



UNIVERSIDAD DE CHILE.

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS.
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS.



**CLONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE POSIBLES
ANTIGENOS RECOMBINANTES DE *Toxocara canis***

WILFREDO JESUS IBACACHE ESCOBAR.

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

PROFESOR GUIA: DR. JUAN ANTONIO VENEGAS HERMOSILLA. Ph.D.

FINANCIAMIENTO: PROYECTO DID TNAC 24-02/01.

SANTIAGO, CHILE.

2005



UNIVERSIDAD DE CHILE.

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS.
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS.



CLONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE POSIBLES ANTIGENOS RECOMBINANTES DE *Toxocara canis*

WILFREDO JESUS IBACACHE ESCOBAR.

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA:	JUAN VENEGAS HERMOSILLA
PROFESOR CONSEJERO:	FERNANDO FREDES MARTINEZ
PROFESOR CONSEJERO:	CLAUDIO ZUÑIEGA MARTI

SANTIAGO, CHILE.

2005

*D*edico este trabajo a mis padres y María Isabel, quienes fueron fundamentales en este largo camino, sin ustedes este sueño no podía ser realidad.

También quiero dedicar parte de este logro a mis pequeños amigos que hoy ya no están aquí, pero que fueron un factor importante en forjar mi vocación.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al concluir esta memoria, deseo expresar mis mas sinceros agradecimientos a las personas que contribuyeron directa o indirectamente al desarrollo y feliz término de este trabajo. En especial quiero destacar:

_ Al Dr. Juan Antonio Venegas Hermosilla, por la confianza depositada y sus valiosos concejos.

_ Al Dr. Fernando Fredes Martínez, por su apoyo y concejos para el desarrollo de esta memoria.

_ Al Dr. Claudio Zúñiga Marti, por sus concejos y preocupación al evaluar esta memoria.

_ Al Dr. Werner Apt, por su apoyo y estímulo durante este periodo.

_ A la Dra. Inés Zulantay, por su valiosa colaboración y ayuda.

_ A la Dra. Gittith Sánchez, por entregarme su valiosa opinión para el desarrollo de esta memoria.

_ A la Dra. Maria Isabel Quinteros, por entregarme su incondicional apoyo y estimularme a continuar en los momentos más difíciles de este trabajo.

_ Al Sr. Matthias Lendner estudiante de la Universidad de Humbol de Berlín - Alemania, por su ayuda en el desarrollo de una parte importante del trabajo experimental de esta memoria.

_ Al personal de la unidad de Parasitología de la Facultad de Medicina Norte por su gran ayuda y cordialidad durante mi trabajo, en especial al Sr. Héctor Morales.

INDICE.

Indice.....	v
II) Resumen – Summary.....	vi
III) Introducción.....	1
IV) Revisión Bibliográfica.....	2
V) Objetivos.....	14
VI) Material y Métodos.....	15
VII) Resultados.....	23
VIII) Discusión.....	51
IX) Conclusión.....	54
X) Bibliografía.....	55
XI) Anexos.....	60

RESUMEN.

Mediante la tecnología del DNA recombinante, en esta memoria se pretendió aportar nuevos antecedentes en relación con la interacción hospedero-parásito, fundamentalmente acerca de los mecanismos moleculares que utilizan las larvas infectantes de *Toxocara canis* para evadir la respuesta inmune. Con dicho objetivo se procedió al clonamiento, secuenciación y análisis computacional de cDNAs expresados por estas larvas infectantes.

Para ello se rastreó una genoteca lamda - ZAP de cDNA de *T. canis*, de la cual se aislaron y purificaron 72 clones. En base a estudios de PCR se seleccionaron 12 clones que posteriormente fueron secuenciados desde su extremo 5', y analizados usando bancos de datos y programas de computación. Finalmente, con el objetivo de obtener más antecedentes sobre la función de las proteínas codificadas por estos clones, se intentó la expresión de algunos de ellos mediante vectores de alta expresión.

De los 12 clones analizados, sólo uno de ellos no pudo ser estudiado debido a que poseía un inserto demasiado pequeño. Los clones B-3 y E-7, no presentaron ninguna similitud significativa con secuencias de los bancos de datos. Esto sugiere fuertemente que ambos clones codifican para moléculas aún no descritas de *T. canis*. Otros dos clones, A-3 y A-6, presentaron similitud con genes que codifican para una proteína ribosomal y otra de "shock térmico de *Drosophila sp.* Los clones B-7 y B-13 presentaron un alto grado de similitud con transcritos de *T. canis* abundantemente expresados denominados Tc-**ant**-095 y Tc-**ant**-30. El clon D-10, presentó similitud con una secuencia denominada K023h06.y1 de *T. canis*, la cual es un transcrito expresado en estadios adultos del parásito. Los clones 01 y 02, presentaron similitud con secuencias llamadas lectinas tipo - C de *T. canis*. A su vez los clones D-13 y A14, mostraron gran similitud con mucinas de *T. canis*, previamente descritas por otros autores. En base diversos antecedentes experimentales, se ha sugerido que tanto las lectinas tipo - C como las mucinas, podrían estar involucradas en estrategias de evasión de la respuesta inmune en estos parásitos.

Finalmente, todos los intentos de expresar proteínas recombinantes codificados por nuestros clones fueron infructuosos, futuros trabajos serán necesarios para lograr estos objetivos.

SUMMARY

Using the recombinant DNA technology the aim of this memory was obtain new insights about the host-parasite relationship focus in the molecular mechanisms which use infective larvae to survival into the mammalian host.

In order to obtain the above goals, it was screened a λ – ZAP *T. canis* cDNA library. Seventy two clones were isolated and purified. These clones were then analyzed by PCR techniques to select 12 clones that were later sequenced and analyzed by computing program and data banks. Finally, with the aim to obtain more information about the function of the proteins encoded by these clones, efforts trying to express recombinant proteins were conducted.

From these 12 selected and sequenced clones, two of them (clones – 01 and 02) encoded for type – C lectines from *T. canis*. Other two ones (clones D – 13 and A - 14) encoded for *T. canis* mucins. On the other hands, the clones B – 7 and B – 13, present high similarity with two described abundantly expressed novel transcripts named Tc-**ant**-095 and Tc-**ant**-30, from *T. canis*. The clones A – 3 and A – 6 showed high similarity with a ribosomal and heat shock genes form *Drosophila sp.*, respectively. The clone D – 10 presented good similarity with a *T. canis* transcript expressed in adult stage of parasite. The clones B – 3 and E – 7 did not present any significant similarity with any data bank sequence analyzed during this memory. This indicated that these two sequences encoded for unknow proteins, not yet described in *T. canis*. One of the twelve clones selected, and sequenced only had very short insert which was not enough for any data bank searching. Several authors suggests that both type-C lectins and mucins could play a very important role in the immune evasion. For this reasons, it is very interesting that four of the twelve clones (clones 01, 02, D-13 and A-14) encoded for that proteins.

Finally, all the diverse works trying to expressed these *T. canis* recombinant proteins were unsuccessful by unknown facts, future efforts will be necessary to advance in this field.

KEY WORDS: *Toxocara canis*, cDNA cloning, Recombinant proteins, type – C lectins, mucins, Evasion of the immune response.

INTRODUCCIÓN.

La toxocarosis humana es una enfermedad parasitaria causada, preferentemente, por un nematodo del perro llamado *Toxocara canis*. Tiene una distribución mundial donde las poblaciones más afectadas son los niños, debido a sus conductas de geofagia. La forma habitual de contraer la enfermedad es mediante la ingestión de huevos larvados, los cuales se encuentran principalmente en la tierra de plazas u otros lugares frecuentados por perros. Los huevos en el ambiente, realizan un proceso de maduración hacia un estado denominado infectante, los que al ser ingeridos y por los jugos gástricos dejan en libertad sus larvas, las cuales traspasan la mucosa, llegando a la circulación porto hepática y de esta manera migrando a los distintos tejidos del hospedero, provocando las diversas manifestaciones clínicas que constituyen la toxocarosis.

Comúnmente las manifestaciones clínicas se encuentran asociadas a las estructuras u órganos que están comprometidos como: son el hígado, los riñones, los pulmones, los ojos, el sistema nervioso central y la piel. Si bien la signología varía dependiendo de donde migre el parásito, la respuesta del organismo siempre se orienta a una reacción inflamatoria exacerbada que busca detener el avance del parásito, con el consiguiente daño tisular para el hospedero.

