pnir-LTBsp (NANP)₄, el área de clonación del inserto T1T2-52-4 fué en el sitio *Nhe* I/*Xba* I y *Bam* HI. El sitio de restricción *Nhe* I/*Xba* I permite dos opciones de enzimas que son isocaudámeros de la secuencia GCTAGC que se encuentra en el plásmido pFRAS ó pnir-LTBsp (NANP)₄.

En el análisis de restricción realizado por el programa ExpASy a la secuencia T1T2 52-4, se determinó un sitio de restricción para *Nhe* I (G/CTAGC) a 430 bases, por lo que se utilizó a la enzima *Xba* I para el diseño de los iniciadores. Consecutivamente, los iniciadores se utilizaron para la amplificación del inserto T1T2-52-4 dejando en uno de sus extremos el sitio de corte enzimático para *Xba* I. Posteriormente a la digestión del producto amplificado con *Xba* I el inserto T1T2-52-4 digerido se clonó en el plásmido pFRAS ó pnir-LTBsp (NANP)₄ linearizado previamente con la enzima *Nhe* I y *Bam* HI.

PLASMIDO pFRAS



TTATTT ACG GCG TTA CTA TCC TCT CTA TGT GCA CAC GGA GCT AGA CAT CAC CAT CAC
L F T A L L S S L C A H G A R H H H H

NheI NsiI BamHI

CAT CAC GAT GAC GAT GAC AAA GCT AGC ATG CAT GGA TCC

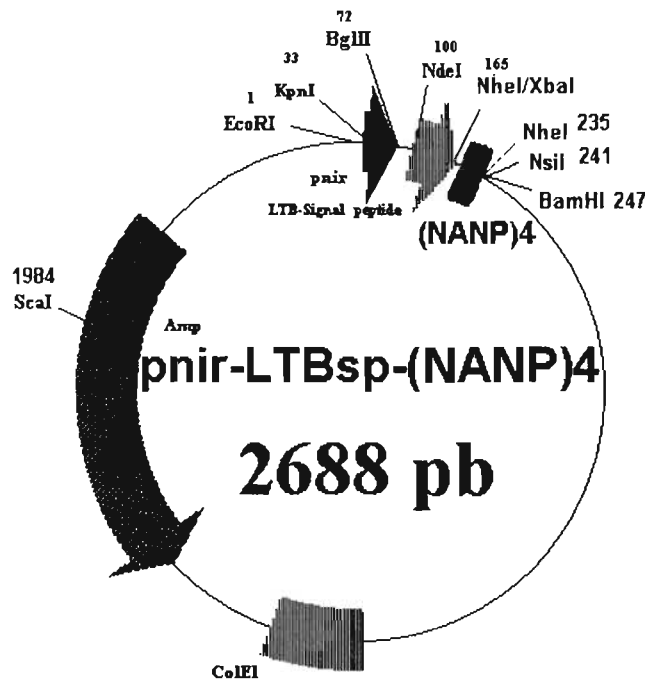
H H D D D D K

Plásmido pFRAS

*Contiene el origen de replicación ColE1 y el gene de resistencia a la ampicilina.

*Contiene el promotor *nirB* y rio abajo de este, se encuentra clonada la secuencia señal LTB, fusionada en marco de lectura con la secuencia que codifica para 6 histidinas y el sitio de corte de la enteroquinasa.

Figura 4. Características del plásmido de expresión pFRAS



```

          BglII           Nde I   LTB signal pep tide →
.....CCCAGATCTTAATCATCCACAGGAGACTTTTCAT ATG AAT AAA GTA AAA TTT TAT GTT
                               M N K V K F Y V
                               NheI/XbaI
TTA TTT ACG GCG TTA CTA TCC TCT CTA TGT GCA CAC GGA GCT AGA CCA AAC GCT AAT CCT AAC GCC AAT
L F T A L L S S L C A H G A R P N A N P N A N
                               NheI
CCA AAC GCA AAT CCT AAC GCT AAT CCA AAC GCT AGC ATG CAT GGA ICC .....
P N A N P N A N P N A S NsiI BamHI
    
```

CONSTRUIDO POR : ARACELI E. SANTIAGO
 DISEÑADO POR: FERNANDO RUIZ
 FECHA : 15 DE ENERO 2000

Figura 5. Características del plásmido de expresión pnir-LTBsp (NANP)₄

5.14.3 Amplificación por PCR de la clona T1T2-52-4 para expresión

El inserto T1T2-52-4 recuperado del tamizaje de la biblioteca de ADNc del adulto de *T. spiralis* en λ ZAPII se encuentra clonado en el vector pBluescript por lo que para su clonación en los plásmidos de expresión se requirió de la utilización de los iniciadores sentido M263 y antisentido T1T2-52-4 y su amplificación por PCR bajo las condiciones que se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de PCR para expresión de la clona T1T2-52-4

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
Preamplificación	94°C	3 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	15 seg	30 ciclos
Alineación	66°C	45 seg	30 ciclos
Extensión	72°C	2 min	30 ciclos
Extensión larga	72°C	5 min	1 ciclo
Enfriamiento	4°C	---	

El tubo para PCR se preparó con los siguientes elementos: 1.5 μ l de M263 y T1T2-52-4, 2.5 μ l de MgCl₂ 3 μ l de DNTP's, 3 μ l de Amortiguador 10 x, 2 μ l del templado (plásmido pBluescript+T1T2-52-4), 16.5 μ l de agua DEPC y 1 μ l de Taq Polimerasa.

5.14.4 Recuperación de productos de PCR de geles de Azarosa

Después de realizar la PCR, el producto amplificado se corrió electroforéticamente en un gel de agarosa al 1 %. La banda positiva amplificada se cortó del gel y el ADN se purificó el protocolo Gene Clean (Qiagen). En este proceso, la banda positiva del gel de agarosa se recortó con navaja estéril y se colocó en un tubo de 1.5 ml. Posteriormente se adicionan 500 μ l de Amortiguador de solubilización y se incubó a 56° C hasta disolver el gel. El contenido del tubo se vació en una columna fijación de DNA, y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 min. La columna se lavó dos veces con 700 μ l de Amortiguador de lavado y se centrifugó 30 seg. Para retirar todo el etanol se centrifugó durante 3 min y el ADN se eluyó con 30 μ l de agua destilada.

5.14.5 Digestión del inserto T1T2-52-4 con *Xba* I y *Bam* HI

Para exponer los sitios *Xba* I y *Bam* HI del inserto T1T2-52-4 y poder clonarlo en los plásmidos de expresión, se realizó la restricción enzimática del producto de PCR purificado por Gen clean. La digestión se realizó a 37°C y en ella se utilizaron los componentes como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Componentes utilizados para la digestión con *Xba* I y *Bam* HI

Componente	Cantidad	Concentración/Marca
Plásmido	8 µl	3µg/ml
<i>Xba</i> I	0.5µl	Promega
<i>Bam</i> HI	0.5 µl	Promega
Amortiguador de restricción	1.5 µl	Promega
Albúmina de Suero Bovino	1 µl	100 x
H2O con DEPC	4.5 µl	
Volumen total	16 µl	

El producto de la digestión se limpió mediante el protocolo del kit QIAQUICK Nucleotide Removal (QIAGEN) en el cual los 16µl de producto se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le agregan 350µl de amortiguador de limpieza. Posteriormente se colocaron en una columna de fijación de ADN y se centrifugó a 10,000 g durante 1 min. La columna se lavó dos veces con solución de etanol y se centrifugó 3 min a 10,000 g hasta retirar totalmente los residuos de etanol. El producto se eluyó con 30µl de H₂O DEPC y se resguardó a -20°C hasta su utilización.

5.14.6 Linearización y desfosforilación del los plásmidos pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) y pnir-LTBsp (NANP)₄

Se mezclaron 10-20 µg de ADN plasmídico con 3 U de enzima *Nhe* I y *Xba* I por 2 hr a 37°C, posteriormente el producto linealizado se separó en geles de agarosa al 1%. El fragmento se purificó del gel por medio de GeneClean y se desfosforiló en un volumen total de 50µl que incluyeron 5 U de fosfatasa alcalina de intestino de carnero (CIP) y 5 µl de amortiguados 10 x. La

mezcla se incubó a 37°C durante 8 hr y se inactivó la fosfatasa calentando a 75°C durante 20 min. El fragmento linearizado se purificó nuevamente por medio de GeneClean.

5.14.7 Ligadura del producto T1T2-52-4 a los vectores de expresión

Se utilizó 0.1 µg de ADN del inserto T1T2-52-4 y una cantidad equimolar del plásmido vector (linearizado). Se añadió 1µl de amortiguador para ligasa de T4 y 1 U de enzima ligasa del bacteriófago T4, para lograr un volumen final de 8 µl. La mezcla se incubó durante toda la noche a 16°C. La reacción de ligación se comprobó utilizando un gel de agarosa al 1% en el que se colocaron, el producto ligado y el plásmido de expresión sin linearizar. Los plásmidos de expresión resultantes con la clona T1T2-52-4 de *T. spiralis* se digirieron entonces con *Xba* I y *Bam* HI para desinsertar el producto clonado a manera de comprobación.

5.14.8 Preparación de células competentes

La cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5α se cultivó en medio Luria-Bertani (LB, Gibco) o infusión cerebro corazón (BHI-Difco) y se le adicionó ampicilina a una concentración final de 750µg/ml. Para ello se inoculó una asada de bacteria en 3 ml de medio a 37°C. Se tomó un inóculo de 300µl y se adicionó a 250 ml del mismo medio y se incubó a 37°C hasta un D.O. de 0.6-1. Las bacterias se centrifugaron a 3 000 g durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de CaCl₂ al 0.1M hasta resuspender el paquete. Posteriormente se añadió 250 ml de CaCl₂ al 0.1M y se incubó 2 hr a 4°C. La mezcla de bacterias se centrifugó a 3 000 g, 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ al 0.1M y glicerol 20% y se alicuotaron las bacterias (aproximadamente 150µl) y se congelaron a -70°C.

5.14.9 Transformación de células competentes

Se utilizaron las células competentes *E. Coli* cepa DH5α para ser transformadas con los plásmidos de expresión unidos al inserto T1T2-52-4 de *T. spiralis*. Para ello se descongelaron las células competentes en hielo y se combinaron con el producto de ligadura manteniendo la mezcla en hielo y homogenizando rápidamente. La mezcla se incubó en hielo durante 45 min y posteriormente en baño María (BIOBLOCK Scientific Polystat cat. 86633) a 42°C por 1.5 min. Inmediatamente después del choque térmico se colocó en hielo la muestra durante 5 min. Posteriormente, la muestra se colocó en un tubo falcon de 15 ml y se agregaron 800 a 900 µl de

medio SOC (añexo 1) con lo cual se incubó a 37°C en agitación durante 1.5 hr. Al término de la incubación cada 200 µl de muestra se plaquearon en cajas de agar BHI con ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

5.14.10 Inducción de la expresión en bacterias transformadas

Las bacterias transformadas se cultivaron en medio tioglicolato-DHB-ampicilina en condiciones anaeróbicas y se dejaron crecer hasta alcanzar una D.O. de 0.6-1.0 a 540 nm. Posteriormente se centrifugaron a 3 000 g por 5 min, se lavaron con solución salina fisiológica (SSF) 2x y se mezclaron con el amortiguador para muestras de SDS-PAGE.

5.14.11 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se utilizaron 30 µg/ml de proteínas totales de cada cepa de interés y se separaron en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras en una unidad electroforética vertical (Gibco, Life Sciences Instruments) de acuerdo al método de Laemmli (1970).

Las muestras de proteína se resuspendieron en amortiguador de muestra (Tris 0.5 M pH 6.8, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 1 %) y se desnaturalizaron por ebullición durante 5 min.

En la preparación del gel se utilizó una solución concentradora de 2.5% de acrilamida, 0.13% de Bis-acrilamida, 0.1% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8. La solución espaciadora se compuso de 12% de acrilamida, 2.5% de Bis-acrilamida, 0.66% de SDS en amortiguador de Tris-HCl 1.5 M pH 8.8. Por otra parte el amortiguador de corrimiento se preparó con Tris 0.025 M, glicina 0.195 M y SDS al 0.1% a un pH de 8.3. La separación de las proteínas se realizó durante 1 hr a 30 mA.

5.14.12 Inmuno-electrotransferencia (Western Blot)

Las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a papel de nitrocelulosa (0.45 Micron Hybon-C, Amersham) en una unidad de transferencia electrónica (BioRad 2005 Transphor) durante 3 hr a 0.5 mA. Posteriormente a la transferencia, el papel de nitrocelulosa se bloqueó con PBS-leche al 5% durante 1 hr, se lavó con PBS y se incubó en agitación a 45 rpm con el anticuerpo monoclonal 2A10 ó penta-His-6 a una dilución 1:500 para los dos casos en PBS-leche 5% a temperatura ambiente, toda la noche. La membrana se lavó tres veces con PBS y tres veces con PBS-Tween al 0.1% y se adicionó el segundo anticuerpo (Ig de cabra contra IgG de

conejo o contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa, Sigma) en una dilución 1:1 000 en PBS-leche al 5% y se incubó en agitación a 45 rpm durante 45 min a temperatura ambiente. La reacción inmunológica se reveló por la actividad de peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo con α -4-Cloro Naftol- H_2O_2 .

VI. RESULTADOS

6.1 Obtención de LM, adultos y LRN

Durante los protocolos de obtención de larvas de los diferentes estadios de *T. spiralis* se consideró establecer en primer lugar el número de LM y adultos recuperadas por ratón, con el fin de calcular el número de animales requeridos en cada experimento. En ese contexto, se infectaron ratones con 400 LM vía oral, los cuales se utilizaron tanto para mantener el ciclo de *T. spiralis* como para la obtención de la LM. Estos se sacrificaron de acuerdo al protocolo mencionado anteriormente y de cada ratón se obtuvo un número aproximado de 10,000 LM (Tabla 13).

Para la recuperación de larvas adultas de *T. spiralis*, se infectaron ratones con 2000 LM vía oral y se recuperaron aproximadamente 2000 adultos de cada animal ya sea en la cepa N2/HN (He Nang- China) como en la cepa ISS-406 (Francia) (Tabla 14).

En la obtención de LRN, se sacrificaron 40 ratones a partir de los cuales se obtuvieron un mínimo suficiente de LRN, para llevar a cabo los experimentos.

Tabla 13. Número de larvas adultas recuperadas de animales infectados con *T. spiralis*

Identificación	No. de ratones infectados	No. de LM/ratón	No. de larvas adultas recuperadas
N2/HN (He Nang-China) (<i>T. spiralis</i>)	10	400 LM	198 000

* Se utilizaron ratones de 20 gramos con 3 semanas de edad

Tabla 14. Número de parásitos adultos de las cepas N2/HN y ISS-406 de *T. spiralis* recuperados de animales infectados

Identificación	No. de ratones infectados	No. de LM recuperadas/ratón	No. de adultos totales recuperados
Cepa N2/HN (He Nang-China)	19 ratones	2000 LM	18, 600
Cepa ISS-406 (Francia)	19 ratones	2000 ML	16, 000

6.2 Determinación de la Prolificidad *in vitro* de hembras adultas de *T. spiralis*

Los resultados obtenidos en los ensayos de prolificidad mostraron que en el cultivo *in vitro* de hembras adultas de *T. spiralis* de la cepa ISS-406 obtenidas al 3er día p.i., no se encontraron LRN, durante el monitoreo que duró 5 días. Por otro lado, en el cultivo de hembras adultas obtenidas al 4° día p.i. se recuperaron 242 LRN a partir de 48 hembras y conforme a la fórmula referida en material y métodos, la prolificidad se calculó de acuerdo como sigue:

$$\% \text{de prolificidad} = \frac{242 \text{ LRN}}{48 \text{ hembras adultas}} = 5.04\% \text{ de prolificidad}$$

Considerando los resultados sobre la prolificidad del 0% del día 3 p.i. con respecto al 5.04 % de prolificidad de las hembras de la fase adulta obtenidas el día 4 p.i., se eligieron los adultos de *T. spiralis* colectados el día 3 p.i. para el desarrollo de las bibliotecas de ADNc de esta fase del parásito, así como para la separación del ARN total utilizado en la preparación de las bibliotecas sustractivas.