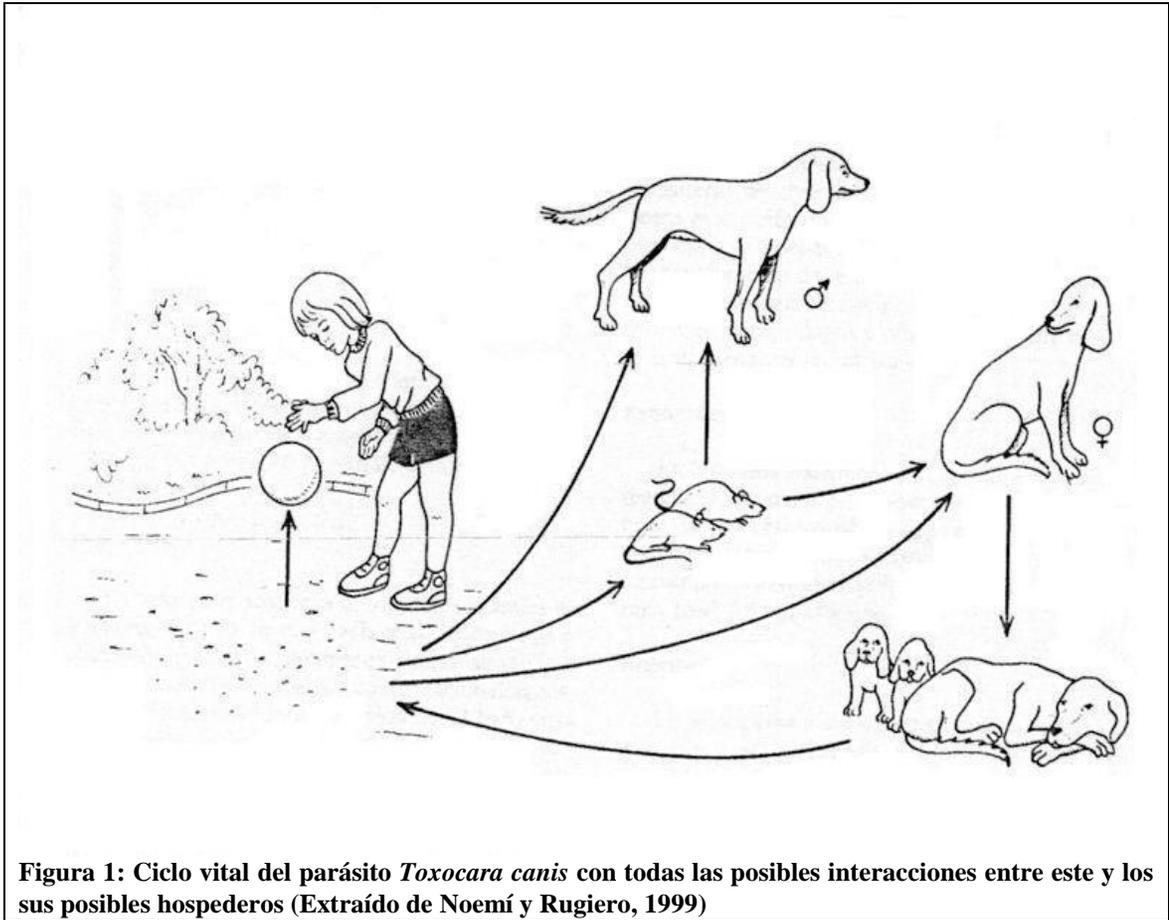
El diagnóstico en el humano se hace rutinariamente mediante el examen clínico del paciente y exámenes complementarios, donde el estudio serológico por ELISA con antígenos excretados-secretados de larvas de parásitos es considerado como el examen de mayor precisión.

Esta memoria pretendió aportar antecedentes en relación al clonamiento de nuevos posibles antígenos recombinantes determinar sus posibles estructuras proteicas y sus posibles funciones, como por ejemplo: los mecanismos moleculares que utiliza *T. canis* para evadir la respuesta inmune del hospedero mamífero, para ello fueron clonados y caracterizados los cDNAs, que codificaban para antígenos recombinantes de larvas infectantes de *T. canis*. Obtenidos los clones, se estudiaron mediante PCR y se secuenciaron los respectivos cDNAs. Posteriormente, algunos de estos fueron subclonados en vectores de alta expresión, para luego ser analizados mediante “PCR, SDS - PAGE y Western Blot”. En esta última técnica, se usaron sueros de pacientes humanos infectados con *T. canis*.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

1.- *T. canis*, clasificación y morfología del nematodo adulto: Como ya se mencionó anteriormente, este nematodo es el más involucrado en cuadros de toxocarosis humana, y taxonomicamente se le describe como perteneciente al Phylum Nematoda; Orden Ascaroidea. Los géneros pertenecientes a este orden se caracterizan por ser helmintos cilíndricos de color blanquecino, cuerpos alargados y aguzados en sus extremos, de simetría bilateral. En el extremo anterior posee tres labios y lateralmente dos alas cervicales, además, presenta una reproducción sexual con un claro dimorfismo entre macho y hembra. En el estado adulto desarrolla una cubierta externa denominada cutícula la cual posee finas estriaciones transversales, lo que le otorga una gran resistencia a los fluidos producidos al interior del tracto digestivo, al cual se encuentra adherido. Su aparato digestivo se encuentra poco desarrollado por lo que depende fuertemente de los nutrientes aportados por su hospedero. En ambos sexos se observa un gran desarrollo del aparato reproductor (Cordero y Rojo, 1999).

2.- Ciclo evolutivo: Los hospederos definitivos son los cánidos, tanto silvestres como domésticos, y en ellos este parásito se perpetua a través del ciclo de Loos en edades tempranas (Ver Figura 1), que culminará con la eliminación de huevos embrionados fértiles al ambiente por medio de las heces de dicho cánido. Una vez en el ambiente, el huevo comienza un proceso de maduración que depende fundamentalmente de la temperatura y humedad ambiental, y termina con la generación de un huevo larvado que es infectante (Noemí y Rugiero, 1999).



Una vez que un hospedero paraténico ingiere los huevos larvados y maduros, las larvas son liberadas de ellos por los fluidos del tracto digestivo, las que luego pasan por la mucosa intestinal, llegan a la circulación porto hepática y se distribuyen a los distintos tejidos generando las diversas manifestaciones clínicas, que se observan en la toxocarosis humana (Noemí y Rugiero, 1999).

3.- Manifestaciones clínicas de la toxocarosis humana: *T. canis* ha sido identificado como un ascaridio que afecta fundamentalmente a los niños debido a sus malos hábitos higiénicos. En la toxocarosis humana se distinguen los siguientes cuadros clínicos:

3.1.- Toxocarosis asintomática: Para este cuadro no existen signos ni sintomatología propia del cuadro, en la hematología clínica se puede presentar con o sin eosinofilia marcada, y habitualmente su diagnóstico se considera como un hallazgo clínico (Noemí y Rugiero, 1999).

3.2.- Toxocarosis sistémica o visceral: Agrupa a un conjunto de manifestaciones clínicas que se pueden presentar de manera individual o una mezcla de ellas. Afecta principalmente a infantes entre 1 a 7 años, habitualmente son niños que tienen conductas de geofagia o pica y se han relacionado con alguna mascota cuyo manejo sanitario no ha sido el más adecuado. Los signos clínicos pueden ser inespecíficos como son: anorexia, astenia, irritabilidad, fiebre; y en algunas ocasiones presentan manifestaciones cutáneas, las cuales permiten orientar el diagnóstico hacia este tipo de cuadros. Los signos habituales en estos casos son eccema, urticaria, erupciones pruriginosas y eritemas (Humber *et al.*, 2000). En los cuadros con manifestación respiratoria, habitualmente se describen signos de bronquitis obstructiva recidivante (OBR), neumonitis y bronquitis aguda. El cuadro de compromiso hepático se relacionan con hepatomegalia y nódulos hiper ecogénicos al examen ecotomográfico junto con hallazgos de esplenomegalia. La migración de larvas también puede comprometer el sistema nervioso central, dando origen a un cuadro neurológico cuyos principales signos asociados son: convulsiones, hiperactividad, trastornos de la conducta y hemiplejía. También se han descrito cuadros asociados a manifestaciones cardíacas, cuya principal signología apunta a una cardiomiopatía que en el tiempo puede redundar en una insuficiencia cardíaca (Fiedman y Henada, 1960; Schantz *et al.*, 1979; Rasmussen *et al.*, 1993; Noemí y Rugiero, 1999).

3.3.- Toxocarosis ocular: En este cuadro la manifestación clínica se produce por migración de larvas en estadio II hacia el globo ocular provocando en este distintas lesiones, que en último término conducirán a la disminución de la capacidad visual del individuo. La mayor prevalencia se presenta en niños varones entre los 6 a 14 años, donde la vía de contaminación es igual a la ya descrita (Sapunar *et al.*, 1989).

Las principales manifestaciones clínicas son: disminución del campo visual, exotropía, leucocoria e inflamación del segmento anterior. La frecuencia de la presentación de los signos varía entre pacientes (Ver Cuadro 1) y es habitual la presencia de dos o más signos en un mismo individuo (Sapunar *et al.*, 1989).

Cuadro 1: “Frecuencia de Presentación de los Signos Clínicos en la Toxocarosis Ocular.”

SIGNO CLÍNICO	FRECUENCIA DE PRESENTACIÓN
Disminución del campo visual	93 %
Exotropia	60 %
Leucocoria	27 %
Inflamación del segmento anterior	27 %

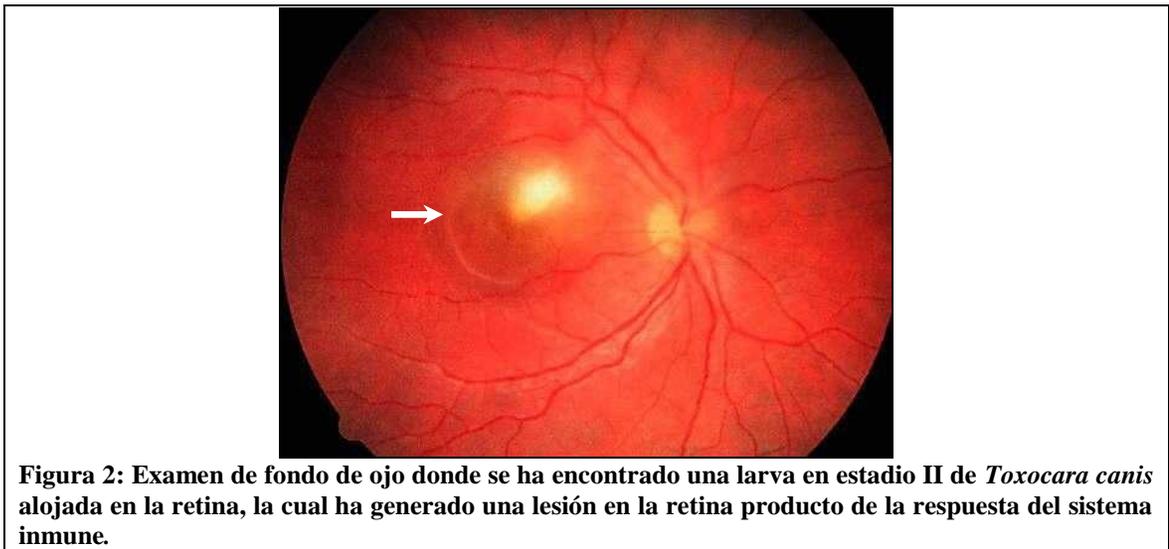
3.4.- Toxocarosis encubierta o atípica: Para este cuadro clínico no existen signos definidos y habitualmente son difusos e inespecíficos. En ocasiones se presenta dolor abdominal, manifestaciones ostioarticulares, cefalea, urticaria, etc (Noemí y Rugiero, 1999).

4. Prevalencia de la toxocarosis humana en algunos países: Es cosmopolita, con prevalencias que oscilan desde un 2 hasta 92,8 % (Stiles, 1963; Worley, 1964; Burke, 1977). En este sentido los trabajos se han, basado en la serología de la población humana. Así por ejemplo, estudios en niños en Estados Unidos, específicamente en California y Pensilvania han revelado una prevalencia de 25% y de un 54 %, respectivamente (Wisley *et al.*, 1980). Otro estudio realizado por Magnaval *et al.*, (1994), en las islas tropicales de Santa Lucia y La Reunión, ubicadas en el océano Indico mostró índices de 86 y 92,8%, respectivamente. En nuestro país ,en tanto, un estudio hecho en la población adulta supuestamente sana, reveló una prevalencia de 8,8 % (Herkovic y Astorga, 1985), mientras que en niños asintomáticos fue un 20% y en la población con eosinofilia fue de un 25 % (Noemí y Rugiero, 1999).

5.- Diagnóstico de la toxocarosis humana: El diagnóstico rutinario de las distintas manifestaciones de toxocarosis en el humano se basa en un conjunto de antecedentes. La sospecha clínica parte desde la anamnesis, donde la edad del paciente, conductas de geofagia o pica y el contacto con alguna mascota cuyo manejo sanitario no ha sido adecuado son el punto de inicio para otros estudios complementarios. En el caso de la toxocarosis ocular es fundamental el examen de fondo de ojo donde se puede encontrar a la larva de estadio II asociadas a ciertos patrones de lesiones oculares, tales como (Ver Figura 2): masas periféricas en la retina, granuloma macular, endoftalmitis, granuloma vitrio, granuloma del nervio óptico y alteración difusa del epitelio pigmentario con vitreitis. Estudios complementarios como la hematología clínica pueden evaluar niveles de leucocitosis y eosinofilia, pero este parámetro no siempre está en todos los pacientes (Rasmussen, 1993). Otro examen sugerido es la medición de las alzas de los niveles de isoaglutinina anti - A o anti - B (Newman, 1978), también se ha

propuesto el uso de biopsias para pesquisar la larva en los tejidos, pero su bajo rendimiento diagnóstico lo hace un método poco utilizado (Schantz y Glickman, 1978).

El estudio serológico que se usa rutinariamente para la confirmación diagnóstica es el ELISA con antígenos excretados-secretados por larvas del parásito (De Savigny *et al.*, 1979) cuya sensibilidad es entre el 70 a 91 % y su especificidad es de 76,9 a 100% (Herkovic *et al.*, 1986). Si bien, el uso de antígeno excretado-secretado de larvas de *T. canis* ha significado una mayor precisión para el diagnóstico, éste se ve en ocasiones entorpecido, debido a la forma de obtención del antígeno y a un importante número de reacciones cruzadas con otros agentes parasitarios, con los cuales comparten los mismos epitopos (Sugane y Oshima, 1983; Speiser y Gottstein, 1984; Jacquier *et al.*, 1991; Nunes *et al.*, 1997)



6.- Respuesta inmune anti *T. canis*: La interacción hospedero-parásito es uno de los principales temas de estudio en la parasitología. Ambos, hospedero y parásito, establecen distintas estrategias a nivel molecular para inhibir la acción del otro. En este sentido, algunos trabajos han intentado explicar los mecanismos inmunológicos por los cuales el hospedero tratará de controlar la acción del parásito, y a su vez como este último generará estrategias de inmunoevasión para permanecer en el hospedero.

Lo clásicamente aceptado en la respuesta inmune del hospedero contra infecciones de helmintos, es que esta respuesta este conducida por células T helper subpoblación 2 (Th2) provocando altos niveles de eosinofilia y producción de IgE, de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 3 (Maizels *et al.*, 1993). Sin embargo, también existen casos en los cuales la respuesta inmune esta comandada por linfocitos T helper subpoblación 1 (Th1), siguiendo un esquema similar al mostrado en la Figura 4 (Maizels *et al.*, 1993; Eise *et al.*, 1994; Lawrence *et al.*, 1994; Pearce y MacDonald, 2002).

A pesar que históricamente se ha asociado a la respuesta inmune del tipo Th2 como una respuesta protectora contra infecciones de helmintos, no esta claro que realmente sea así (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). De hecho, sólo en helmintos intestinales se ha podido demostrar que este tipo de respuesta baja los niveles de infección favoreciendo la expulsión de los parásitos del intestino (Eise *et al.*, 1994; Maizels y Holland, 1998). En helmintos tisulares, generalmente la respuesta vía Th2 no es protectora, al contrario al parecer los helmintos, polarizarían una respuesta hacia Th2 para permanecer en el hospedero mediante mecanismos, todavía poco conocidos (Lawrence *et al.*, 1995; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). La polarización hacia una respuesta tipo Th2 produciría inhibición de una respuesta tipo Th1, evitando una acción contra el parásito y protegiendo al hospedero de una reacción inflamatoria excesiva (Hoffmann *et al.*, 2002).

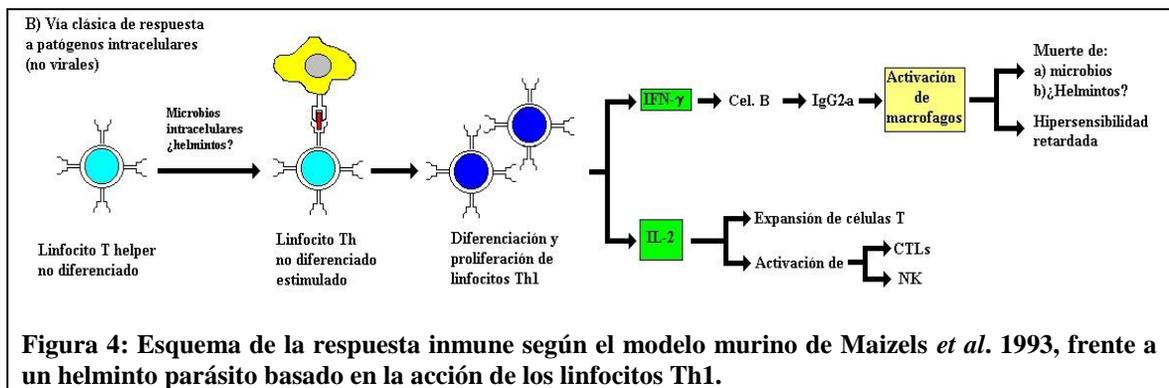
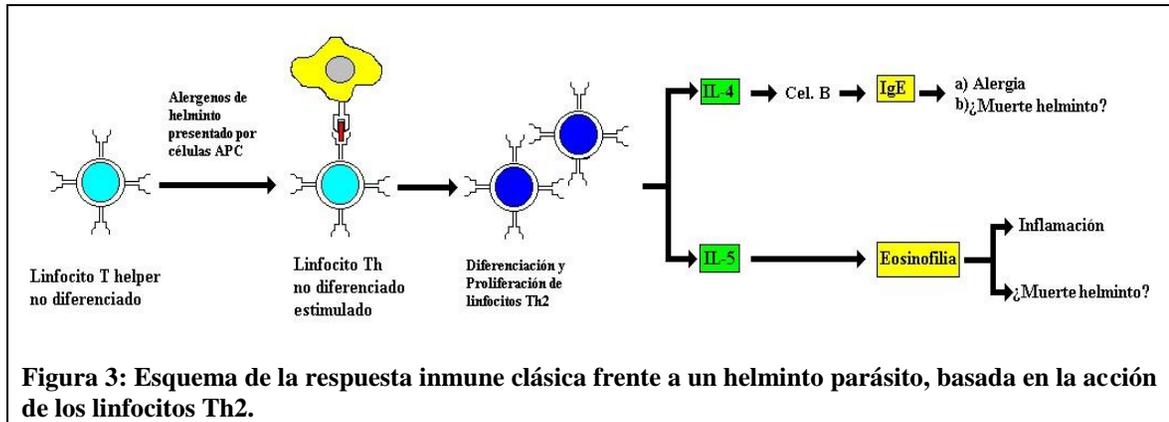
Cuando la respuesta inmune es del tipo Th2, el hospedero debe asegurarse que esta respuesta sea regulada o atenuada para evitarse un daño asimismo causada por acción excesiva de los sistemas efectores gatillados por IL-4 o IL-5 (Lawrence, 1998). Algunos de los mecanismos postulados para modular esta respuesta Th2 en infecciones con helmintos, y también para polarizar esta respuesta hacia una del tipo Th2, son:

- a) Respuesta vía Th2 modificados.
- b) Respuesta vía células T regulatorias (Treg).
- c) Participación de células accesorias regulatorias.

a) Respuesta vía Th2 modificados: Esta respuesta esta basada en un tipo especial de linfocitos Th2 que produce una acción poco agresiva cuando un individuo está expuesto a altas dosis de alérgeno (Platts-Mils *et al.*, 2001). La principal característica de este tipo de respuesta es el desacoplamiento de las respuestas de IgG4 e IgE, favoreciendo una disminución de la segunda inmunoglobulina. Esto sería promovido por un efecto de interleuquina 10 (IL-10) sobre las células B (Jeannin *et al.*, 1998). IL-10 es un factor regulador inhibitorio en enfermedades alérgicas, que podría ser producido por los mismos linfocitos Th2 modificados o por células accesorias, tales como células presentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos o células dendríticas (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

b) Respuesta vía linfocitos T regulatorios (Treg): Muchas infecciones con helmintos han mostrado que durante el curso de ellas se va produciendo una progresiva atenuación de la respuesta inmune, en parámetros como: proliferación de células T y disminución de citoquinas inflamatorias, tales como interferón gama (INF- γ) el factor de necrosis tumoral (TNF) (Cooper, 2001). Las citoquinas que más se han encontrado asociadas a esta perdida creciente de respuesta inmune son IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), lo cual indica que las poblaciones celulares involucrados en la declinación de la respuesta inmune son activadas durante el curso de la infección con el helminto. En infecciones de ratones con *Schistosoma mansoni*, inicialmente la respuesta mayoritaria es del tipo Th0/Th1, originando al principio una respuesta pro-inflamatoria tipo Th2, para posteriormente hacer que la respuesta parásito-específica decline (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). Algunos autores postulan que los responsables de originar esta progresiva declinación de la respuesta inmune en algunas infecciones de helmintos, serían los linfocitos T regulatorios (Treg) (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

c) Participación de células accesorias regulatorias: Las células dendríticas (DCs) son las primeras células del organismo que toman contacto con los parásitos reaccionando contra señales genéricas o específicas para polarizar la respuesta de células T (Reis y Sousa, 2001). A su vez, otro tipo de células accesorias, tal como los macrófagos, pueden producir inmunosupresión de la respuesta inmune mediante la producción de IL-10 (Osborne y Devaney, 1999).



7.- Posibles estrategias de evasión de la respuesta inmune: Respecto de las estrategias de inmunoevasión que los helmintos han desarrollado, se han descrito las siguientes:

7.1. Llevada a cabo por helmintos en general:

a) Actividad proteolítica en la superficie del parásito. Esta cualidad ha sido descrita en *Dirofilaria immitis*, *Fasciola hepatica* y *S. mansoni*. Se ha visto que gracias a esta cualidad los anticuerpos depositado en la superficie del parásito son digeridos tempranamente (Maizels *et al.*, 1993; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

b) Inhibidores de proteasas del hospedero que pueden digerir al parásito. Esta cualidad ha sido descrita en parásitos como *Echinococcus granulosus*, *Onchocerca volvulus* y *Taenia taeniaformis* (Maizels *et al.*, 1993; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

c) También se ha descrito la producción de sustancias antioxidantes capaces de inhibir la actividad de los macrófagos (la producción de radicales super - oxido). Esto se ha descrito en *Brugia pahangi*, *O. volvulus*, *S. japonicum*, *S. mansoni* (Maizels *et al.*, 1993; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003)

d) En algunos parásitos se ha descrito la producción de prostaglandinas E2 similar a las endógenas por lo que son capaces de inhibir la migración de macrófagos. Esta actividad se ha detectado en parásitos como *Brugia malayi* y *T. taeniaformis* (Maizels *et al.*, 1993; Maizels y Yazdanbakhsh, 2003).

e) Finalmente, también se ha logrado determinar la secreción de moléculas con una potente actividad inmunosupresora la cual se ha descrito en *S. mansoni* (Maizels *et al.*, 1993).

7.2. Llevada a cabo por *T. canis*: En lo que se refiere a las estrategias de inmunoevacación en *T. canis*, se han postulado los siguientes mecanismos (Maizels *et al.*, 1993):

a) Endocitosis de Antígenos de superficie: Una interesante estrategia descrita en este parásito, corresponde a la capacidad de endocitar sus propios antígenos de superficie que están unidos a los anticuerpos del hospedero. Con esto, no sólo logra mantener su superficie limpia, si no que además logra reducir al máximo la respuesta inmune del hospedero, este concepto es conocido como “Sheding”.

b) Resistencia mecánica al ataque del sistema inmune del hospedero: Esto se debe a que ha desarrollado una cubierta muy resistente. El principal elemento que constituye esta cubierta es un grupo de moléculas denominadas mucinas, las cuales han sido descritas en diversos artículos relacionándolas con la inmunoevacación (Maizels *et al.*, 1993).

c) Enmascaramiento: También se ha descrito la cualidad de enmascaramiento que consiste en usar las proteínas propias del hospedero adhiriéndolas a su superficie, logrando con esto un verdadero disfraz capaz de engañar al sistema inmune.

d) Recambio de proteínas de superficie: Otro elemento utilizado por estos parásitos es en el constante recambio de proteínas de la superficie de las larvas como una forma de presentar constantemente nuevas proteínas de superficie al hospedero.

e) Inmunosupresión: Finalmente al igual que en otros parásitos también se ha logrado determinar la secreción de moléculas con una potente actividad inmunosupresora.

8.- Aplicación de la tecnología del DNA recombinante para el estudio de la interacción hospedero parásito en *T. canis*:

Todo lo descrito anteriormente se basa en el estudio de la biología molecular de este parásito que buscan, mediante tecnología del DNA recombinante, generar y caracterizar antígenos de *T. canis*. Las técnicas apuntan fundamentalmente a la utilización de genotecas de expresión de cDNA de *T. canis* construidas en el vector lambda ZAP. Para lograr expresar las proteínas recombinantes se utilizan distintas células hospederas. Este proceso, si bien es cierto al describirlo parece sencillo, presenta una serie de limitaciones que muchas veces pueden impedir la obtención de proteínas recombinantes. Algunas de estas limitaciones son: La producción de proteínas recombinantes tóxicas (Olson *et al.*, 1998; Baneyx, 1999); la formación de cuerpos de inclusión (Georgiou *et al.*, 1986; Mukhopadhyay, 1994; Thomas y Baneyx, 1998; Lilie *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998); la degradación parcial de los insertos (Herman *et al.*, 1998; Carpousis *et al.*, 1999; Coburn y Mackie, 1999); y la presencia de codones no reconocidos por la maquinaria de traducción bacteriana (Zahn, 1996).

Sin embargo, es importante destacar que aún sin lograr obtener proteínas recombinantes, esta tecnología ha permitido clonar y caracterizar distintos cDNAs que codifican para importantes proteínas de *T. canis*. Este es el caso de cDNAs que codifican para proteínas ribosomales L3 expresadas por larvas infectantes, los cuales poseen un alto grado de similitud con cDNAs de otros organismos, tales como: mamíferos, levaduras, plantas y bacterias (Moore *et al.*, 1995). En otros estudios se clonó un cDNA que codifica para un antígeno de 26-kDa, también producido por larvas infectantes de *T. canis*. La proteína codificada por este mRNA reveló una estructura hidrofílica de 263 aminoácidos y un segmento N-terminal de 20 residuos, indicando que ésta es

secretada. Además se observó que la porción 5' terminal del cDNA, poseía una secuencia “spliced leader” (SL1), con lo cual se comprobó que el mRNA había sido producto de “trans-splicing” (Gems *et al.*, 1995).