6.3 Extracción de ARN total y ARNm

Como se mencionó anteriormente, la extracción de ARN total se realizó mediante el protocolo de Chomezynski y Sacchi (1987) empleando cloroformo-fenol e isotiocianato de guanidina. Los valores de ARN total obtenido de la extracción de la fase adulta de *T. spiralis* de la cepa china N2/HN fueron iguales (1 100 µg) a los obtenidos para la cepa francesa ISS-406. En el caso de la LM se obtuvieron 1,300 µg de ARN.

Por otra parte, durante la extracción de ARNm por cromatografía de afinidad la recuperación de ARNm de la cepa china fue mayor que la obtenida para la cepa francesa (Tabla 15).

Tabla 15. Valores sobre el rendimiento en la extracción de ARN total y purificación de ARNm de larvas adultas de *T. spiralis* de las cepas N2/HN y ISS-406 y LM de la cepa N2/HN

	Adultos <i>T. spiralis</i> (N2/HN)	Adultos <i>T. spiralis</i> (ISS-406)	LM <i>T. spiralis</i> (N2/HN)
ARN total	1,100 µg	1,100 µg	1 383 µg
ARNm purificado	14 µg	7 µg	10.8 µg
% de rendimiento ARN total/ARNm	1,27 %	0,7 %	0,78 %

6.4 Transcripción *in vitro* de ADNc a ARNm poly (A)⁺

Como se ha mencionado anteriormente la obtención de larvas es un proceso que se dificulta debido al número de animales que se tienen que sacrificar para obtener la cantidad de material necesario para el desarrollo de una biblioteca. Por esta razón, se utilizó la estrategia de transcripción *in vitro* de ADNc obtenido de las bibliotecas de ADNc en λ ZAPII hacia ARNm poly A⁺, el cual se utilizó a su vez en el desarrollo de bibliotecas sustractivas. Durante este protocolo, se transcribieron las bibliotecas de ADNc de los estadios de adulto del día 3 p.i. y LM de *T. spiralis*. Así mismo, se utilizó el ADNc de las bibliotecas de adulto+LRN de las cepas N2/HN y ISS-406 existentes en el laboratorio. Los valores de ARNm recuperados en dicha transcripción se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Valores sobre el rendimiento en la obtención de ARNm por transcripción *in vitro* en la cepas N2/HN y ISS-406 de *T. spiralis*

	Adulto	LM	Ad/LRN
ARNm poly (A)⁺ post-transcripción Cepa china N2/HN	1,2 µg/ml	1,6 µg/ml	1,6 µg/ml
ARNm poly (A)⁺ post-transcripción Cepa francesa ISS-406	0,7µg/ml	0,51 µg/ml	2,0 µg/ml

6.5 Construcción de Bibliotecas de ADNc empleando el vector λ ZAPII

Se construyeron 3 bibliotecas de ADNc en el vector λ ZAPII con las características que se describen en la tabla 17. Los valores en unidades formadoras de placas obtenidos durante el desarrollo de las bibliotecas de adulto de la cepas N2/HN e ISS-406 fueron muy distantes, por lo que la cepa N2/HN se consideró la más recomendable para su utilización en experimentos posteriores.

Otras bibliotecas utilizadas durante este trabajo fueron: la biblioteca del adulto+LRN de la cepa china y de la cepa francesa (elaboradas por Liu Minguyan y Muriel Vaysier respectivamente, CNEVA-Alfort, Francia) y la biblioteca de ADNc de la LM de la cepa francesa (elaborada por Catherine Trap, CNEVA-Alfort, Francia).

Tabla 17. Características de las bibliotecas expresadas en λ ZAPII del adulto y la LM de *T. spiralis* (cepas N2/HN y ISS-406).

ESTADIO	Adulto				LM
	Cepa N2/HN		Cepa ISS-406		Cepa N2/HN
ADNc utilizado (ng)	225	225	225	225	125
% de fagos azules	3.28 %		2,8 %		3.28 %
Título de fagos recombinantes antes de la amplificación (UFP/ml)	$1,041 \cdot 10^6$		$0,45 \cdot 10^5$		$2,69 \cdot 10^6$
Título de fagos recombinantes después de la amplificación (UFP/ml)	$2,0 \cdot 10^{10}$		$1,1 \cdot 10^{10}$		$7,0 \cdot 10^9$
Título después de la excisión	$8,6 \cdot 10^6$		nd		$1,04 \cdot 10^7$
Plásmido de ADNc extraído/ml (total)	1,0 μ g (403 μ g)		0,44 μ g (311 μ g)		1.1 μ g (427 μ g)

nd = no determinado

6.6 Preparación y tamizaje de bibliotecas sustractivas de ADNc

Se prepararon cuatro bibliotecas sustractivas: una para el adulto, 2 de adulto+LRN y una para la LM de *T. spiralis* de la cepa N2/HN utilizando el kit de sustracción "PCR-Select cDNA". Los resultados observados post-sustracción mostraron un enriquecimiento de bandas en las bibliotecas mencionadas que se comparó con las bibliotecas antes de la sustracción. La biblioteca del adulto

obtenida a partir de ARNm fresco post-sustracción presentó bandas definidas sin fondo, sin embargo en las bibliotecas en donde se utilizó ARNm mediante transcripción reversa se observó un barrido entre las bandas indicativo de fondo (Figura 6).

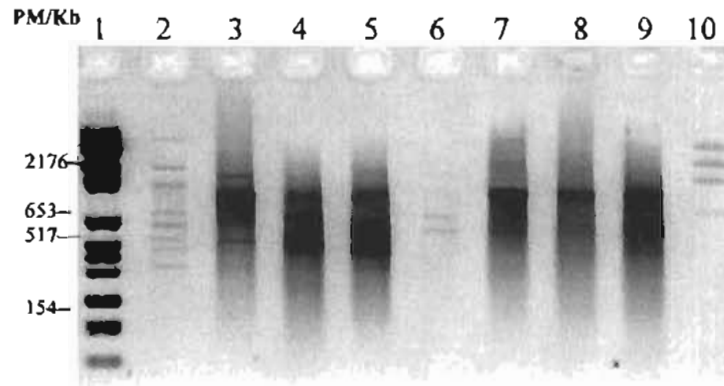


Figura 6. Enriquecimiento de bibliotecas post-amplificación por PCR comparado con las bibliotecas antes de la sustracción. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular. Los carriles 2 y 3 muestran el enriquecimiento de las bibliotecas del adulto y la larva muscular y los carriles 4 y 5 de dos bibliotecas del adulto+LRN. Los carriles 6, 7, 8 y 9 muestran la amplificación de las bibliotecas sin sustracción. El carril 10 muestra un control de sustracción suplementado por el proveedor.

Después de la amplificación de las bibliotecas sustractivas un total de 1928 colonias bacterianas blancas se seleccionaron al azar tanto del adulto como de la LRN las cuales se cultivaron separadamente para su crecimiento en medio TB ó LB y después de preparar las membranas como se describió en la sección de material y métodos, se realizaron tres tamizajes a diferentes tiempos por hibridación con sondas radiomarcadas y su posterior autoradiografía. Durante este procedimiento se obtuvieron un total 339 colonias positivas correspondientes a la sustracción de clonas específicas del adulto y LRN.

El procedimiento de tamizaje se llevó a cabo empleando las 1928 clonas, las cuales se colocaron en membranas de nylon o de nitrocelulosa y se hibridaron a su vez con la sonda obtenida de la biblioteca sustractiva del adulto (P1) o bien con la sonda de la biblioteca sustractiva de la LM (P3) (Figura 7A y 7B).

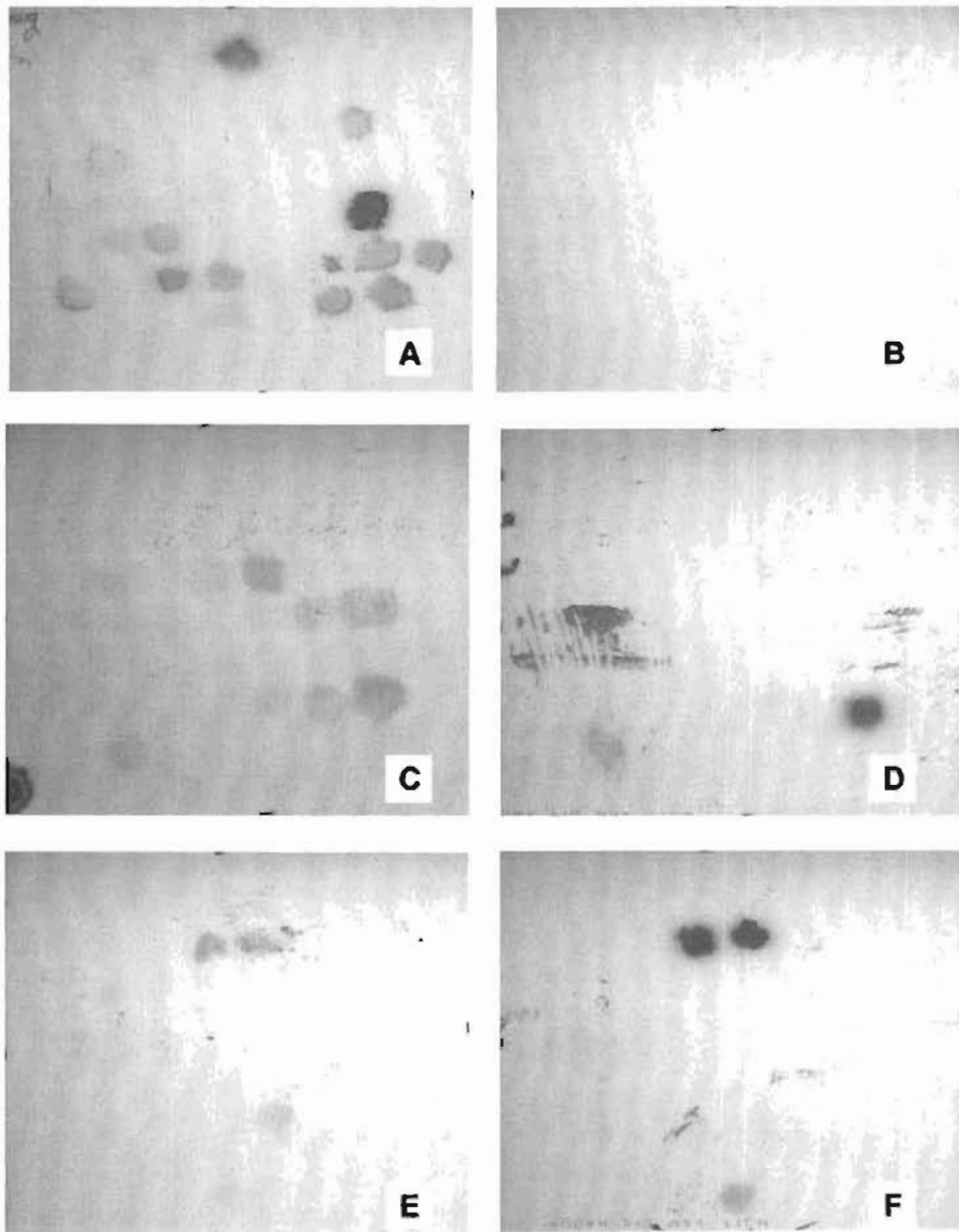


Figura 7A. Autorradiografía del primer tamizaje para la evaluación de clonas estadio específicas de la fase adulta de *T. spiralis* obtenidas por hibridación sustractiva. Se muestra la hibridación positiva de las clonas 1-50 (A), 51-100 (C) y 101-150 (E) del adulto empleando la sonda P1 (adulto). En contraste se muestra en las imágenes B, D y F, la hibridación positiva de las mismas clonas empleando la sonda P3 (LM). De éstas se seleccionaron las clonas que únicamente hibridaron a la sonda P1 para análisis posteriores.

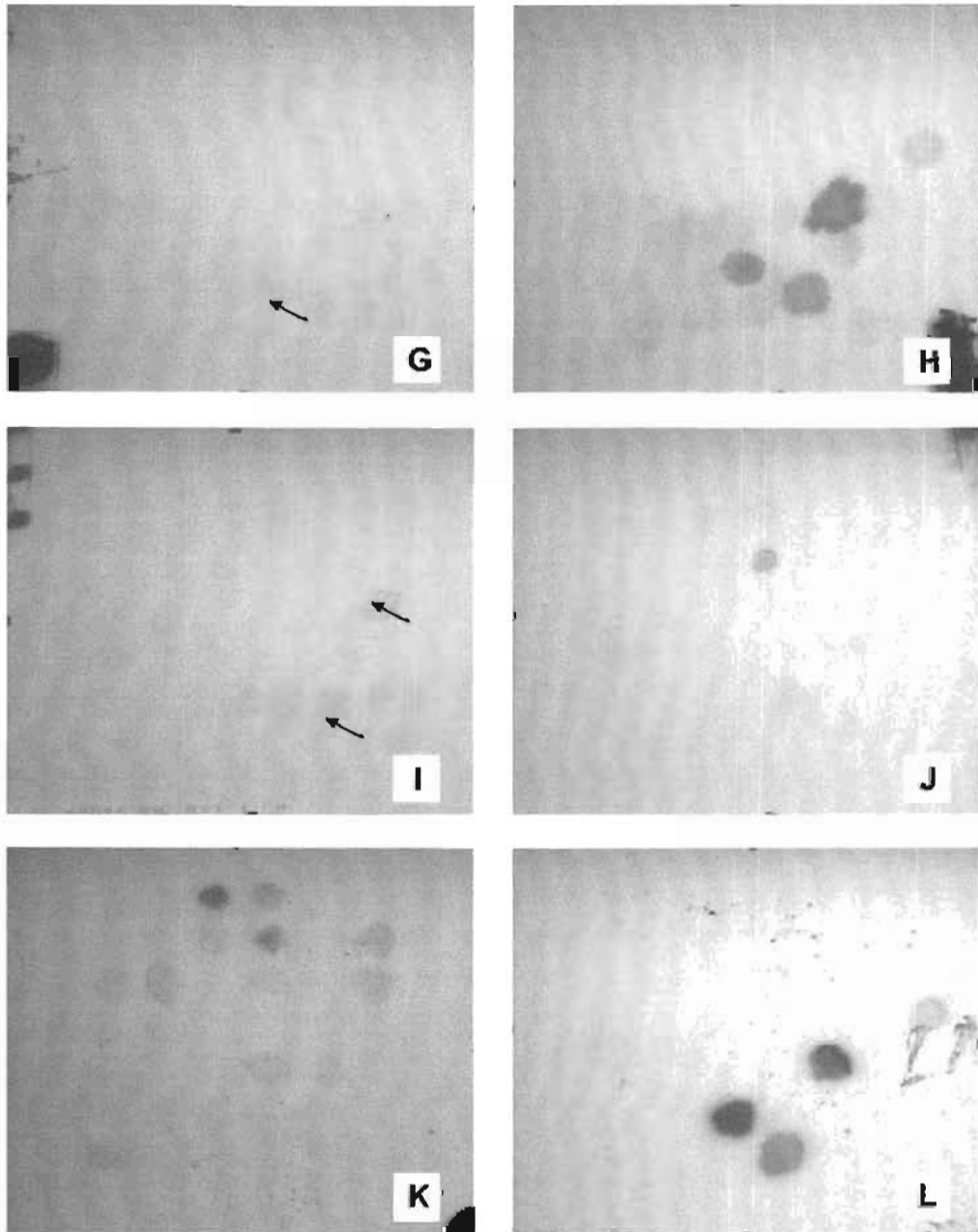


Figura 7B. Autoradiografía del primer tamizaje para la evaluación de clonas estadio específicas de la fase adulta de *T. spiralis* obtenidas por hibridación sustractiva. Se muestra la hibridación positiva de las clonas 151-200 (G), 201-250 (I) de la biblioteca del adulto y de las clonas 1-50 (K) de la biblioteca del adulto+LRN empleando la sonda P1 (adulto). En contraste se muestran en las imágenes H, J, y L, las mismas clonas hibridadas con la sonda P3 (LM). De éstas se seleccionaron las clonas que únicamente hibridaron a la sonda P1 para análisis posteriores.

La escisión del plásmido se realizó en las 339 colonias obtenidas por tamizaje y de cada extracción de plásmido se realizó la digestión con la enzima *Eco* RI para observar la presencia del fragmento clonado. Posteriormente los productos de la digestión enzimática se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5% y se determinaron los tamaños de los insertos para elegir los de mayor peso molecular (Figura 8A, B y C). Las clonas que no mostraron inserto después de la digestión enzimática no se les dio seguimiento.

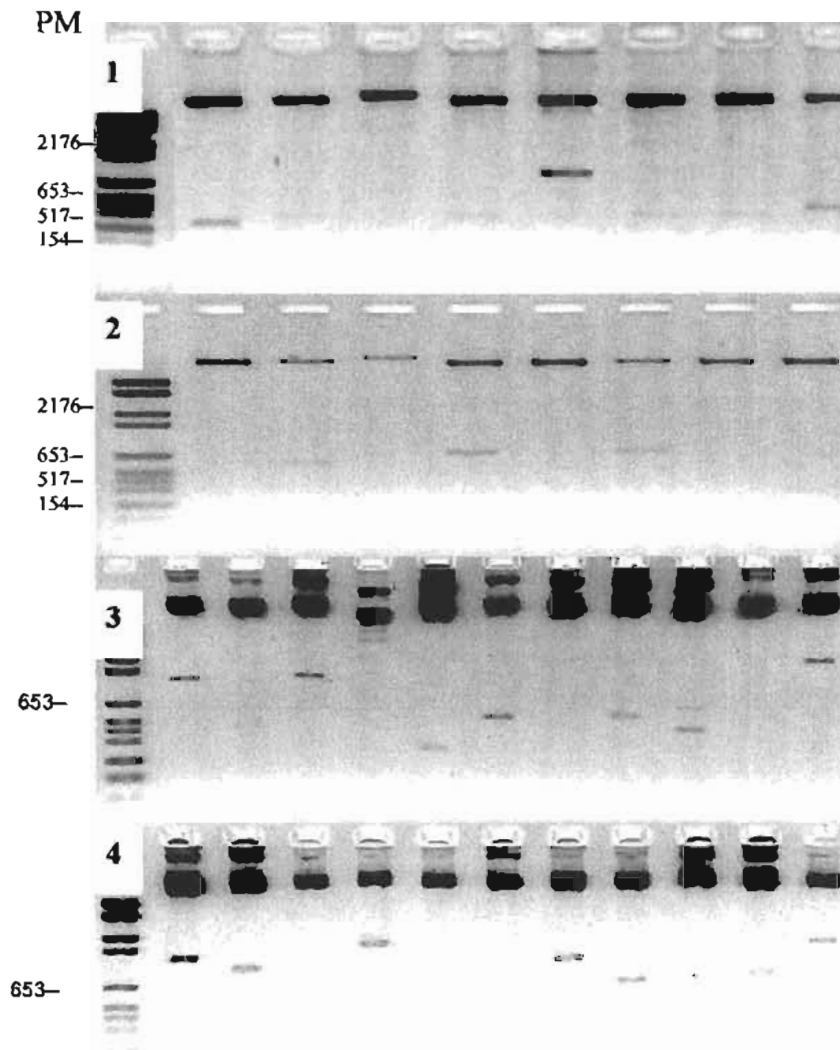


Figura 8A. Productos obtenidos por digestión enzimática con *Eco* RI de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (PM). El panel 1 muestra los productos de las clonas T1-01, 05, 11, 21, 31, 41, 51 y 61. El panel 2 muestra los productos de las clonas T3-1, 11, 21, 31, 41, 51 y 61. El panel 3 muestra los productos de T1-3, 16, 17, 18, 20, 26, 27, 33, 35, 36 y 38 y el panel 4 muestra los productos de las clonas T1-39, 40, 45, 52, 53, 57, 58, 60, 62 y 66. Se seleccionaron únicamente las clonas en las que se presentó inserto positivo.

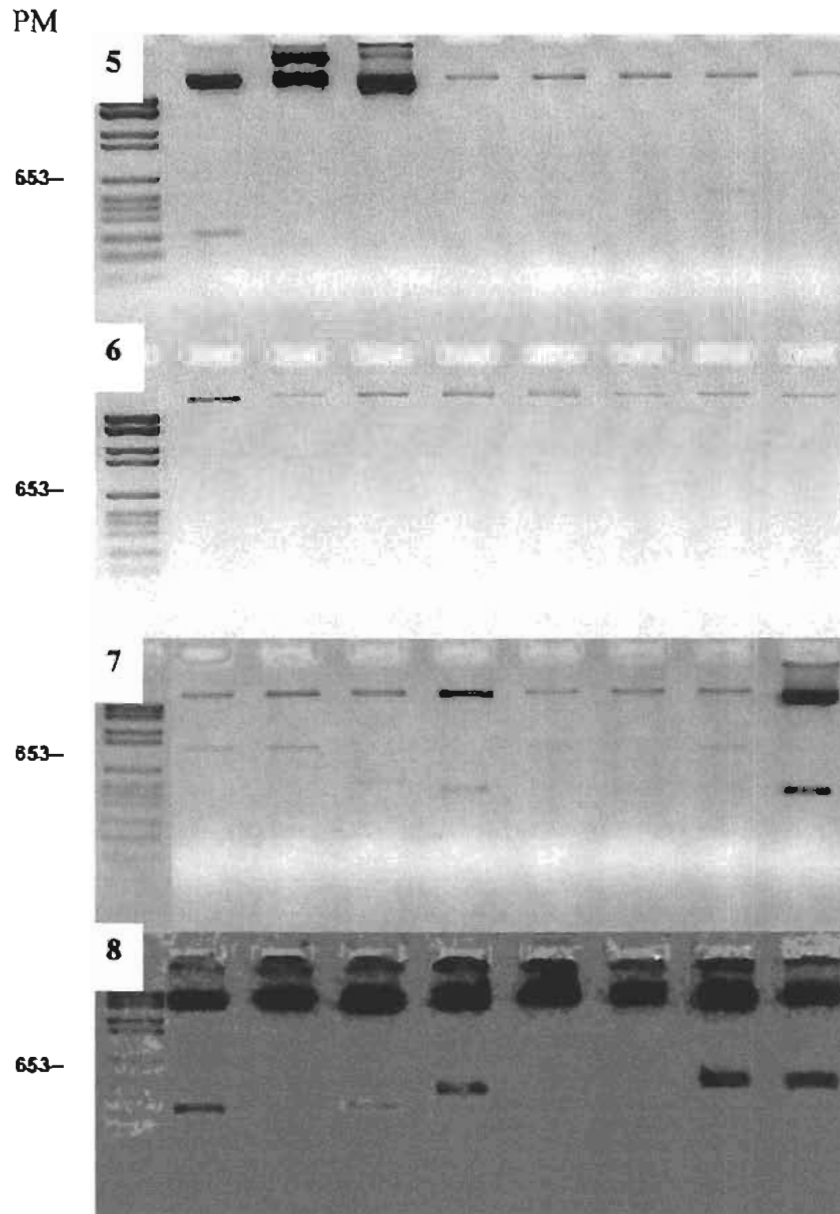


Figura 8B. Productos obtenidos por digestión enzimática con *Eco* RI de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* cepa N2/HN separados por geles de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular. El panel 5 muestra los productos de las clonas T3 1-1, 2, 4, 7, 12, 14, 28, 42 y 6. El panel 6 muestra los productos de las clonas T1 1-1, 2, 29, 35, 37, 42, 46, 48 y 3. El panel 7 muestra los productos de T1-1-1 56, 2, 5, 10, 12, 19, 20 y 27. El panel 8 muestra los productos de las clonas T4-1, 2, 43, 3, 5, 8, 9 y 11. Las clonas en las que se observó inserto positivo se seleccionaron para análisis posteriores.

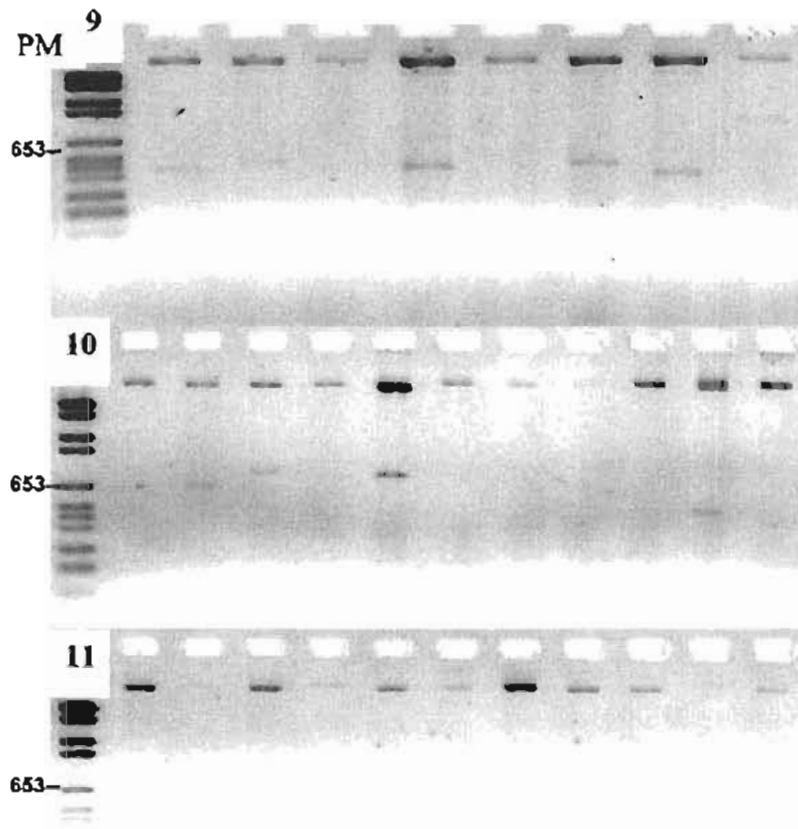


Figura 8C. Productos obtenidos por digestión enzimática con *Eco* RI de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* cepa N2/HN separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular. El panel 9 muestra los productos de las clonas T3 1-2 87, 5, 13, 14, 39, 40, 43, 1, 4, 18 y 25. El panel 10 muestra los productos de las clonas T3 1-2 10, 23, 33, 38, 42, 48, 3 y 15. El panel 11 muestra los productos de T3T4 44, 2, 3, 20, 27, 33, 43, 14, 43, 5 y 17.. Las clonas en las que se observó inserto positivo se seleccionaron para análisis posteriores.

Se seleccionaron 67 insertos que corresponden a clonas específicas para el adulto y 55 insertos para la LRN los cuales tenían alrededor de 400 pares de bases o más.

Las 122 clonas estadio específicas del adulto y la LRN se colocaron en membranas nylon y se analizaron por la técnica de Dot Blot y se hibridaron a sondas radiomarcadas provenientes de la biblioteca substractiva de la LM y a la misma biblioteca sin sustracción (Figura 9).

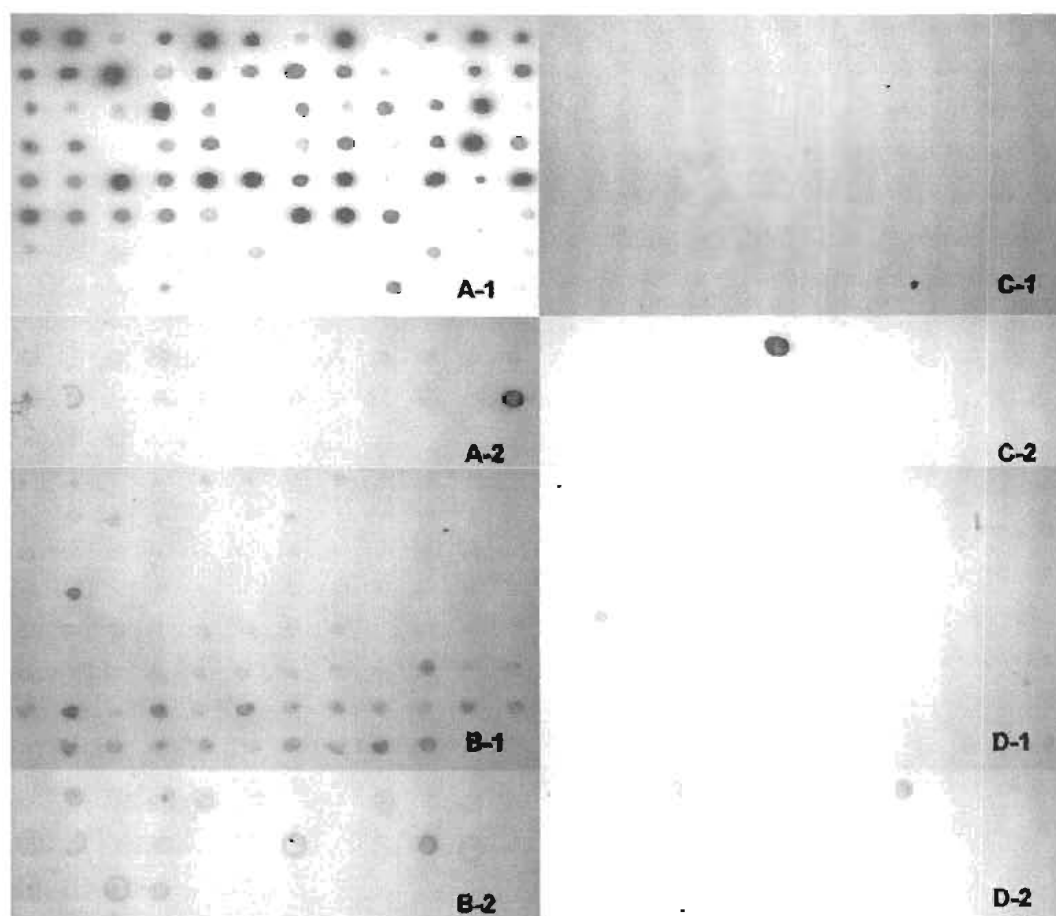


Figura 9. Análisis de Dot Blot de las colonias estadio específicas del adulto y la LRN de la cepa N2/HN de *T. spiralis*. Los paneles A-1 y A-1 muestran la hibridación del ADN plasmídico de la fase adulta y LRN empleando la sonda P1 (adulto). Los paneles B-1 y B2 muestran la hibridación del ADN plasmídico del adulto y LRN empleando la sonda P2 (Adulto+LRN). Los paneles C-1 y C2 muestran la hibridación del ADN plasmídico del adulto y LRN hibridado a la sonda P3 (LM). Los paneles D-1 y D-2 muestran el mismo material hibridado a la sonda P3 no sustractiva. De éstas se seleccionaron las clonas sustractivas que fueron positivas a la hibridación con la sonda P1 (adulto).