Una familia importante de proteínas que ha sido identificada mediante la aplicación de la tecnología del DNA recombinante, en este parásito, son las mucinas. Así, se ha descrito el clonamiento de cuatro mRNAs que codifican distintas apomucinas (*Tc-muc-1*, *Tc-muc-2*, *Tc-muc-3*, *Tc-muc-4*). (Gems y Maizels, 1996; Loukas *et al.*, 2000b). Las proteínas codificadas por los cuatro cDNAs, contienen una señal peptídica repetitiva con una región rica en serina (Ser) / treonina (Thr) y un motivo de seis cisteínas denominado SXC ubicado en el extremo C - terminal. Este dominio se ha encontrado en varias proteínas de nematodo, y algo similar se ha visto en la toxina de los cnidarios (anémonas). La presencia de este motivo sugiere que sería necesario para el ensamblado y posterior exportación de mucinas (Loukas *et al.*, 2000b). Es interesante señalar que los mRNA que codifican para estas mucinas, también serían procesadas por transsplicing, pues poseen la secuencia SL1, descrita anteriormente (Gems *et al.*, 1995).

En otros trabajos, realizado por el mismo grupo, se han estudiado moléculas que al parecer están relacionadas con la capacidad de evasión que tiene el parásito frente al sistema inmune del hospedero. Así Loukas *et al.*, (1999), clonó un cDNA que codifica para una proteína excretada – secretada, TES – 32, la cual es producida por larvas infectantes de *T. canis*. Los clones (Tc-ctl-1) que codifican para esta proteína tienen un largo de 762 pares de base (pb). El análisis de la secuencia aminoacídica indicó una estructura proteica que cuenta con 219 amino ácidos, incluyendo un péptido señal de 18 amino ácidos con 3 potenciales sitios de N-glicosilación, en la porción amino terminal. Además, presenta una región de 8 cisteínas (Cis) y otra región rica en Thr, esta porción presentó poca similitud con otras proteínas conocidas. En cambio, en la porción carboxiterminal (entre las amino ácidos 81 – 219), presentó grandes similitudes con un grupo de moléculas denominadas lectinas tipo-C (CTLs) propias de mamíferos e invertebrados. Este grupo o familia de moléculas, tienen en común poseer sitios conservados que ligan iones calcio (Ca^{+2}). Al hacer el análisis estructural entre las CTLs de mamíferos y las de estos nematodos, muestran que estas lectinas contiene 4 de los 5 residuos que ligan Ca^{+2} , por los que en términos funcionales las lectinas de *T. canis* serían similares a las de sus hospederos. La importancia de este trabajo, es que fue el primero que informó sobre genes

que codifican para CTLs en organismos patógenos, los cuales podrían estar orientados hacia una estrategia de inmunoevasión que permitiría a este nematodo sobrevivir por largos periodos en los tejidos de sus hospederos.

Estudios de clonamientos al azar permitieron secuenciar parcialmente 266 clones de cDNA (Tetteh *et al.*, 1999) de larvas infectantes de *T. canis*. Los análisis con bancos de datos disponibles en Internet permitieron identificar 128 genes diferentes, pero de ellos sólo tres representaron nuevos genes. Siete de los clones secuenciados están presentes en una alta frecuencia. El análisis de estos clones mostró que existía una alta producción de mucinas y lectinas tipo-C, las cuales son los más importantes antígenos excretado-secretado relacionados con el parásito. Estudios posteriores lograron identificar una nueva lectina tipo - C denominada TES-70. Al igual que las anteriores, posee una señal peptídica rica en dominios de Cis, y tiene un dominio C- terminal calcio dependiente. Basado en la similitud del dominio C – terminal, de estas proteínas con receptores de las células del sistema inmune del hospedero, los autores postulan que las lectinas tipo - C de *T. canis* pudieran estar implicadas en alguna estrategia de evasión del sistema inmune del hospedero (Loukas *et al.*, 2000a).

La investigación hasta hoy realizada en *T. canis*, mediante la biología molecular, ha apuntado fundamentalmente a la descripción de proteínas recombinantes y su relación con las estrategias de inmunoevasión. Sin duda que poder conocer los mecanismos que usa este parásito para evadir al sistema inmune del hospedero es de gran importancia, pero aún no existen antecedentes concluyentes que prueben dichas estrategias. El poder contar con este tipo de antecedentes podría ser una herramienta muy poderosa para obtener un diagnóstico certero y precoz. En este trabajo el objetivo principal fue intentar aportar información sobre antígenos recombinantes que pudieran estar implicados en las distintas estrategias de evasión de la respuesta inmune y en las manifestaciones de dicha enfermedad parasitaria.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Identificar y caracterizar algunos antígenos recombinantes de *T. canis* para obtener información sobre sus posibles mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Clonar nuevos cDNA que codifiquen para antígenos de *T. canis*.
- 2.- Obtener información sobre la estructura y función de esos antígenos.
- 3.- Subclonar algunos cDNAs en vectores de alta eficiencia de expresión.

MATERIAL Y METODO.

1.- Titulación y rastreo de genoteca de λ Zap-cDNA de *T. canis*: El rastreo se llevó a cabo mediante el uso de una genoteca de expresión de cDNA *T. canis*, la cual fue gentilmente donada por la Dra. Cindy Tripp, de Eska Corp. USA. La genoteca se constituye del vector λ -Zap (Ver Figura 5) que contiene insertos de cDNA obtenidos a partir de mRNA purificados de larvas infectantes. Los vectores se expresaron mediante la infección de bacterias *Escherichia coli* XL1-Blue en placas petri con medio LB en 1,5% agar y detectados con filtros de nitrocelulosa incubados con una mezcla de suero de pacientes con distintas manifestaciones clínicas. Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó un anticuerpo comercial anti IgG humana de conejo conjugada con fosfatasa alcalina. La visualización de estos complejos, antígeno-anticuerpo, se realizó mediante la incubación con los reactivos cromogénicos “nitro-blue- tetrazolium” (NBT) y β -cloroindolil- fosfato (BCIP), los cuales originan una señal violeta. Previo al rastreo de la genoteca, se realizó la titulación de ella para determinar el número de clones por placa que se iban a rastrear. Para ello se sembraron bacterias *E. coli* XL1-Blue en placas petri con medio LB en 1,5% agar, infectándolas con distintas diluciones de los vectores, luego de una incubación de doce horas se realizó el conteo de placas de lisis y se determinó el número de fagos por microlitro (Sambrook *et al.*, 1989).

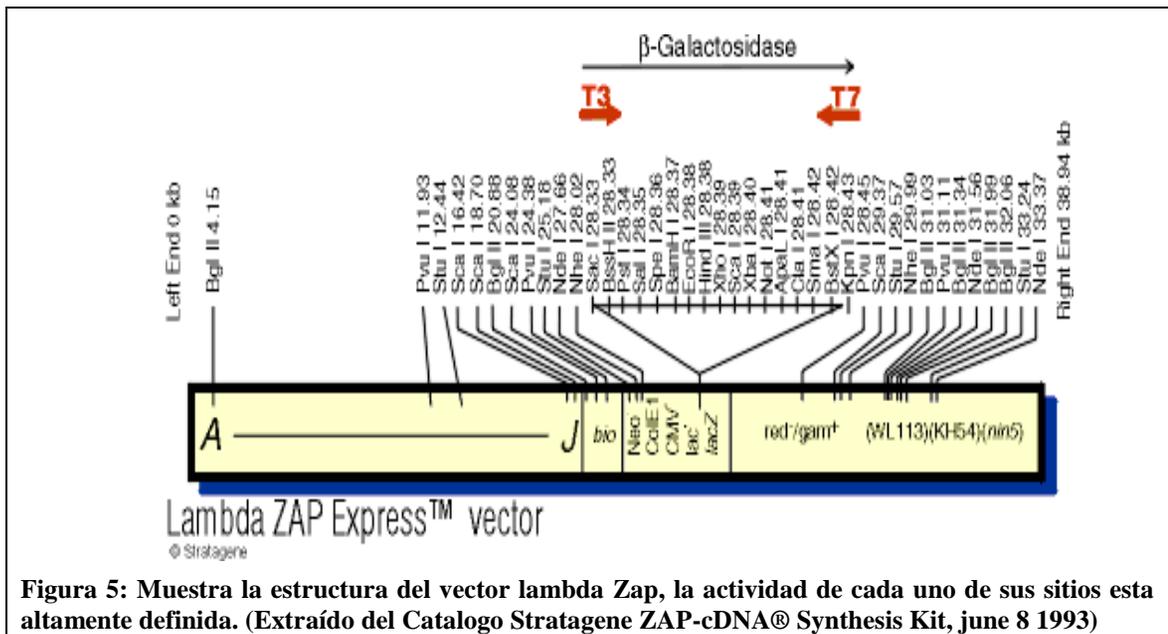


Figura 5: Muestra la estructura del vector lambda Zap, la actividad de cada uno de sus sitios esta altamente definida. (Extraído del Catalogo Stratagene ZAP-cDNA® Synthesis Kit, june 8 1993)

2.- Titulación y purificación de clones aislados:

Los clones aislados se titularon de manera individual según los protocolos de Sambrook *et al.*, (1989). Luego se purificaron a diferentes diluciones en placas petri con medio LB en 1,5% agar. Los clones puros fueron aislados y puestos en 1 ml de solución SM, con 2 gotas de cloroformo y mantenidos a 4°C para su análisis, tal como ha sido descrito (Sambrook *et al.*, 1989).