Las clonas que se seleccionaron a partir del Dot Blot se almacenaron a -70°C . Estas clonas representan la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* y algunas de ellas de la LRN por lo que podrán ser analizadas individualmente. Cada clona posee una clave de acuerdo a la biblioteca sustractiva de origen donde se obtuvo (Tabla 18).

Tabla 18. Código de identificación de clonas estadio específicas de la fase adulta y algunas de la LRN de la cepa china de *T. spiralis* obtenidas por hibridación sustractiva

1.- T1T2 39	22.- Control 1	43.- T4T2 14	64.- T1-4 F1	85.- T4-3 E12	106.- T1-2 A3
2.- T1-2-2 30	23.- Control 2	44.- T1T2 40	65.- T1-4 E4	86.- T4-3 D8	107.- T1-1 F3
3.- T1-2-2 17	24.- T1T2 3	45.- T1T2 45	66.- T4-3 E9	87.- T4-3 A1	108.- T1-4 F12
4.- T1T2 11	25.- T1-2-1 15	46.- T3-1 H4	67.- T4-3 E5	88.- T1-3 D3	109.- T4-2 A5
5.- T4 11 **	26.- T1T2 52 **	47.- T3-2 G10	68.- T1-3 H9	89.- T1-3 E6	110.- T4-2 E6
6.- T1-3 13	27.- T1-2-2 13	48.- T4-1 C2	69.- T4-3 D1	90.- T1-3 F2	111.- T1-3 H7
7.- T1-2-1 26	28.- T1T2 38	49.- T1T2 64	70.- T4-3 D2	91.- T1-3 D2	112.- T1-2 E11
8.- T1T2 35	29.- T3-2-2 3	50.- T3-2-2 2	71.- T1-1 A10	92.- T1-4 C1	113.- T1-2 A1
9.- T1T2 66	30.- T1-3 48 **	51.- T3-2-2 3	72.- T1-2 F2	93.- T4-2 B12	114.- T4-2 G7
10.- T1T2 18	31.- T3T2 87	52.- T1-1-1 29	73.- T1-2 D12	94.- T4-2 C2	115.- T4-1 C8
11.- T1T2 58	32.- T3-2-2 27	53.- T1-1-2 23	74.- T1-2 E7	95.- T4-1 F12	116.- T4-1 A3
12.- T1-2-1 36	33.- T3-1-2 5	54.- T1-2-2 3 **	75.- T1-2 E8	96.- T4-2 G12	117.- T3-3 F3
13.- T1T2 17	34.- T1-2-2 36	55.- T3-2-2 27	76.- T1-2 G9	97.- T4-3 H2	118.- T4-1 D9
14.- T3-3-2 5	35.- T3-2 88	56.- T3-1-2 13	77.- T1-2 A2	98.- T4-2 F9	119.- T4-1 C5
15.- T3-2-2 2	36.- T3-3 A4	57.- T3-3 A7	78.- T1-1 B9	99.- T4-1 F6	120.- T4-2 E10
16.- T4 172	37.- T3-1 D4	58.- T3-3 E4	79.- T1-2 D4	100.- T1-4 G10	121.- T1-4 G8
17.- T1-1-1 42	38.- T1T2 56	59.- T3-2 C12	80.- T1-2 D7	101.- T4-2 F12	122.- T1-3 C9
18.- T1-1-1 35	39.- T4-1 D1	60.- T3-2 D5	81.- T1-3 C7	102.- T1-2 H6	123.- T4-1 G4
19.- T1-1-2 4	40.- T4-1 C6	61.- T3-2 F7	82.- T1-4 E11	103.- T1-3 E3	124.- T1-1 F3
20.- T1-1-2 7	41.- T1T2 60	62.- T3-3-2 5	83.- T1-4 D9	104.- T1-2 H10	
21.- T3-2-1 25	42.- T4T2-22	63.- T1T2 26	84.- T1-3 E8	105.- T1-2 C3	

Diecinueve plásmidos se seleccionaron para secuenciación con el iniciador M13 de acuerdo a las normas que define el proveedor (CNEVA-Ploufragan, Francia).

Se seleccionaron 4 secuencias después del análisis (Tabla 19) de PC GENE y su identidad a proteínas ya reportadas se presenta en la tabla 20.

Tabla 19. Secuencias de las cuatro clonas seleccionadas de la biblioteca sustractiva

T1T2 52 SECUENCIA SENTIDO CON MARCO DE LECTURA ABIERTO

CAGAAATCA GAAGCGGATT CTGTTACTCC TGATTCATCT GCACGGTGGA TAGAACTGCG
 TTCTGTAAAA CAAGCAACAG CACAAGGGGA GACAAGTTCC ACTAATACCA GTAGCAATAC
 AGTCAACGAT AACAGCGCTG ATTTTCCTCT GTTGACTCGG TTTCAAGATG TCCGTTGTAT
 GGTTTGTGGT GATTGCGCCC ACGGTTTTCA TTACGGCGTA GTTACTTGCG AAGGTTGCAA
 AGGGTPPTTT CGAAGAACGG TGCAACGCAA CCTTCGATAT TCTTGTCACA AATCTTCCCG
 GTGTGAAAT AACCGCCAGA CCAGAAACCG GTGTCAGGCA TGCCGATACC AACAAATGCCT
 TGATGTTGGC ATGTCACCTA TG

T4-11 SECUENCIA SENTIDO CON MARCO DE LECTURA ABIERTO

CACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGAACTA GTGGATCCCC CGGGCTGCAG GAATTCGGCA
 CGAGGTTTAT CACGTTTATC TTTCTTGCTA ACATACTGCT TCTTGTCAGG CCATCGGAAG
 CATATCGTGG TCACACCAAC GATGAAATTC GATTGATGGA TGAGTGATAGC GATGAACCAT
 ACATACGAGA ACACTTGGGG GAAGATGATT ATATGAGCTT AATTGATGCG TGCCTTGAAG
 AACGACTTGG ACGAAGAGTT GCA

T1223 SECUENCIA SENTIDO CON MARCO DE LECTURA BIERTO

ACTAATGGCA GTGTGGTTGT TTCTCCGGCA ATTGCAACTG CTGGAAAATG AAAAAAAAAA
 CTGTGCAATC TCACTTGATA ACAAGACATC ATCATAAATT CAACAAAATT GCGTGTGAAT
 ATTATCCAGA ATTATATATG GTCTCTATTT ATCATTTAAA TTCCTTTTAT TTGTTTTCTA
 TTTTTTTGTT TTGTTTTTAC GTCCATCGGC TGGATCGACG TTTGTTGTTT CAGAGAGAGA
 AAATTATTTT CTCAACATTT TTGAATTTCA TTTCACTATT ACTGTTGTTG TTGTTGTTTT
 ACGCCTAGTT TTTAGAAAAA CAACAAACAA ACAAACAGCA AAGAACGTCC TCCATTTTTT
 TACTTT

T1 3 48 SECUENCIA SENTIDO CON MARCO DE LECTURA ABIERTO

ACGTATCATA CGTTTAAACAC ATTGCGCCGG TTTATTTACC GATTTTTGGC ACTGCTGTTT
 GCTGTGCCAT GCGCAATCGT TTGGGCAATG CTTTTCGCTC TGTGACAAG CATCAACGTA
 TGGATACTGA CACCGTTGGC AATAGCTATT TCTATTCCCTG CCGTTTGGCT AGCTAAGACA
 TGGAAC TTCA TCATCCGATC ACTTCTTGAC CCGTTTTTCA AGTCTTGTGG CTTAATGCGC
 GCTGCACACA GTGAATCTAC AACAAACCAA ACCGTCTATA AAGCTTCGAA AACTGAAACC
 GGCCTATCAT ATTTTCCACA CACTTTAATA TCTTGTCTTT ATAACTTTTT TTCGCTTTTA
 T

Tabla 20. Clonas seleccionadas de la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis*

Clona	Sitios	ASIGNATURAS	IDENTIDAD	%
T1 T2 52	N-glycosylation Protein kinase C phosphorylation Casein Kinase II phosphorylation N-myristoylation	Nuclear hormones receptors DNA-binding region signature	CHR3_CAEEL Probable Nuclear hormone receptor CHR3.OS <i>C.elegans</i> .	62
T1 3 48	N-glycosylation Protein kinase C phosphorylation Casein Kinase II phosphorylation N-myristoylation		YKK8_CAEEL Hypothetical 27.4 KD Protein C02F5.8 in chromosome III. ZP2_MOUSE Zona pellucida sperm- binding protein 2 precursor (zona pellucida mus musculus (mouse).	60
T4 11	Tyrosine sulfatation Casein Kinase II phosphorylation N-myristoylation Amidation		TGT_ZYMMO Queuine tRNA- ribosyltransferasa (tRNA-Guanine <i>Zymomonas mobilis</i>). FLAP 5-Lipoxygenase activatin protein	54
T1 22 3	N-glycosylation cAMP and cGMP- dependent protein kinase phosphorylation N-myristoylation Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment Cell attachment sequence		G156_PARPR 156G surface protein precursor <i>Paramecium primaurelia</i>	50

Las 4 clonas seleccionadas se analizaron por Southern (Figura 10) y Northern blot (Figura 11) como se menciona en la sección de material y métodos.

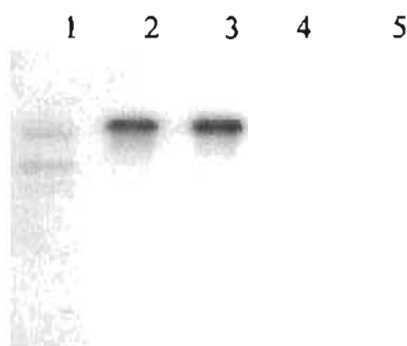


Figura 10. Análisis de Southern Blot con la sonda T1T2 52 específica de la fase adulta de *T. spiralis* conteniendo los insertos de ADNc plasmídico del adulto, adulto+LRN y la LM. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular. En los carriles 2 y 3 se observa la hibridación positiva del ADN plasmídico del adulto y del adulto+LRN respectivamente. El carril 4 es el ADN plasmídico de la LM y el carril 5 es el ADN de un plásmido control.

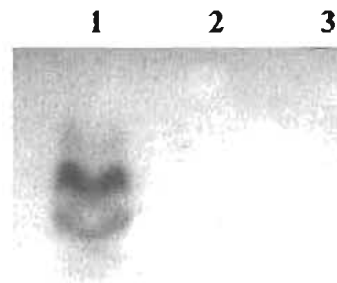


Figura 11. Análisis de Northern Blot con la sonda T1T2 52 al ARN total del Adulto+LRN (carril 1), y el ARN total de células eucariontes M13 (carril 2) y el ARN total de la larva muscular. El carril 1 muestra la hibridación positiva de la sonda con el ARN total del Adulto+LRN.

6.7 Determinación del porcentaje de genes estadio específicos

El porcentaje de genes estadio específicos de adulto y la LRN presentes en las bibliotecas sustractivas originales fueron 1.43 % y 0.6 % respectivamente. Estos se determinaron por hibridación de las bibliotecas de adulto, LRN y LM con las pruebas específicas radiomarcadas con dCTP [α - 32 P] antes mencionadas.

6.8 Análisis de la clonas para expresión

Las 4 clonas seleccionadas por hibridación sustractiva se utilizaron como sonda para el tamizaje y recuperación de fragmentos de mayor tamaño a partir de la biblioteca de ADNc de la fase adulta de *T. spiralis* obtenida en el fago λ ZAPII. Las clonas obtenidas de este tamizaje se amplificaron por PCR utilizando los iniciadores T3 y T7 para evaluar la existencia de inserto y determinar el tamaño aproximado de los mismos. De acuerdo al tamaño de los insertos en cada clona, se seleccionaron 5 de ellas, las cuales se denominaron como sigue: T1T2 52 clonas 4, 7, 12, 13 y 17; T1-3 48 clonas 1, 8, 13, 19 y 20; T4-11 clonas 25, 29, 33, 35 y 38 y T1 22 3 clonas 4, 8, 9, 12 y 13. para la selección de insertos (Figura 12).

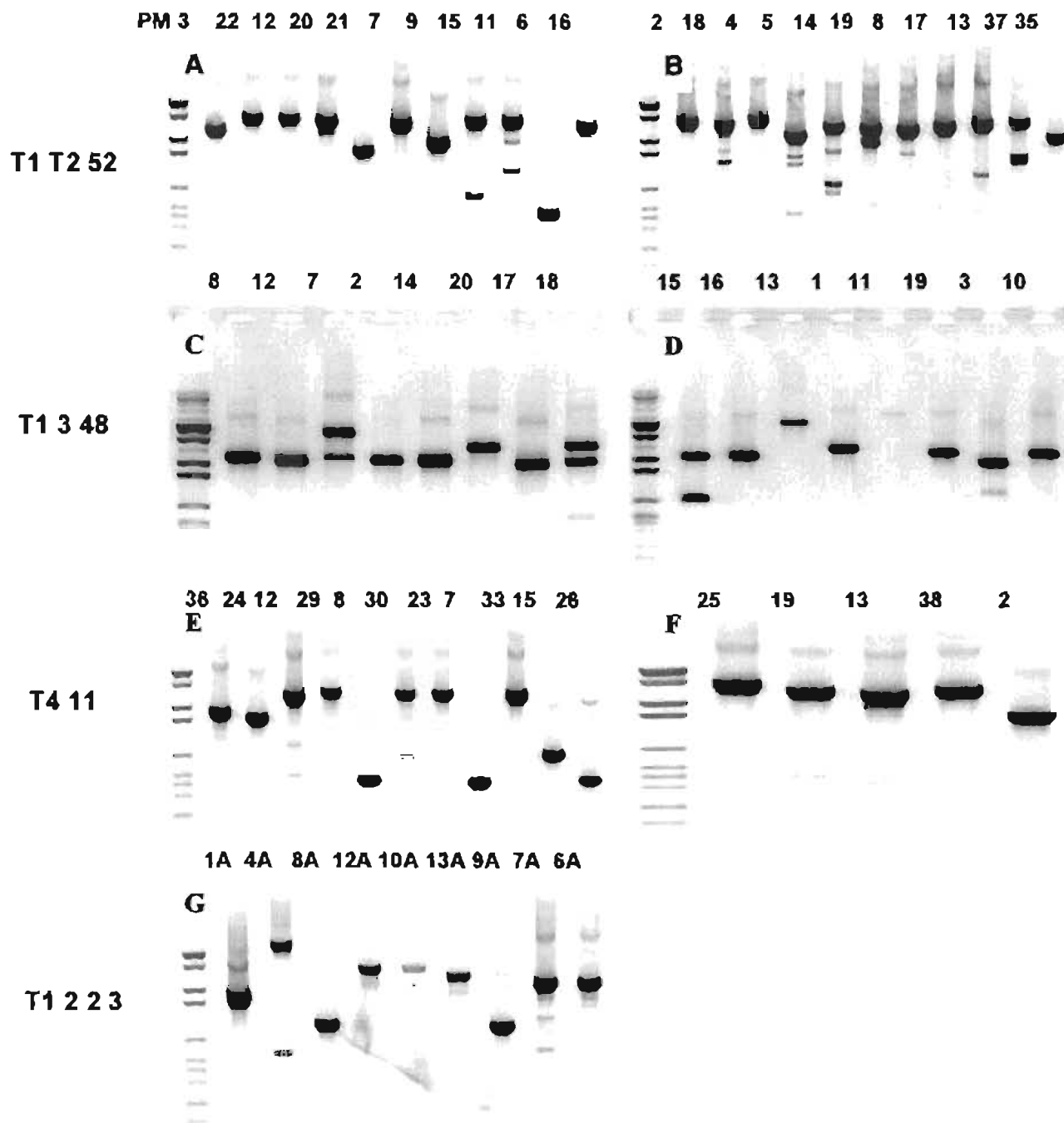


Figura 12. Productos del tamizaje de la biblioteca de adulto en λ ZAPII de *T. spiralis* amplificados por PCR con los iniciadores T3 y T7. En el carril I de cada panel se muestra el marcador de peso molecular. En el panel A y B se muestran las clonas obtenidas de T1T2 52. En el panel C y D se muestran las clonas obtenidas de T1 3 48. En el panel E y F se muestran las clonas obtenidas de T4-11. En el panel G se muestran las clonas obtenidas de T1 2 2 3.