3.- Análisis de clones de cDNA mediante PCR:

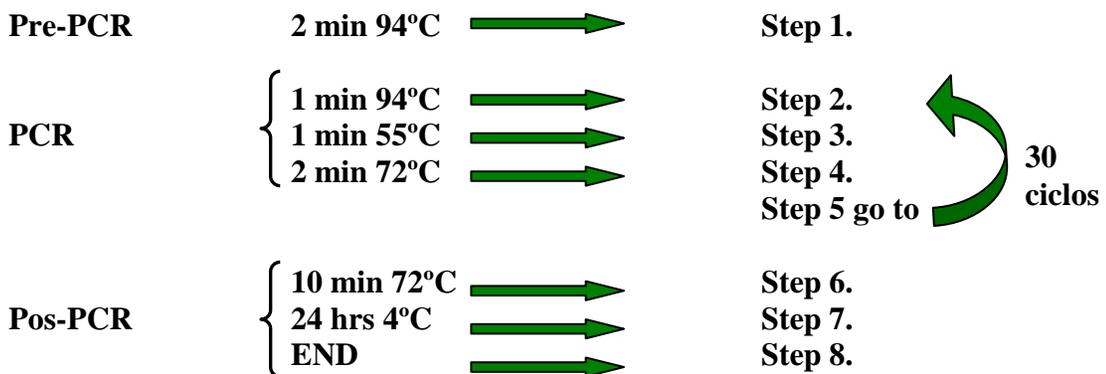
Los clones puros fueron analizados mediante PCR usando partidores aledaños a los sitios de inserción de los cDNAs. Los productos de amplificación nos indicaron el largo de los cDNA y el grado de pureza de cada clon. La secuencia de los partidores utilizados se apoyó en la secuencia del vector, por lo que estos partidores son universales a todos los clones (Ver Figura 6.)

Partidor directo JS1: 5'- GAG| CGG| ATA| ACA| ATT| TCA| CAC| AGG -3'

Partidor inverso JS2: 5'- TCG| TGA| CTG| GGA| AAA| CCC| TGG|C -3'

Figura 6: Indica la secuencia de los partidores universales utilizados para el análisis de los cDNAs mediante PCR.

Para este trabajo se utilizó un termociclador marca MJ-RESEARCH™, con capacidad para analizar 16 muestras paralelamente, el programa utilizado para dar las condiciones de amplificación fue el siguiente:



Para la visualización de los productos de amplificación se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Además, se utilizó un marcador de largo de fragmento tipo “ladder” de 100 de pares de base (pb) (PROMEGA™) y una cámara de electroforesis y fuente de poder Bio - Rad™.

4.- Secuenciación del extremo 5' de algunos clones: Previo a la secuenciación, los productos de PCR fueron purificados mediante un kit comercial (NOVAGEN™), una vez obtenida la elusión se determinó la concentración aproximada de material genético. Para la secuenciación, los productos de PCR fueron enviados a un laboratorio especializado que vende dicho servicio (Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas, Oligopeptidos, de la Fac. de Medicina, U. de Chile). Las secuencias obtenidas se analizaron por Internet mediante el banco de datos del National Center for Biological Information (NCBI) del sistema de salud de Estados Unidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y programas de computación accesibles también por internet, para definir estructura y posible función (BioEdit Sequence Alignment Editor; Hall, 1999), Clustal X (Jeanmougin *et al.*, 1998)). Las secuencias del NCBI utilizadas fueron las siguientes: Tc-ant-095 (gi 2988328), Tc-ant-30 (gi 2670665), K023h06.y1 de *T. canis* (gi 20063457), Tc-ctl-4 (gi 4838458), TES-32/Tc-ctl-1 (gi 2773354), Hsc de *Drosophila simulans* (gi 7715518), nmuc-1/TES-120 (gi 1103868) y L24 de *Drosophila melanogaster* (gi 19921254).

Para poder analizar y comparar las secuencias la NCBI utiliza un programa llamado BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Atschul *et al.*, 1990) el cual entrega un índice denominado “Expect” (“E”), que corresponde a un índice estadístico que indica la probabilidad que dos secuencias comparadas se parezcan solamente por azar. En otras palabras este índice nos da una idea de la probabilidad que dos secuencias sean o no sean homólogas, es decir, que provengan de un mismo gen ancestral. Un valor aceptable de este índice será en un rango igual o inferior a 1×10^{-8} .

5.- Amplificación de los clones: Los clones purificados fueron amplificados mediante protocolos anteriormente descrito (Sambrook *et al.*, 1989), con el objetivo de tener una solución con un elevado título de fagos puros.

6.- Subclonamiento de algunos clones de cDNAs en un vector de alta eficiencia de expresión:

6.1) Preparación de los insertos: Se realizó un gel preparativo con los clones seleccionados, cada banda fue extraída del gel y pesada para su purificación según protocolo, con el Kit Glass Max™ (GIBCO BRL®, company).

6.2) Ligación de los insertos: Se utilizó el Kit “Perfectly Blunt® Cloning Kits” (NOVAGEN, company) del cual se utilizó el vector pETBlue-2 (Ver Figura 7). En las muestras se agregó 1µl del vector y 1 µl de enzima ligasa. Junto con las muestras se usó un control positivo del kit, según protocolo del Kit (Ver Figura 8).

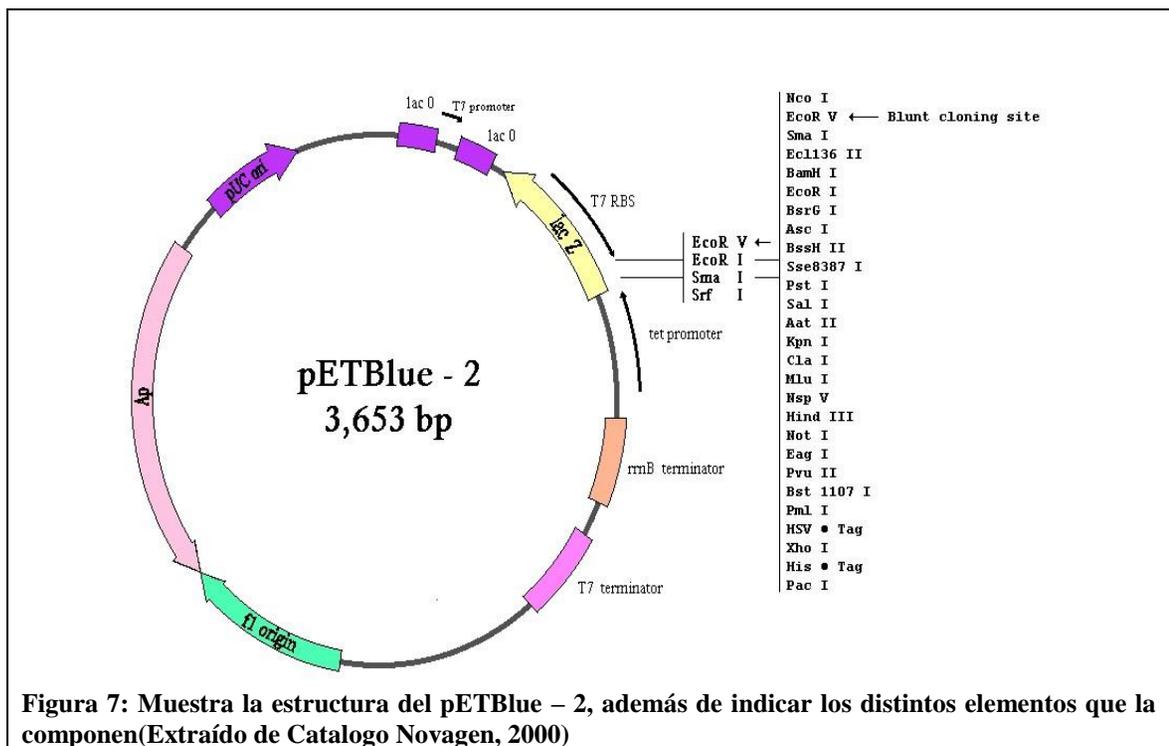


Figura 7: Muestra la estructura del pETBlue – 2, además de indicar los distintos elementos que la componen(Extraído de Catalogo Novagen, 2000)

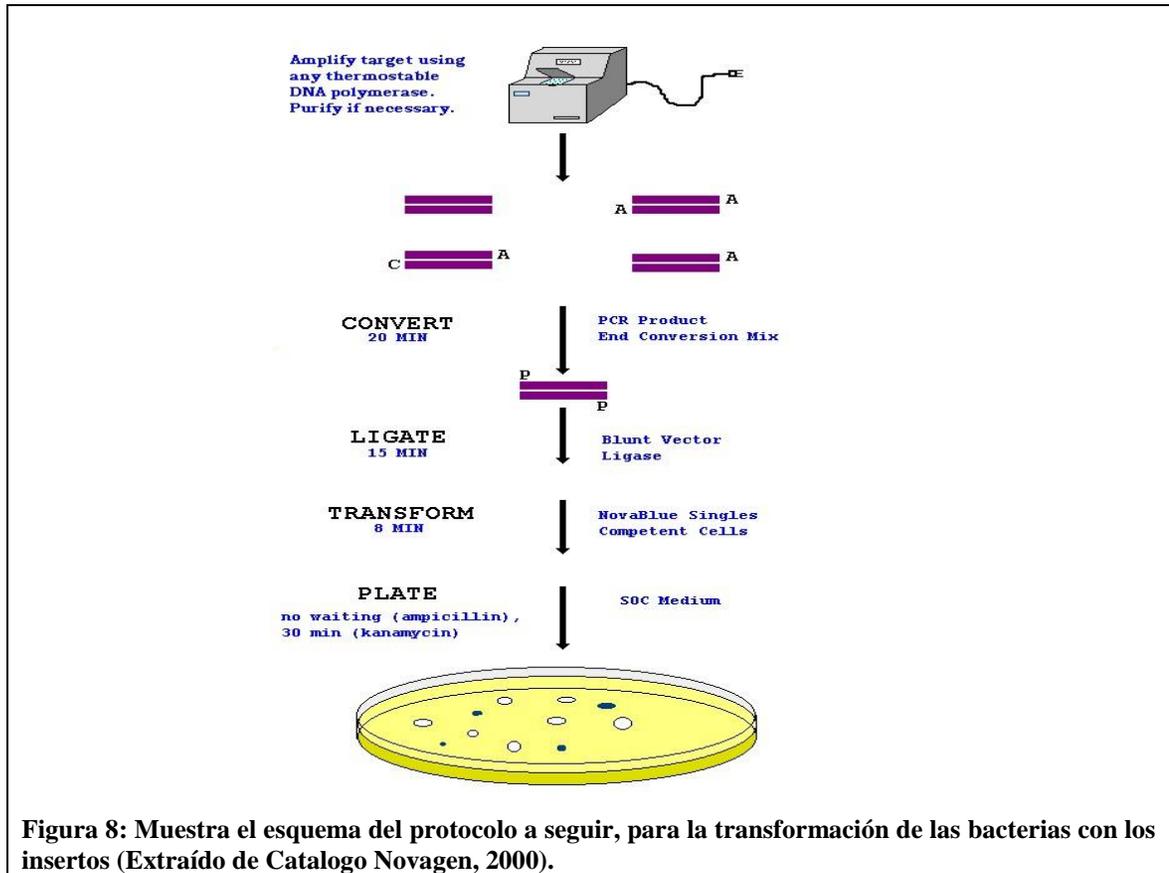


Figura 8: Muestra el esquema del protocolo a seguir, para la transformación de las bacterias con los insertos (Extraído de Catalogo Novagen, 2000).

6.3) Transformación de células competentes: Para la transformación se usaron bacterias competentes del kit denominadas “NovaBlue Singles™”, de cada muestra se tomó una alícuota de 1µl. Además, se agregó una quinta muestra del kit denominada Test Plasmid, cada muestra fue esparcida en placas con medio LB en 1,5% agar más 50 µg/ml ampicilina, 100 mM IPTG y 50 mg/ml X-gal. Se seleccionaron colonias blancas originadas por bacterias transformadas con vectores recombinantes.

6.4) “Colony PCR”: Las colonias transformadas con vectores recombinantes (blancas) fueron analizadas por PCR para confirmar la presencia del inserto y la orientación de ellos. Es decir, evaluar que sus insertos estuvieran en sentido 5’ → 3’. Para ello se utilizaron partidores internos de cada clon seleccionado. Paralelamente cada clon fue analizado con los partidores aledaños al sitio de inserción para asegurar que estos estuvieran en el sentido correcto.

Partidores aledaños:

1) Pet Blue up primer.

Pet – up: 5'-GTC| ACG| ACG| TTG| TAA| AAC| GAC- 3'

2) Clon 02:

TCO2-Dir: 5' –ATG| CAT| GCG| TTA| ACG| ACA| ATG- 3'

TCO2-As: 5' –CAA| CTC| TTG| AGC| CAG| TCT| GTG- 3'

Partidores internos:

1) Clon 01:

C1D-Dir: 5' –G ATA| TCA| GTC| GTC| CTT| GTC| GCT| ATC-3'

C1E-As: 5' -GC| CAG| GGG| CTT| TTT| GCA| TAT|G- 3'

2) Clon 02:

C2D-Dir: 5' –G ATC| GCC| GTA| ATC| GTT| ATT| TTC| CTG- 3'

C2E-As: 5' –AG| AGG| TCT| CTT| GCA| TAT| GAA| GCC- 3'

3) Clon 13-D:

D13-a: 5' –C| TTT| GTT| TCA| GTC| TGC| CTG| AAC| CCG- 3'

D13-b: 5' –GA| GAA| GCC| GCA| CGT| CAG| TGG| GAC- 3'

4) Clon B-7:

B7-Dir: 5' –A CAA| GAT| GTT| GTA| CGA| TCG| TGG- 3'

B7-As: 5' –AG| TTG| ATT| GAT| AGA| CGT| CGG| ATC- 3'

6.5) Purificación de plasmidios por miniprep: Obtención y purificación de los plasmidios con inserto según protocolo del kit “Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System” (GIBCO BRL®, company) y la posterior evaluación de estos en PCR con partidores internos.

6.6) Transformación y expresión de proteína recombinante: Se utilizó bacterias competentes del kit llamadas “Tuner™(DE3)pLacI” (NOVAGEN company) cuya principal característica es la alta expresión de proteína recombinante, pero no es capaz de reconocer todos los tipos de codones de una célula eucarionte. Se colocó 1µl de plasmidio recombinante con 20 µl de las bacterias competentes, luego según protocolo se somete a un “shock” de temperatura a 42°C, se agregó 80µl de medio SOC y se incubó a 37°C por una hora. Finalmente cada muestra fue vertida en 2 placas petri con medio LB 1,5% agar conteniendo ampicilina y cloranfenicol. De cada muestra se sembraron 20 y 50 µl y se cultivaron a 37°C por 12 horas hasta la aparición de colonias.

Junto a las bacterias anteriores se utilizó la cepa “Rosetta™DE3 pLysS Competent Cells” (NOVAGEN company), cuyas características principales son la expresión de proteína en concentraciones moderadas, poseer un plasmidio que contiene información para la lectura de codones desconocidos para la bacteria y que eventualmente podrían generar codones de termino. Además cuenta con una actividad de proteasas disminuidas: Se colocó 5 µl del plasmidio recombinante con 100 µl de bacteria competente, según protocolo se realizó un “shock” térmico, se agregaron 250 µl de medio LB precalentado, luego se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Finalmente, cada muestra fue sembrada en placas petri con medio LB en 1,5% agar conteniendo ampicilina y cloranfenicol. Se cultivaron a 37°C por 12 horas hasta la aparición de colonias. Similar protocolo se aplicó para la cepa de bacteria “RosettaBlue(DE3)pLysS Competent Cells” (NOVAGEN company). Sus principales características son poseer un plasmidio con información para la lectura de codones eucariontes desconocidos para la bacteria, posee alta capacidad de expresión de proteínas, pero la actividad de sus proteasa no se encuentra inhibida.

6.7) Colony PCR de bacterias transformadas: Las colonias transformadas fueron analizadas mediante PCR y partidores internos para detectar la presencia de insertos, tal como se describió anteriormente.

6.8) Preparación de bacterias competentes: Pese a que las distintas bacterias de los Kit vienen competentes, los resultados fueron deficiente por ello se aplicó un protocolo para hacerlas competentes basado en Sambrook *et al.*, (1989).

Las bacterias fueron inoculadas en 5 ml de medio LB con cloranfenicol e incubadas durante 12 horas con agitación constante a 37°C. Se recuperó 300 µl del cultivo y fueron inoculados en 30 ml de medio LB más cloranfenicol, se incubó con agitación constante a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0,4 a 0,5 D_{550} a 550 nm para alcanzar un crecimiento aproximado de 10^8 células por ml. Las bacterias luego fueron centrifugadas a 6.000 g por 10 minutos en centrifuga Sorvall® RC-5B con un rotor pre helado Sorvall®SS-34. Se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 15 ml de 50 mM de Cloruro de Calcio ($CaCl_2$). Se centrifugó, nuevamente a 6.000 g por 10 minuto en las mismas condiciones anteriores.

El sobrenadante fue descartado y el sedimento resuspendido en 1 ó 3 ml de 100mM CaCl₂. Las bacterias se alicuotaron en 100µl y se almacenó a 4°C por 2 a 24 hrs. hasta su uso.

6.9) Cocktail de Inhibidores de Proteasas: Para la expresión de proteína se utilizaron distintas bacterias y paralelamente en los protocolos de algunos de ellas se trataron con inhibidores de proteasas.

El protocolo consistió, en la aplicación de una alícuota del “cocktail” de inhibidores (Ver Cuadro 2) y a la muestra de bacterias recombinantes, antes de ser sometidas a sonicación.

Cuadro 2: “Resumen del protocolo para el cocktail de inhibidores de proteasas.”