6.9 Análisis de restricción de los insertos obtenidos de la clona T1T2-52

La clona T1T2 52 se seleccionó para su evaluación posterior debido a la presencia de el motivo de dedos de Zinc dentro de su secuencia. A este respecto se analizaron las 5 clonas derivadas del tamizaje con la sonda T1T2 52, a las cuales se les realizó la separación del plásmido y posteriormente se digirieron enzimáticamente con *Eco* RI para separar los insertos del plásmido pBluescript. En la electroforesis mediante geles de agarosa al 1% se detectaron insertos con tamaños de 1.6, 1.4, 1.7, 1.2 y 1.2 Kb correspondientes a las clonas T1T2-52-4, 52-7, 52-12, 52-13 y 52-17. Los insertos de T1T2 52 12 y T1T2 52 4 mostraron el mismo tamaño durante su corrimiento electroforético, así como un sitio de restricción intermedio aproximadamente a 600 bases, por lo que se determinó que la clona era la misma.

Posteriormente, los insertos de las clonas mencionadas se secuenciaron y sus secuencias se alinearon utilizando el programa CRUSTAL (ExPASy). Los fragmentos correspondientes a las clonas T1T2-52-4 y 52-17 se acoplaron en sentido 5'- 3' a la sonda original (Figura 13). En el caso de los insertos T1T2 52 12 y T1T2 5213 no se presentó alineación de sus secuencias con la secuencia de la sonda original (T1T2 52).



Figura 13. Esquema que muestra el tamaño y posición de las secuencias de las clonas derivadas de la T1T2 52

De acuerdo a su tamaño, se seleccionó a la clona T1T2 52 4 para los análisis posteriores y se precisó en ella un marco de lectura abierto de 1329 bases hasta encontrar un codón de paro TGA (en negritas) (Figura 14).

```

1  ttcattttca tttgcttcgc tctttttctg ctgcttctgt tcgaaaacgt ggaaatagca
61  gcattgatgg ataagaaccg tttgactgaa actgattttc caatcgacta cagtctaccc
121 ggtaccagtg gtttgtcgaa caaacctcgc aacaataatg ctttgactgg cgcaaaccgtt
181 gaaagaagag cgcattcatt ctctgtatcc ggtttgcggg caccagatga atcctccttc
241 ggcaggagaa gttttacaat cagcgaatat acggccgatc aggttatgga agctctcaga
301 agatatggga atcttttggg acaatctttc ctgcagtatg gaagccatcc gatggctgat
361 gaagaactgc tttatcatca agttagtgag cttacctctc ctgatcgcaa tccgctggca
421 tttgctgatg ctagcaccgc aatttttaca aaccacctgc agtcagcgta cagcagtatg
.481 gaaggtggaa catccgcttc gtctgtgaat gatgtacgga attcagaagc cgattctggt
541 actcctgatt catctgcacg gtggatagaa ctgcgttctg taaaacaagc aacagcacia
.601 ggggagacia gttccactaa taccagttagc aatacagtca acgataacag cgctgatttt
661 cctctgttga ctcggtttca agatgtccgt tgtatggttt gtggtgattg cgcccacggt
721 tttcattacg gcgtagttac ttgcgaaggt tgcaaagggt tttttcgaag aacggtgcaa
781 cgcaaccttc gatattcttg tcacaaatct tcccgggtgtg aaattaaccg ccagaccaga
.841 aaccggtgtc aggcattgccg ataccaacia tgccttgatg ttggcatgtc acctatgatg
.901 gtgcgaattg accaacgtcg aaagggcact cccaattta acgtagagga tgacagtttg
.961 gcaatttcaa aaatgcagaa cctgctcaac tctattggcg atgctttcga cacgctgatc
1021 agttccgcca acgacaacga caatgacact gccacgcaat cccagtgttt caatgcattc
1081 accagtgttc taccggagt ttcaaagcta gatccggttg atcaagaaat tttacagcac
1141 gactctatgg aagagattca aacttttagtg aaagcctatt tgttgatcga taaagacact
1201 tcgacgatag gaatgactga tctggacagt gttctactga aggtgaaagc agaaatggag
1261 gagcttgcaa gtgcaaccia tggaaagtggc tttggtgtgc tgtatttgtt tttattctcc
1321 aatacgtga

```

Figura 14. Secuencia sentido con marco de lectura abierto de la clona T1T2-52-4

Para la traducción de la secuencia de bases hacia aminoácidos (a.a) se utilizó el programa Translate Tool (ExpASY) y se determinó un total de 466 a.a. (Figura 15) con un porcentaje alto de serinas y treoninas (10.7 y 9% respectivamente).

Posteriormente la secuencia de a.a. se alineó a las secuencias de proteínas reportadas en el Gene Bank mediante el programa de computación SIS BLAST 2 software of network service (ExpASY-NCBI).

Durante este análisis se identificaron en la secuencia 2 motivos de dedos de Zinc “ZINCFINGER” (gatagaactgog) que la ubican dentro de la familia de los receptores

nucleares con un porcentaje de identidad en el rango de 32 a 62% (Figura 16). En este sentido, los porcentajes más altos (62%) de identidad se observaron con receptores nucleares del organismo *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, una identidad significativa se observó también hacia receptores nucleares de otros orígenes. Por otro lado, en el análisis de “predicción de localización celular” realizada mediante el programa PSORT WWW server la ubicación de la secuencia de a.a. en eucariontes se define como probablemente a nivel de membrana en .68/1 de probabilidad (Figura 16).

```

      1      11      21      31      41      51
      |      |      |      |      |      |
1  FIFICFALFL LLLFENVEIA ALMETDKNRL TETDFPIDYS LPGTSGLSNK PSNNNALTGA 60
61 NVERRAHSFS VSGLRAPDES SFGRRSFTIS EYTADQVMET EALRRYGNLL GQSFLQYGS 120
121 PMETADEELL YHQVSELTSP DRNPLAFAYA STRIFTNHLQ SAYSSMETEG GTSASSVNDV 180
181 RNSEADSVTP DSSARWIELR SVKQATAQGE TSSTNTSSNT VNDNSADFPL LTRFQDVRCM 240
241 ETVCGDCAHG FHYGVVTCES CKGFFRRTVQ RNLRYSCHKS SRCEINRQTR NRCQACRYQQ 300
301 CLDVGMEATSP METMETVRID QRRKGTPOFN VEDDSLAIK METQNLLNSI GDAFDLTISS 360
361 ANDNDNDTAT QSQCFNAFTS ALPEFSKLDP VDQEILQHDS METEEIQTLV KAYLLIDKDT 420
421 STIGMETTDL DSVLLKVKAE METEELASAT NGSGFVVLYL FLFSNR

```

Composición de aminoácidos:

Ala (A)	32	6.9%	Gln (Q)	21	4.5%	Leu (L)	42	9.0%
Glu (E)	36	7.7%	Arg (R)	28	6.0%	Lys (K)	12	2.6%
Gly (G)	22	4.7%	Asn (N)	28	6.0%	Met (M)	12	2.6%
His (H)	8	1.7%	Asp (D)	30	6.4%	Phe (F)	25	5.4%
Ile (I)	16	3.4%	Cys (C)	12	2.6%	Pro (P)	13	2.8%
Ser (S)	50	10.7%	Asx (B)	0	0.0%			
Thr (T)	42	9.0%	Glx (Z)	0	0.0%			
Trp (W)	1	0.2%	Xaa (X)	0	0.0%			
Tyr (Y)	12	2.6%	Val (V)	24	5.2%			

Figura 15. Secuencia y proporción de aminoácidos del fragmento T1T2 52 4 de *T. spiralis*.

```

plasma membrane          --- Certainty= 0.605 (Affirmative)
endoplasmic reticulum (membrane) --- Certainty= 0.640 (Affirmative)
Golgi body                --- Certainty= 0.370 (Affirmative)
endoplasmic reticulum (lumen) --- Certainty= 0.100 (Affirmative)

```

Figura 16. Predicción de la localización de la proteína T1T2 52 4 según el programa PSORT WWW server.

No. acceso (Gene Bank)	NOMBRE DE LA PROTEÍNA	ORÍGEN	% (IDEN)
Q9XXU7	CAEEL SEX-1 [sex-1]	<i>Caenorhabditis elegans</i>	62
Q9U3F1	CAEEL Hypothetical protein F44A6.2b [sex-1]	<i>Caenorhabditis elegans</i>	62
P41830	CNR14_CAEEL Steroid hormone receptor family member	<i>Caenorhabditis elegans</i>	62
Q9GTC3	CAEEL Sex-1 (Fragment)	<i>Caenorhabditis elegans</i>	62
Q91812	AMBME Retinoic acid receptor gamma 2l [NR1B3c]	<i>Ambystoma mexicanum (Axolotl)</i>	59
Q611B9	CAEBR Hypothetical protein CBG17178 [CBG17178]	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	58
P11416	RRA_MOUSE Retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha)	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	58
P11416-2	Splice isoform Alpha-2 of P11416	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	58
Q91391	BRARE Retinoic acid receptor alpha [rara2a]	<i>Brachydanio rerio (Zebrafish) (Danio rerio)</i>	58
Q90272	BRARE Retinoic acid receptor alpha-2.B [rara2b]	<i>Brachydanio rerio (Zebrafish) (Danio rerio)</i>	58
Q90271	BRARE Retinoic acid receptor alpha-2.A [rara2a]	<i>Brachydanio rerio (Zebrafish) (Danio rerio)</i>	58
Q9W5Z3	RRA_FUGRU Retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha)	<i>Fugu rubripes (Japanese pufferfish) (Takifugu rubripes)</i>	58
Q9W5Z3-2	Splice isoform Alpha-2 of Q9W5Z3 [RARA]	<i>Fugu rubripes (Japanese pufferfish) (Takifugu rubripes)</i>	58
P10276	RRA_HUMAN Retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha)	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
P13631	RRG1_HUMAN Retinoic acid receptor gamma-1 (RAR-gamma-1)	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
P22932	RRG2_HUMAN Retinoic acid receptor gamma-2 (RAR-gamma-2)	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
Q6P2H5	HUMAN Hypothetical protein	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
Q5U645	HUMAN RARB protein [RARB]	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
Q6IN48	HUMAN RARG protein (Fragment) [RARG]	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
P10826	RRB_HUMAN Retinoic acid receptor beta (RAR-beta)	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
Q6S8K5	HUMAN Hypothetical protein DKFZp761C0417 (DKFZp761C041)	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
Q9UJ38	HUMAN Retinoic acid receptor (Fragment) [RARG]	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
Q15156	HUMAN PML-RAR protein [PML-RAR]	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
P10276-2	Splice isoform Alpha-2 of P10276 [RARA]	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
P10826-2	Splice isoform Beta-2 of P10826 [RARB]	<i>Homo sapiens (Human)</i>	57
P22605-2	Splice isoform Beta-1 of P22605 [Rarb]	<i>Mus musculus (Mouse)</i>	57

Figura 17. Identidad de la secuencia T1T2 52 4 con secuencias de proteínas del Gene Bank según el programa de computación SIS BLAST 2 software of network service (ExPaSy-NCBI). Se muestra el nombre de las proteínas, su origen y los porcentajes de identidad más relevantes.

6.10 EXPRESIÓN DE CLONAS DE LA FASE ADULTA DE *Trichinella spiralis*

La clona TIT2 52 4 se seleccionó para clonarse en un vector de expresión de proteínas. Para este propósito, TIT2 52 4 se amplificó por PCR utilizando los iniciadores diseñados para ello. El producto de PCR obtenido (Figura 18) se purificó mediante el protocolo Gene clean y digirió con las enzimas *Xba* I y *Bam* HI para su ligación a los vectores de expresión pnr-LTBsp H-6 (pFRAS) ó al pnr-LTBsp (NANP)₄ previamente defosforilados (Figura 19 y 20).

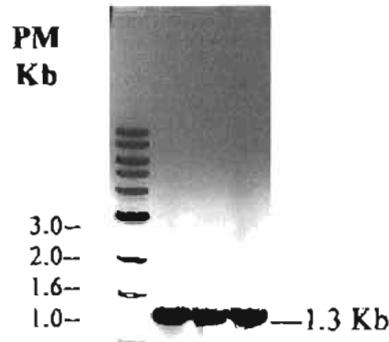


Figura 18. Electroforesis en agarosa al 1% del producto de PCR de la clona TIT2-52-4.

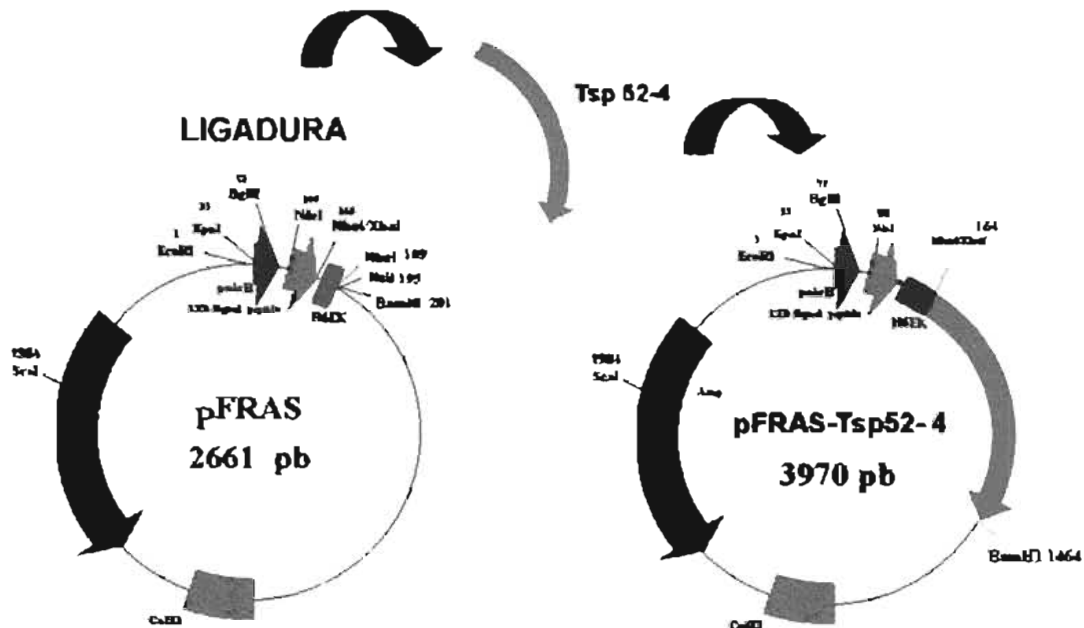


Figura 19. Esquema en el que se representa la ligadura del fragmento TIT2-52-4 al plásmido de expresión pFRAS.

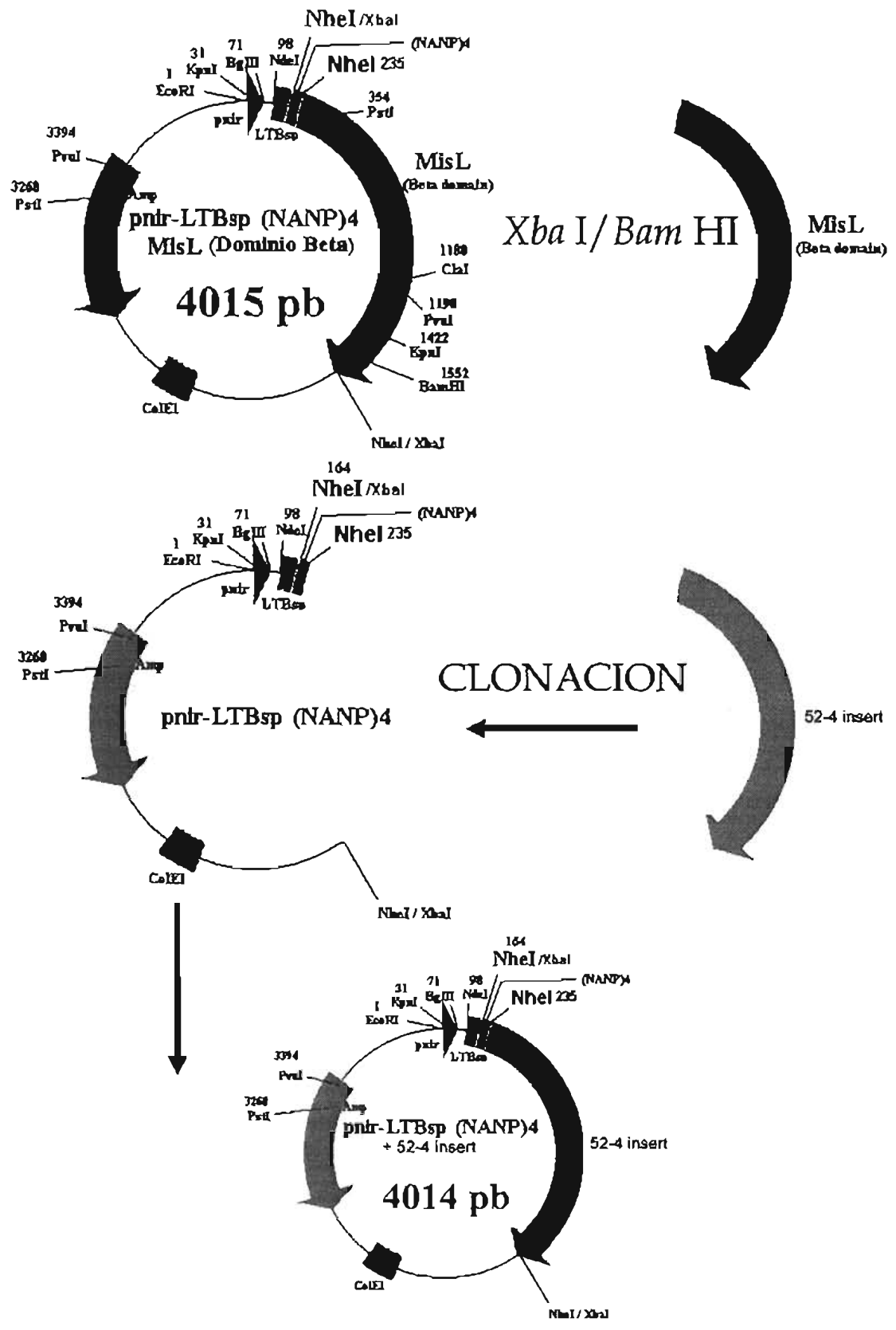


Figura 20. Esquema en el que se representa la clonación del fragmento T1T2-52-4 al plásmido de expresión pnr-LTBsp (NANP)₄.

Después de llevar a cabo las reacciones de ligación para cada plásmido de expresión se transformaron en células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α . Posteriormente se realizó la separación del plásmido de cada clona bacteriana transformada y se evaluaron los plásmidos por medio de electroforesis en geles de agarosa, revelando un 80 % de eficiencia en la transformación (Figura 21).

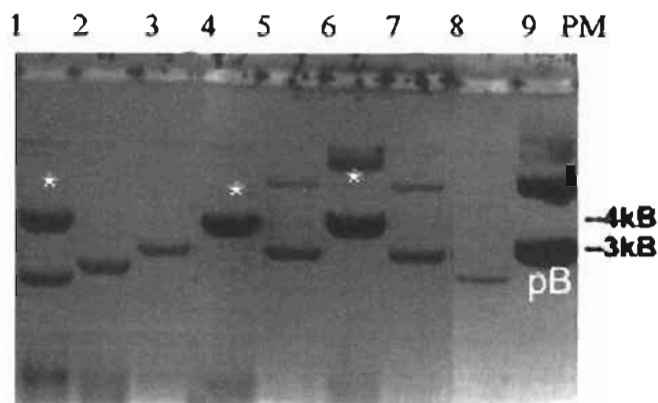


Figura 21. Evaluación del plásmido pFRAS unido al inserto T1T2-52-4 por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las clonas seleccionadas (*) se indujeron posteriormente para su expresión. El carril 9 muestra el corrimiento de pBluescript como control (pB).

Se seleccionaron clonas por cada tipo de plásmido de expresión y cada clona se creció en condiciones anaeróbicas para inducir su expresión. Posteriormente el extracto total de cada clona inducida se separó en un gel de poliacrilamida al 12% y posteriormente se transfirió a membranas de nitrocelulosa para su evaluación por Western Blot. En la prueba de inmunoelectrotransferencia se detectó la proteína recombinante expresada en una banda de aproximadamente 53 kDa utilizando el anticuerpo anti-NANP₄ ó bien el anticuerpo anti- H-6 que corresponde a la predicción de tamaño post-traduccion obtenida mediante el programa de computación ExPASy (Figura 22 y 23).



Figura 22 Análisis por Western blot de la proteína de fusión TIT2 52-4 expresada en el plásmido pnr-LTBsp (NANP)₄ empleando el anticuerpo anti-NANP₄. Los carriles 1 y 2 corresponden al reconocimiento de la proteína ShdA expresada en el plásmido pnr-LTBsp (NANP)₄ utilizada como control positivo. Los carriles 3, 4, 5 y 6 muestran el reconocimiento de 4 clonas con expresión positiva de la proteína TIT2 52-4 clonada al pnr-LTBsp (NANP)₄. En el carril 7 se utilizó un control negativo del plásmido pnr-LTBsp (NANP)₄ sin bandera.



Figura 23. Análisis por Western blot de la expresión de la proteína TIT2-52-4 en el vector pFRAS mediante el anticuerpo anti-H-6. Los carriles 1 y 2 muestran dos clonas con expresión positiva de la proteína TIT2 52-4 en el pFRAS. Los carriles 3 y 4 muestran la expresión de la proteína CSP utilizada como control positivo. El carril 5 muestra un control negativo del plásmido pFRAS sin bandera H-6.

VII. DISCUSIÓN

Existen tres estadios antigénicos (Adulto, LM y LRN) en las distintas etapas del ciclo biológico de *T. spiralis* cuyos diferentes epítomos inmunodominantes activan respuestas inmunes tanto a nivel intestinal como sistémico (Gamble, 1985^a; Marti, Murrel, Gamble, 1987; Ortega-Pierres y cols., 1984). De acuerdo a los estudios sobre la inmunidad desarrollada por el huésped hacia este parásito, se ha demostrado, que el mecanismo de defensa más importante contra la infección por *T. spiralis* es la expulsión del parásito adulto a nivel intestinal (Bell y cols., 1979). Durante este proceso se induce una respuesta inmune adquirida y de memoria según lo demostrado en animales infectados donde se desarrolla una respuesta que previene la reinfección. En esta respuesta se inhibe el establecimiento de los parásitos y se reduce la sobrevivencia de los mismos (Miller, 1984) por lo que existe un gran interés en identificar los antígenos que participan en este proceso de expulsión.

Existen muchos estudios relacionados a la identificación de antígenos de la LM y de la inducción de la respuesta inmune que generan a nivel sistémico (Kehayov y cols., 1991; Ortega-Pierres y cols., 1984, 1997). Por otro lado, poco se sabe con respecto a los antígenos del estadio adulto que inducen una respuesta inmune a nivel intestinal.

Durante la fase intestinal los antígenos del estadio adulto tienen la característica de ser expresados y liberados en un periodo muy corto del desarrollo del parásito, ya sea en la mucosa o en la lámina propia del intestino. Esto se debe a que durante los 3 primeros días p.i. ocurre una transformación de las larvas musculares hacia pre-adultos y adultos maduros con capacidad de liberar LRN hacia el torrente sanguíneo o a la linfa.

En diversos estudios, se ha propuesto que los antígenos que se expresan en el estadio adulto pueden estar participando en la transformación biológica del parásito, o bien, que algunos se relacionan con el establecimiento de las hembras gestantes en la mucosa del intestino para permitir la liberación de las LRN (Mitrevva y cols., 2004). Por esta razón, existe un gran interés en identificar antígenos específicos de esta fase del parásito y posteriormente evaluar su papel en el establecimiento de una respuesta inmune protectora. De esta manera, los antígenos estadio específicos de la fase adulta de *T. spiralis* podrían ser utilizados en el desarrollo de vacunas como una alternativa para el control de la trichinellosis.

La purificación de antígenos estadio específicos requiere del diseño de estrategias que permitan aislar solo unos cuantos componentes de una mezcla muy compleja de antígenos que

presenta el parásito. En este sentido se seleccionó el método de hibridación sustractiva, ya que permite obtener transcritos de baja abundancia o raros en dos poblaciones de ARNm que tienen secuencias que se expresan diferencialmente en una población pero no en la otra (Diatchenko y cols., 1996).

De acuerdo a los objetivos planteados en este trabajo se procedió inicialmente a identificar a aquellos antígenos que se expresaran específicamente en el estadio adulto comparando con los de la LM de *T. spiralis*.

Dentro de la estrategia de hibridación sustractiva se incluyó la utilización de la PCR para enriquecer las secuencias del estadio adulto expresadas diferencialmente y posteriormente se realizó un tamizaje diferencial de las clonas obtenidas antes de su evaluación individual. El tamizaje diferencial se realizó para disminuir los falsos positivos (fondo) dentro de las bibliotecas. En consecuencia, de 1928 clonas obtenidas aleatoriamente en el tamizaje inicial, se redujo a 124 clonas puras estadio específicas del adulto.

Por otro lado se determinó el porcentaje de genes estadio específicos de la fase adulta y la LRN el cual fue de 1.43 % y 0.6 % respectivamente, lo que explica el bajo número de clonas identificadas por hibridación sustractiva.

Las 124 clonas obtenidas por hibridación sustractiva conforman una biblioteca de clonas individuales estadio específicas de la fase adulta de *T. spiralis* que pueden ser analizadas paulatinamente identificando su secuencia y posteriormente determinando las proteínas que expresan.

En este trabajo se seleccionó de la biblioteca sustractiva en particular a la clona T1T2 52 con un tamaño inicial de aproximadamente 400 bases, la cual se utilizó como sonda para el tamizaje de una biblioteca de ADNc la fase adulta de *T. spiralis* en el vector λ ZAPII con la finalidad de obtener una secuencia de mayor tamaño o bien de identificar el gen completo. De esta manera se identificó a la clona T1T2 52 4 con una secuencia en marco de lectura abierto de 1329 pares de bases, misma que se seleccionó para su expresión en los vectores pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) ó al pnir-LTBsp (NANP)₄.

De acuerdo a la alineación realizada con el programa de computación SIS BLAST 2 software of network service (ExPaSy-NCBI) de la secuencia T1T2-52-4 no se observó homología con ningún antígeno de *T. spiralis* publicado hasta ahora en el banco de genes (GenBank). El porcentaje de guaninas-citocinas (GC) contenidas en esta secuencia es del 42% y es similar al obtenido por otras proteínas de este género (Su y cols., 1990; Sugane y Matsuura., 1990 y

Vayssier y cols., (1999). Sin embargo el porcentaje de GC es alto comparado con otras proteínas de nemátodos que están alrededor del 35% según lo demostrado por Hammond y Bianco en 1999.

En el análisis BLAST, se encontró un porcentaje de identidad en el rango del 32 al 62% entre la proteína T1T2-52-4 comparada con proteínas asociadas a receptores nucleares de tipo hormonal. Estos receptores funcionan como factores de transcripción que se activan tras la unión a su ligando y que regulan la expresión de genes que interactúan con secuencias específicas de ADN. En vertebrados, estas proteínas regulan diversos procesos biológicos tales como patrones de crecimiento, diferenciación celular y homeostasis (Lloyd y Osamura, 1997). En el caso de la secuencia T1T2-52-4 se presentan dos motivos de dedos de Zinc ubicados a 228 y a 234 bases (ZnF C4 y ZnF NFX) que se reconocen como factores de transcripción en nemátodos y mamíferos (Gronemeyer y Laudet, 1995). Durante la alineación de esta proteína con receptores nucleares del nemátodo *Caenorhabditis elegans* se encontró una identidad del 62%, así como una identidad del 58% con receptores nucleares de ratón (Danielsen y cols., 1989).

En el estudio de los receptores nucleares en parásitos se sabe que más del 3% de las secuencias de proteínas inferidas en el genoma del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, contienen secuencias motivo caracterizadas por dedos de Zinc y a su vez el 50% de estas, son secuencias específicas de unión a ADN. Se ha sugerido que los receptores unidos a ADN se involucran tanto en la asimetría del blastómero (Levitan y cols., 1994) como en el desarrollo de neuronas (Hughes y col., 2002). Debido a que la secuencia T1T2-52-4 se obtiene de una fase temprana de desarrollo del estadio adulto (día 3 post-infección) se sugiere que la proteína puede participar en la embriogénesis de *Trichinella*.

Por este motivo, si la proteína derivada de la secuencia T1T2-52-4 fuera una proteína receptora de unión al ADN de la larva adulta de *T. spiralis*, esta podría estar relacionada en la activación o inactivación de los genes responsables del fenotipo del parásito, lo que significaría un hallazgo importante dentro de la biología del parásito.

De acuerdo al análisis de hidrofobicidad y movilidad de varios segmentos de la secuencia de aminoácidos del fragmento T1T2-52-4, se reveló la presencia de algunos posibles determinantes antigénicos (Hopp and Woods, 1983). Estos sitios antigénicos se localizaron en los aminoácidos APDESSFGRRSFT, ELNTSPDRNP, SMEGGTSASSVNDVRNSEADSVTPDSS, CEGCKGFFRRTVQRNLNYSCHKSSRCEINRQTRTR, entre las bases 52 - 64, 108 - 116, 137 - 163 y 226 - 260 respectivamente. Sin embargo, debido al porcentaje de identidad que posee la

secuencia con proteínas de la familia de los receptores nucleares, la importancia en la inducción de la inmunidad hacia este parásito debe mantenerse en reserva.

En otro contexto, la secuencia T1T2-52-4 se seleccionó como candidata para su clonación en un vector de expresión procarionte. Para ello se utilizaron los vectores pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) ó pnir-LTBsp (NANP)₄ y se observaron diferencias en el reconocimiento de la proteína expresada (aproximadamente 53 kD) por los anticuerpos definidos para cada bandera (Histidinas y NANP₄).

Ambos vectores de expresión poseen el promotor *nir*, el cual se ha utilizado ampliamente en la expresión de genes heterólogos en *Escherichia coli* demostrando amplios niveles de expresión en las proteínas evaluadas con este sistema (Oxer y cols., 1991). Este promotor se induce bajo condiciones anaeróbicas lo cual permite la expresión de la proteína recombinante *in vivo* cuando la bacteria encuentra un ambiente microaerófilico, ya sea, si se deposita en el intestino o si es fagocitada por macrófagos y encuentra un medio ácido en el fagolisosoma. La ventaja de la utilización del promotor *nirB* en los plásmidos pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) ó pnir-LTBsp (NANP)₄ empleados para la clonación de T1T2-52-4 podría permitir la evaluación de la proteína recombinante en ensayos de inducción *in vivo* de la respuesta inmune en mucosas (Chatfield y cols., 1992; Newton y cols., 1995).

Otra característica de pnir-LTBsp H-6 (pFRAS) ó pnir-LTBsp (NANP)₄ es que ambos poseen la secuencia señal de la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de *E. coli* ETEC para dirigir la traslocación de la proteína recombinante al periplasma bacteriano de una manera *sec*-dependiente. Este fenómeno, permite observar la sobre expresión de la proteína clonada en los análisis de proteínas de periplasma (Smerdou y cols., 1996). Durante este trabajo, solo se utilizaron extractos totales para la identificación de la proteína de expresión por Western blot. Sin embargo, la observación de la proteína recombinante en extractos del periplasma puede facilitarse sin necesidad de la utilización de anticuerpos. Por otro lado, la sobre expresión permite delimitar y recuperar la proteína en gel, lo que resultaría una alternativa para inmunizar animales de laboratorio directamente con la banda obtenida.

Como se mencionó anteriormente en la identificación de la proteína recombinante se utilizaron dos plásmidos con diferentes banderas para su reconocimiento. La bandera (NANP)₄ del pnir-LTBsp, constituye un péptido antigénico con 4 repetidos del tetrapéptido NANP, la cual se empleó como control en la detección de la proteína recombinante T1T2 52 4, sin embargo no ofrece alguna alternativa para la purificación de dicha proteína. Por otro lado, la bandera H-6 del

vector pnir-LTBsp H-6 (pFRAS), permite la detección de la proteína recombinante mediante anticuerpos anti-H-6, así como su purificación mediante columnas de afinidad.

En este trabajo, la proteína recombinante T1T2 52 4 se detectó fácilmente tras la utilización de anticuerpos anti-NANP₄, pero la detección de la proteína fue baja cuando se utilizaron los anticuerpos anti-H6 para la bandera de histidinas. Existen descripciones de bajo reconocimiento dependientes de la conformación de la proteína expresada. En este sentido se propone la utilización de otras variantes de anticuerpos anti-His para una detección más eficiente. A pesar del bajo reconocimiento con anticuerpos anti-H6, en la obtención de la proteína en grandes cantidades y con la debida pureza se sugiere la purificación mediante el uso de columnas de níquel (cromatografía de afinidad).

El trabajo de clonación y expresión de la secuencia T1T2 52 4 reveló una proteína de aproximadamente 53 kDa, la cual debido a su identidad con proteínas de la familia de los receptores nucleares podrá evaluarse como participante dentro del desarrollo biológico de *T. spiralis*. Sin embargo, la posible inducción de una respuesta inmune a nivel intestinal deberá ser evaluada.

En la identificación de antígenos específicos de la fase adulta de *T. spiralis*, se han logrado definir algunos de ellos. Recientemente Yang y cols., en el 2001 describieron un gen estadio específico de adulto de *T. spiralis* con una secuencia de 487 aminoácidos en el que se encontraron dos motivos de zinc entre el aminoácido 207 y 270. El mismo grupo en el 2003 describió un gen obtenido de larvas adultas de *T. spiralis*, obtenidas al día 5 p.i., que codifica un polipéptido de 343 aminoácidos. Por otro lado, Zhu y cols. (2003) reportaron la expresión de una proteína de 40 kDa específica del estadio adulto, en un sistema de procariontes. Sin embargo, las características específicas y el papel que juegan estos componentes en la relación huésped-parásito requiere de mayores estudios.

En este trabajo se desarrolló una biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* en la que se identificaron 124 clonas estadio específicas. La evaluación de cada una de estas clonas específicas del adulto permitirá identificar a las proteínas que se expresan durante esta fase del parásito. Así mismo, se podrá determinar el posible papel de estos componentes en la inducción de la respuesta inmune intestinal hacia el parásito y permitira identificar los componentes antigénicos específicos del adulto con potencial inmunógeno a nivel intestinal que podrían utilizarse en el desarrollo de vacunas.

Con el material de que se dispone es posible realizar un estudio detallado de las proteínas estadio específicas del adulto y del papel que desempeñan en el desarrollo de esta fase del parásito a nivel intestinal. En este contexto el método de hibridación sustractiva demostró ser adecuado en la identificación de las mismas y permite contar con un material importante en la caracterización del ciclo biológico de *T. spiralis*.

VIII. CONCLUSIONES

- La técnica de hibridación sustractiva demostró ser un método adecuado para la obtención de clonas específicas de la fase adulta de *Trichinella spiralis* de la cepa N2/HN.
- La evaluación de la reactividad de las clonas durante los pasos de hibridación y el análisis por computadora mediante PC gene permitió seleccionar 4 clonas con su marco de lectura abierto (ORF).
- La proteína estadio específica de la fase adulta de *T. spiralis* derivada de la clona T1T2-52-4 seleccionada durante este trabajo presentó un motivo de dedos de Zinc que le confiere características de un posible receptor nuclear con actividades reguladoras durante el desarrollo de *T. spiralis*.
- El vector de expresión pFRAS utilizado durante este trabajo permite la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína de 53 kDa derivada de la secuencia T1T2-52-4 de *T. spiralis* clonada a este plásmido.

IX. PERSPECTIVAS

- Se cuenta actualmente con las clonas estadio específicas de la biblioteca de la fase adulta de *T. spiralis* que pueden ser empleadas para identificar antígenos de esta fase y estudiar su papel en la relación huésped-parásito.
- Se podrá determinar el papel de la proteína de 53 kDa en el desarrollo del parásito o bien su interacción en modelos para la estimulación del sistema inmune a nivel intestinal.
- La identificación de inmunógenos en la biblioteca sustractiva de la fase adulta de *T. spiralis* que pudieran ser utilizados en el diagnóstico o bien en el desarrollo de vacunas se podrá realizar utilizando anticuerpos obtenidos a partir de explantes de intestino de animales infectados con el parásito.

X. REFERENCIAS

- Abraham, S. N. and Malaviya, R. (1997). Minireview: Mast cells in infection and immunity. *Infection and Immunity*. **65**: 3501-3508.
- Ahmad, A.; Wang, C. H. and Bell, R. G. (1991). Arole for IgE in intestinal immunity. Expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *Journal of Immunology*. **146**: 3563.
- Alcántara, P.P.A.; De la Rosa, A.J.L. and Correa, B.M.D. (1992). Trichinellosis: Una parasitosis fuera de serie. Ed. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicos (INDRE), México. **16**: 1-56.
- Alizadeh, H. and Murrell, K. D. (1984). The intestinal mast cell response to *Trichinella spiralis* infection in mast cell deficient W/W^v mice. *Journal of Parasitology*. **70**: 767.
- Appleton, J. A.; Schain, L. R. and Mc Gregor, D. D. (1988). Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunology*. **65**(3): 487-492.
- Appleton, J.A.; Bell, R.G.; Homan, W. and van Kanapen, F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today*. **7** (8): 190-192.
- Appleton, J. A. and Romaris, F. (2001). A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Veterinary Parasitology*. **101**(3-4): 249-260.
- Arasu, P.; Ellis, L.A.; Iglesias, R.; Ubeira, F. M. and Appleton, J. A. (1994). Molecular analysis of antigens targeted by protective antibodies in rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. *Molecular Biochemical Parasitology*. **65**(2):201-211.

Arizmendi, N.; Yépez-Mulia, L.; Cedillo-Rivera, R.; Ortega-Pierres, M.G.; Muñoz, O.; Befus, D. and Enciso-Moreno, J.A. (2001). Interleukin mRNA changes in mast cells stimulated by TSL-1 antigens. *Parasite*. **8**: S114-S116.

Arriaga, C.; Muñiz, E.; Morilla, A. and Ortega-Pierres, M.G. (1989). *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Experimental Parasitology*. **69**: 363-372.

Arriaga, C.; Yépez-Mulia, L.; Viveros, N.; Adame, L.A.; Zarlenga, D.; Lichtenfels, R.; Benítez, E. and Ortega-Pierres, M.G. (1995). Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *Journal of Parasitology*. **81** (5):781-783.

Arriaga-Diaz, C.; Yépez-Mulia, L. y Ortega-Pierres, M.G. (1996). Updates on equine trichinellosis. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **38**(2):139-150.

Bell, R. G.; Mc Gregor, D.D. and Despommier, D.D. (1979). *Trichinella spiralis*: Mediation of the intestinal component of protective immunity in the rat by multiple phase-specific anti-parasite responses. *Experimental Parasitology*. **47**: 140-146.

Bell, R.G. (1998). The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Advances in Parasitology*. **41**: 149-217.

Bienenstock, J.; Ernst, P.B. and Underdown, B.J. (1987). The gastrointestinal tract as an immunologic organ; state of the art. *Annals of Allergy*. **59** Part II: 17-20.

Blancou, J. (2001). History of Trichinellosis surveillance. *Parasite*. **8**: S16-S19.

Brandtzaeg, P. (1985). Research in gastrointestinal immunology. State of the art. *Scand J. Gastroenterology Supplement*. **114**:137-156.

Capo, V. and Despommier, D. D. (1996). Clinical aspects of infection with *Trichinella* sp. *Clinical Microbiology Reviews*. **9** (1):47-54.

Chatfield, S. N.; Charles, I. G.; Makoff, A. J.; Oxeer, M. D.; Dougan, G.; Pickard, D.; Slater, D. and Fairweather, N. F. (1992). Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in Salmonella oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology (N Y)*. **10**(8):888-892.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. **162**, 156-159.

Chung, M. S.; Joo, K. H.; Quan, F. S.; Kwon, H. S. and Cho, S. W. (2001) Efficacy of flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*. **8** (2 Suppl):S195-S198.

Danielsen, M.; Hinck, L. and Ringold, G. M. (1989). Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell*. **57**(7):1131-1138.

Denkers, E. Y.; Hayes, C. E. and Wassom, D. L. (1991). *Trichinella spiralis*: influence of an immunodominant, carbohydrate-associated determinant on the host antibody response repertoire. *Experimental Parasitology*. **72**(4):403-410.

De la Rosa, J.L.; Aranda, J. G.; Padilla, E. and Correa, D. (1998). Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. *International Journal of Parasitology*. **28** (2): 317-321.

Dea-Ayuela, M.A.; Romarís, F.; Ubeira, F.M.; Rama-Iñiguez, S.; Martínez-Fernández, A.R. and Bolas, F. (2001). Possible presence of common tyvelose- containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embryonated eggs of several nematodes. *Parasite*. **8**. S120-S122.

Dennis, D.T.; Despommier, D.D. and Davis, N. (1970). Infectivity of the new born larvae of *Trichinella spiralis* in the rat. *Journal of Parasitology*. **56**: 974.

Despommier, D.D.; Campbell, W. C.; y Blair, L. S. (1977). The *in vivo* and *in vitro* analysis of immunity to *Trichinella spiralis* in mice and rats. *Parasitology*. **74**: 109-119.

Despommier, D.D. (1990). *Trichinella spiralis*: The worm that would be virus. *Parasitology Today*. **6** (6): 193-196.

Despommier, D.D. (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *Journal of Parasitology*. **79** (4): 472-482.

Diatchenko, L.; Lau, Y. F.; Campbell, A. P.; Chenchik, A.; Moqadam, F.; Huang, B.; Lukyanov, S. ; Lukyanov, K. ; Gurskaya, N. ; Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. **93**(12):6025-6030.

Dick, T. A. ; Lu, M. ; de Vos, T. and Ma, K. (1992). The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of *Trichinella*. *Journal of Parasitology*. **78** (1): 145-148.

Dunn, I. J. and Wright, K. A. (1985). Cell injury caused by *Trichinella spiralis* in the mucosal epithelium of B10A mice. *Journal of Parasitology*. **71**(6):757-766.

Dupouy-Camet, J. ; Soulé, C. ; Guillow, J.P. ; Rouer, E. ; Lavareda de Souza, S. ; Ancelle, T. and Benarous, R. (1991). Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitology Research*. **77**: 180-182.

Dupouy-Camet, J.; Soulé, C. and Ancelle, T. (1994). Recent news on trichinellosis: Another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite*. **1**: 99-103.

Gronemeyer, H.; Gustafsson, J.A. and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Natural Review Drugs Discover*. **11**:950-964.

Gamble, H. R.; Anderson, C. E.; Graham, A. R. and Murrel, K. D. (1983). Diagnosis swine of trichinosis by enzyme-linked immunoabsorbent assays (ELISA) using an excretory-secretory antigens. *Veterinary Parasitology*. **13**: 349-361.

- Gamble, H. R. and Graham, C. E. (1984). Comparison of monoclonal antibody-based competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of swine trichinosis. *Veterinary Immunology Immunopathology*. **3-4**:379-389.
- Gamble, H. R. (1998). Sensitivity of artificial digestion and enzyme immunoassay methods of inspection for trichinae in pigs. *Journal of Food Protection*. **61**(3):339-343.
- Gamble, H.R.; Pyburn, D. ; Anderson, L. A. and Miller, L. E. (2001). Verification of good production practices that reduce the risk of exposure of pigs to *Trichinella*. *Parasite*. **8**(2): S233-S235.
- Gurish, M. F.; Bryce, P.J.; Tao, H.; Kisselgof, A. B; Thornton, E. M.; Miller, H. R.; Friend, D. S. and Oettgen, H. C. (2004). IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of Immunology*. **172**(2):1139-1145.
- Hammond, M. P. and Bianco, A. E. (1992). Genes and genomes of parasitic nematodes. *Parasitology Today*. **8**(9):299-305.
- Hirst, S. I. and Stapley, L. A. (2000). Parasitology: The dawn of a new millennium. *Parasitology Today*. **16**: 1: 1-3
- Hopp, T. P. and Woods, K. R. (1983). A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Molecular Immunology*. **20**(4):483-489.
- Hughes, R.A.; Harris, T.; Altmann, E.; McAllister, D.; Vlahos, R.; Robertson, A.; Cushman, M.; Wang, Z. and Stewart, A. G. (2002). 2-Methoxyestradiol and analogs as novel antiproliferative agents: analysis of three-dimensional quantitative structure-activity relationships for DNA synthesis inhibition and estrogen receptor binding. *Molecular Pharmacology*. **61**(5):1053-1069.
- Ishikawa, N.; Wakelin, D. and Mahida, Y. R. (1997). Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*. **113**: 542-549.

- Kehayov, I.R.; Kyurkchiev, S. D.; Tankov, C.V. and Komandarev, S. K. (1991). *Trichinella spiralis*: a 76-kDa excretory/secretory larval antigen identified by a monoclonal antibody. *Experimental Parasitology*. **73**(2):150-160.
- Kioyono, H.; Bienenstock, J.; McGhee, J. R. and Ernst, P.B. (1992). The mucosal immune system: Feature of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Regional Immunology*. **4**. 54-62.
- Kirilova, J.; Thomas, P. and Almers, W. (1993). Two independently regulated secretory pathways in mast cells. *Journal of Physiology*. **87**: 203-208.
- Laemmli, U. K. (1970). Ceavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
- Lawrence, C.E.; Paterson, J. C.; Higgins, L.M.; MacDonald, T.T.; Kennedy, M.W. and Garside, P. (1998). IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology*. **28** (9): 2672-2684.
- Lazarevic, A.M.; Neskovic, A.N.; Goronja, M.; Golubovic, S.; Komic, J.; Bojic, M. and Popovic, A. D. (1999). Low incidence of cardiac abnormalities in treated trichinosis: a prospective study of 62 patients from a single-source outbreak. *American Journal of Medicine*. **107**(1):18-23.
- Levitan, D. J.; Boyd, L.; Mello, C. C.; Kempfues, K. J. and Stinchcomb, D. T. (1994). par-2, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans* encodes zinc-finger and ATP-binding motifs. *Proceedings of the National Academi of Science U S A*. **91**(13):6108-6112.
- Lim, P. L. ; Leung, D.T. ; Chui, Y. L. and Ma, C. H. (1994). Structural analysis of a phosphorylcholine-binding antibody which exhibits a unique carrier specificity for *Trichinella spiralis*. *Molecular Immunology*. **31**(14):1109-1116.
- Love, R.J.; Ogilvie, B.M. and McLaren, D.J. (1976). The immune mechanisms which expels the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. *Immunology*. **30**: 7.

- Lloyd, R. V. and Osamura, R. Y. (1997). Transcription factors in normal and neoplastic pituitary tissues. *Microscopy and Research Technique*. **39** (2):168-181.
- ManWarren, T.; Gagliardo, L.; Geyer, J.; McBay, C.; Pearce-Kelling, S. and Appleton, J. (1997). Invasion of ointestinal epithelia *in vitro* by parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **65**: 4806-4812.
- McVay, C. S.; Tsung, A. and Appleton, J. (1998). Participation of parasite surface glycoprotein in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity*. **66** (5):1941.
- Malaviya, R.; Ikeda, T.; Ross, E. A. and Abraham, S. N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacteria clearance at sites of infection through TNF- α . *Nature*. **381**: 77-80.
- Mitreva, M. ; Jasmer, D. P. ; Appleton, J. ; Martin, J. ; Dante, M. ; Wylie, T. ; Clifton, S.W. ; Waterston, R.H. and McCarter, J. P. (2004). Gene discovery in the adenophorean nematode *Trichinella spiralis*: an analysis of transcription from three life cycle stages. *Molecular Biochemical Parasitology*. **137**(2):277-291.
- Moqbel, R.; Wakelin, D.; MacDonald, A. J.; King, S. J.; Grecis, R. K. and Kay, A. B. (1987). Release of leukotrienes durin rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunology*. **60**: 425.
- Monroy, H.; Flores-Trujillo, M.; Benitez, E. and Arriaga, C. (2000). Swine trichinellosis in slauterhouses of metropolitan area of Toluca. *Parasite*. **8**: S249-S251.
- Morelle, W.; Haslam, S. M.; Olivier, V.; Appleton, J. A.; Morris, H. R. and Dell, A. (2000). Phosphorylcholine-containing N-glycans of *Trichinella spiralis*: identification of multiantennary lacdiNAc structures. *Glycobiology*. **10** (9):941-950.
- Murell, K.D. (1994). Beef as source of trichinellosis. *Parsitology Today*. **10**: 434.

- Murrel, K. D. and Pozio, E. (2000). Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology*. **30**: 1339-1349.
- Nagano, I. ; Wu, Z. ; Nakada, T.; Boonmars, T. and Takahashi, Y. (2003). Molecular cloning and characterization of a serine proteinase gene of *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology*. **89**(1):92-98.
- Negrao-Correa, D.; Adams, L.S. and Bell, R. G. (1996). Intestinal transport and catabolism of IgE: a major blood-independent pathway of IgE dissemination during a *Trichinella spiralis* infection of rats. *Journal of Immunology*. **157**(9):4037-4044.
- Negrao-Correa, D.; Adams, L. S. and Bell, R. G. (1999). Variability of the intestinal immunoglobulin E response of rats to infection with *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus* or *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite Immunology*. **21**(6):287-297.
- Newton, S. M.; Klebba, P. E.; Hofnung, M. and Charbit, A. (1995). Studies of the anaerobically induced promoter p_{nir} B and the improved expression of bacterial antigens. *Research in Microbiology*. **146** (3):193-202.
- Ortega-Pierres, G.; Chayen, A.; Clark, N.W. and Parkhouse, R. M. (1984). The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. **88** (Pt 2):359-369.
- Ortega-Pierres, G.; Chayen, A.; Clark, N.W.T. y Parkhouse R.M.E. (1989). Protection against *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. **88**: 359-369.
- Ortega-Pierres, G.; Muñiz, E.; Coral-Vázquez, R. y Parkhouse R.M.E. (1989). Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitology Research*. **75**: 563-567.

Ortega-Pierres, M. G.; Yepez-Mulia, L.; Homan, W.; Gamble, H. R.; Lim, P. L. ; Takahashi, Y.; Wassom, D. I. and Appleton, J. A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunology*. **18** (6):273-284.

Ortega-Pierres, M.G., Arriaga, C. and Yépez-Mulia, L. (2000). Epidemiology of trichinellosis in México, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. **93**: 201-225.

Oxer, M. D.; Bentley, C. M.; Doyle, J. G.; Peakman, T. C.; Charles, I. G. and Makoff, A. J. (1991). High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated nirB promoter. *Nucleic Acids Research*. **19** (11):2889-2892.

Pozio, E.; La Rosa, G.; D' Ancona, F.; Amati, M.; Mancini, B. F. and De Giacomo, M. (2001). Twelve years of activity of the International *Trichinella* Reference Centre. *Parasite*. **8**: S44-S46.

Ramaswamy, K.; Goodman, R. E and Bell, R. G. (1994). Cytokine profile of protective anti *Trichinella spiralis* CD4+ OX22- and non-protective CD4+ OX22+ thoracic duct cells in rats: secretion of IL-4 alone does not determine protective capacity. *Parasite Immunology*. **16**(8):435-445.

Ramaswamy, K.; Negro-Correa, D. and Bell, R. (1996). Local intestinal immune responses to infections with *Trichinella spiralis*. Real-time, continuous assay of cytokines in the intestinal (afferent) and efferent thoracic duct lymph of rats. *Journal of Immunology*. **156** (11):4328-4337.

Robinson, M.; Krco, C. J.; Beito, T. G. and David, C. S. (1991). Genetic control of the immune response to *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larval antigens. *Parasite Immunology*. **13**(4):391-404.

Romaris, F.; Escalante, M.; Lorenzo, S.; Bonay, P.; Garate, T.; Leiro, J. and Ubeira, F. M. (2002). Monoclonal antibodies raised in Btk (xid) mice reveal new antigenic relationships and molecular interactions among gp53 and other *Trichinella* glycoproteins. *Molecular Biochemical Parasitology*. **125** (1-2): 173-183.

Salinas-Tobón, M.R.; Chapa, M.R. and Ortega-Pierres, M.G. (1994). Evaluation of *Trichinella spiralis* surface antigens from muscle larva, adult, and new born larva for the diagnosis of human trichinellosis. In: trichinellosis. Proceedings of the 8Th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell, W.C., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di sanità Press, Rome, Italy. 365-371.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor, New York, U.S.A., Cold Spring Harbor Laboratory, Press.

Santamarina, M.T.; Leiro, J.; Garrido, M. J.; Sanmartin-Duran, M. L. and Ubeira, F.M. (1988). The effect of the intestinal worms and migrating L1 larvae of *Trichinella spiralis* on the production of antiparasitic IgE antibodies. Parasitology Research. **74**(6):581-585.

Scales, H. E.; Ierna, M. X. ; Gutierrez-Ramos, J. C.; Coyle, A. J. ; Garside, P. and Lawrence, C. E. (2004). Effect of inducible costimulator blockade on the pathological and protective immune responses induced by the gastrointestinal helminth *Trichinella spiralis*. European Journal of Immunology. **34** (10):2854-2862.

Smerdou, C.; Anton, I. M.; Plana, J.; Curtiss, R. and Enjuanes, L. (1996). A continuous epitope from transmissible gastroenteritis virus S protein fused to *E. coli* heat-labile toxin B subunit expressed by attenuated Salmonella induces serum and secretory immunity. Virus Research. **41**(1):1-9.

Soulé, C.; Guillou, J.P.; Dupouy-Camet, J. ; Vallet, C. and Pozio, E. (1993). Differentiation of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction. Parasitology Research. **79**: 461-465.

Su, X.; Prestwood, A.K. and McGraw, R. A. (1991). Cloning an expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*. Molecular Biochemical Parasitology. **45**: 331-336.

- Sun, S.; Xu, W.; He, N. and Sugane, K. (1994). An antigenic recombinant fusion protein from *Trichinella spiralis* induces a protective response in BALB/c mice. *Journal of Helminthology*. **68**(1):89-91.
- Sugane, K. and Matsuura, T. (1990). Molecular analysis of the gene encoding and antigenic peptide of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Journal of Helminthology*. **64**:1-8.
- Touratier, L. (1991). Prevention et surveillance de la Trichinellose. In: Soulé C., et Dupouy-Camet J. Ed. "La trichinellose une zoonose en évolution", CNEVA-OIE Ed. Paris Francia. 211-270.
- Tuohy, M.; Lammas, D. A.; Wakelin, D.; Huntley, J. F.; Newlands, G. F. and Miller, H. R. P. (1990). Functional correlations between muosal mast cell activity and immunity to *Trichinella spiralis* in high and low responder mice. *Parasite Immunology*. **12**: 675.
- Ubeira, F. M.; Leiro, J.; Santamarina, M. T. and Sanmartin-Duran, M. L. (1987). Modulation of the anti-phosphorylcholine immune response during *Trichinella spiralis* infections in mice. *Parasitology*. **95** (Pt 3): 583-592.
- Urban, J.; Fang, H.; Liu, Q.; Ekkens, M.J.; Chen, S.J. ; Nguyen, D.; Mitro, V.; Donaldson, D. D.; Byrd, C.; Peach, R.; Morris, S. C.; Finkelman, F. D.; Schopf, L. and Gause, W. C. (2000). IL-13-mediated worm expulsion is B7 independent and IFN-gamma sensitive. *Journal of Immunology*. **164**(8):4250-4256.
- Vallance, B. A.; Croitoru, K. and Collins, S. M. (1998). T lymphocyte-dependent and -independent intestinal smooth muscle dysfunction in the *T. spiralis*-infected mouse. *American Journal of Physiology*. **275**: G1157-G1165.
- Vallance, B. A.; Galeazzi, F.; Collins, S. M. and Snider, D.P. (1999). CD4 T cells and major histocompatibility complex class II expression influence worm expulsion and increased intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *Infection and Immunity*. **67**(11):6090-6097.

- Van Knapen, F.; Franchimont, J.H. Ruitenbergh, E.J.; André, P.; Baldelli, B.; Gibson, T.E.; Gottal, C.; Henriksen, S.A.; Kohler, G.; Roneus, O.; Skovgaard, N.; Soulé, C.; Strickland, K.L. and Taylor, S.M. (1981) Comparison of four methods for early detection of experimental *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Veterinary Parasitology*. **9**: 117-123.
- Vassilatis, D. K.; Despommier, D.; Misek, D. E.; Polvere, R. I.; Gold, A. M. and Van der Ploeg, L. H. (1992). Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Journal of Biological Chemistry*. **267**(26): 18459-18465.
- Vayssier, M. ; Le Guerhier, F. ; Fabien, J. F. ; Philippe, H. ; Vallet, C.; Ortega-Pierres, G. ; Soule, C. ; Perret, C. ; Liu, M. ; Vega-Lopez, M. and Boireau, P. (1999). Cloning and analysis of a *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kDa. *Parasitology*. **119** (Pt 1):81-93.
- Viney, M. (2002). How do host immune responses affect nematode infections?. *Trends in Parasitology*. **18** (2). 63-65.
- Viveros, N.; Arriaga, C.; Banda. V.; Ortega-Pierres, M.G. and Yépez-Mulia, L. (2001). Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite*. **8**: S257-S259.
- Vojnikovic, B.; Brncic, N.; Zamolo, G.; Budiselic, R.; Njiric, S. and Novak, S. (2001). Severe Trichinellosis cured with pulse doses of glucocorticoids. *College of Anthropology*. **25** :131-135.
- Wisnewski, N.; McNeil, M.; Grieve, R. B. and Wassom, D. L. (1993). Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Molecular Biochemical Parasitology*. **61**(1):25-35.
- Yang, J.; Zhu, X. P.; Zhang, X. M.; Yang, Y. P.; Zhou, L.; Gao, X.; Liu, M.Y. and Pascal, B. (2001). Screening and sequence analysis of the adult stage-specific gene of *Trichinella spiralis* *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. **19** (2):68-71.

Yépez Mulia, L.; Montañez, C. and Ortega-Pierres, M. G. (1989). Surface antigens from *Trichinella spiralis* muscle larva expressed by *Escherichia coli*. En: Proceedings of the 7Th International Conference on Trichinellosis. Tanner CE, Martínez Fernández AR and Bolas Fernández F (Eds.) Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España. 47-52.

Yépez Mulia, L.; Arizmendi, N. and Ortega-Pierres, M. G. (1994). Production of *Trichinella spiralis* recombinant peptide useful in diagnosis of swine trichinellosis. En: Proceedings of the 8Th International Conference on Trichinellosis. Campbell WC, Pozio E and Bruschi F (Eds.) Istituto Superiore di Sanita Press, Rome, Italy. 395-400.

Yépez-Mulia, L. and Ortega-Pierres, M.G. (1994). Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la trichinellosis. Revista Latino Americana de Microbiología. **36**: 127-138.

Yepez-Mulia, L.; Arriaga, C.; Pena, M. A.; Gual, F. and Ortega-Pierres G. (1996). Serologic survey of trichinellosis in wild mammals kept in a Mexico City Zoo. Veterinary Parasitology. **67**(3-4):237-246.

Zarlenga, D.S. and Gamble, H.R. (1990). Molecular cloning and expression of an immunodominant 53 kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. Molecular and Biochemical Parasitology. **42**:165-174.

Zarlenga, D. S.; Boyd, P.; Lichtenfels, J. R.; Hill, D. and Gamble, R. H. (2002). Identification and characterisation of a cDNA sequence encoding a glutamic acid-rich protein specifically transcribed in *Trichinella spiralis* newborn larvae and recognised by infected swine serum. International Journal of Parasitology. **32**(11):1361-1370.

Zhu, X.P.; Yang, J.; Yang, Y. P.; Boireau, P.; Zhan, B.; Feng, J. J. and Hotez, P. (2003). Prokaryotic expression and characterization of an antigenic gene of adult *Trichinella spiralis*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. **21**(1):16-19.