Reactivos	Concentración Stock	Para 1 ml	100 µl de muestra
PMSF	0,5 M	2,0 µl	0,20µl
NaHSO ₃	5,0 M	2,0 µl	---
Leupeptina	2,5 mg/ml	2,5 µl	---
Pepstatina (Peps)	1,0 mM	1,0 µl	---
TLCK	0,05 mM	10,0 µl	---
Cocktail	---	---	---
Vol. final sin PMSF	---	15,5µl	1,55µl

7) Análisis con “Western – Blot” (WB) de bacterias transformadas con vectores recombinantes:

Las colonias con insertos positivos, fueron analizadas mediante “Western - Blot” (Harlow y Lane, 1988), para lo cual se realizó la electro - transferencia de proteína a filtros de nitrocelulosa mediante un sistema semiseco (Bio-Rad™). Para la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó un anticuerpo policlonal comercial anti IgG humana de conejo, conjugada con fosfatasa alcalina. La visualización de estos complejos antígeno-anticuerpo, se realizó mediante la incubación con los reactivos cromogénicos NBT y BCIP, los cuales originan una señal cromogénica de color violeta. Inicialmente las muestra fueron analizadas con una mezcla de sueros de pacientes, el cual abarcaba el universo total de cuadros clínicos descritos. Una vez detectada la expresión de proteína recombinante, usando la mezcla de suero de pacientes con toxocarosis, se pretendió realizar un análisis con sueros individuales, según cuadro clínico, con otros sueros de pacientes infectados con otros parásitos, y finalmente con sueros de pacientes aparentemente sanos.

RESULTADOS.

1.- Titulación y rastreo de genoteca de λ Zap-cDNA de *T. canis*: Se realizaron cuatro rastreos en los cuales el protocolo sufrió pequeñas variaciones hasta lograr optimizar la técnica, el primer rastreo logró detectar solo 2 clones los cuales fueron codificados como I.1.1 y I.1.2, donde el número romano indica el rastreo, el segundo número a la placa petri del cual fue extraído, y el tercero nos indica el número ordinal en el que fueron extraídos de la placa.

Debido a los pobres resultados se realizó un segundo rastreo en el cual no se realizó ninguna modificación. Los resultados obtenidos en este rastreo no fueron positivos, esto llevó a la reevaluación del protocolo y su consiguiente modificación. En primer lugar se optimizó la pre – absorción de la mezcla de suero a utilizar y su chequeo por “Dot – Blot” según Sambrook *et al.*, (1989). El objetivo de esto fue disminuir la reacción antígeno-anticuerpo de la mezcla de sueros en contra de la bacteria. En segundo lugar se aumentó al doble la cantidad de fagos por cada placa petri (de 2.000 a 4.000 y 4.000 a 8.000 fagos). También, se aumentaron los tiempos de espera de aparición de las placas de lisis, de 4 a 8, horas para asegurar la presencia de estas. En la fase de tratamiento de los filtros de nitrocelulosa, se aumentó la incubación de estos de 2 a 3 horas. Con estas modificaciones se realizó un tercer rastreo el cual arrojó resultados erráticos debido a que las señales del segundo filtro (duplicado) no fueron concordantes con el primero.

A la luz de dichos resultados, se volvió a reevaluar el protocolo. La primera modificación fue aumentar la concentración de fagos a 8.000 y 16.000 fagos. La segunda modificación fue, esperar la aparición de las placas de lisis hasta que estas fueran absolutamente evidentes. Esto ocurrió después de 8 horas 30 minutos de incubación a 37°C. Los tiempos de tratamiento y revelados de los filtros se aumentaron en 1 hora. El resto de las modificaciones hechas en el tercer rastreo, fueron mantenidas para la realización de un cuarto rastreo.

Los resultados del cuarto rastreo fueron altamente positivos, debido a que ambas placas rastreadas, la de 8.000 y 16.000 fagos/placa petri, tuvieron un alto número de clones positivos. La alta concentración de fagos nos llevó a tomar la decisión de escoger 100 clones totales. Los criterios para aislar los clones fueron:

_La señal debió ser única y concordante en ambos filtros puestos en cada placa petri.

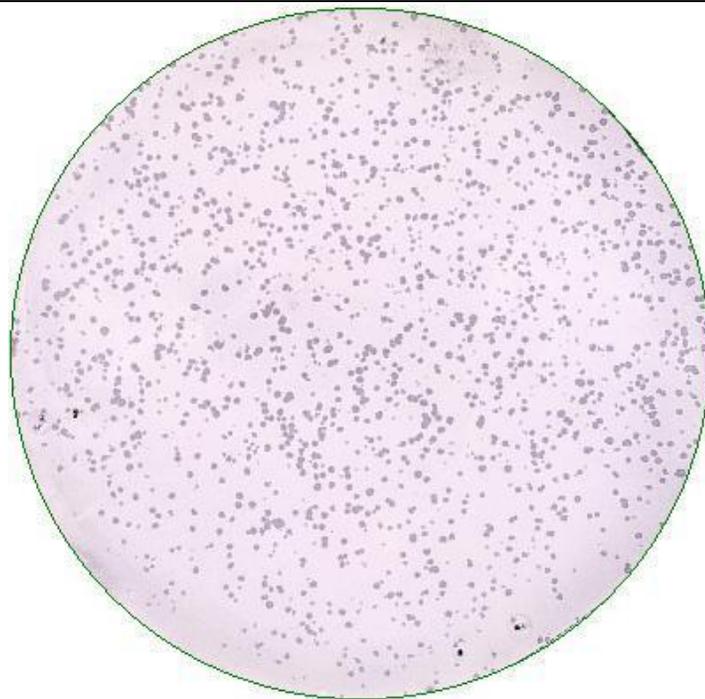
_La señal reconocida en ambos filtros de nitrocelulosa debe coincidir con una placa de lisis en la placa petri.

_La reacción antígeno-anticuerpo debe presentar una señal de color violeta intenso en el filtro.

_El clon para ser aislado debe estar completamente separado de otros clones.

La Figura 9A muestra el primer filtro de la placa petri con 8.000 fagos. En ella se puede observar con más facilidad las señales violeta que se encuentran separadas entre sí a mayor distancia. En la Figura 9B, se muestra el primer filtro de la placa petri con 16.000 fagos. En este filtro, si bien la presencia de clones positivos es evidente, estos se encuentran en mayor concentración, lo que dificultó el aislamiento de clones desde esta placa petri. Por ello, se tomó la decisión de aislar solo 30 clones desde esta placa y el resto hacerlo desde la placa petri de 8.000 fagos.

A



B

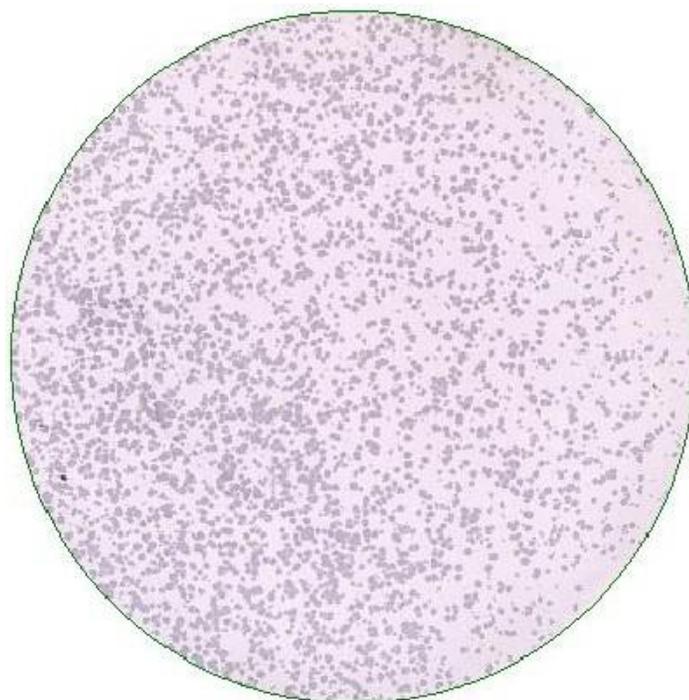


Fig. 9. Detección de antígenos recombinantes de *T. canis* mediante una mezcla de sueros de pacientes con toxocarosis.

(A) Placa petri con 8.000 fagos, (B) Placa petri con 16.000 fagos.

2.- Titulación y purificación de los clones aislados:

De los 100 clones aislados se decidió purificar 16, previamente estos fueron titulados. Con este antecedente cada clon fue colocado en dos placas petri, una con 100 fagos y otra con 200, el objetivo era tener los fagos bien separados entre sí, para poder aislarlos y purificarlos. El criterio aplicado para cada clon fue el de rescatar 6 a 8 placas de lisis por clon titulado. Cada clon fue aislado de su respectiva placa petri con la porción de agar en el que se encontraba, de acuerdo al protocolo definido.

3.- Análisis de clones de cDNA mediante PCR:

Los resultados fueron satisfactorios debido a que el grado de pureza alcanzado en todos los clones fue bueno, ya que en todos se obtuvieron bandas únicas sin productos de amplificación secundarios. Es importante señalar que, varios clones que fueron aislados y purificados de una misma placa de lisis, mostraron distintos tamaños (pb). Esto probablemente se debió a contaminación con otras placas de lisis muy cercanas.

En la Figura 10 se observan los aislados del clon 4.1.5, en los carriles 3 al 8, donde los cinco primeros coinciden en tamaño y el último, es distinto. En los carriles 9 al 13 se encuentra el clon 4.1.6 el cual presentó gran variación de tamaño e inclusive en uno de los carriles (carril 9) no presentó amplificación de DNA. El Cuadro 3 se resume el total de los clones de cDNAs que fueron analizados mediante PCR y posteriormente seleccionados para ser secuenciado.



Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de PCR de dos grupos de clones de *T. canis* seleccionados.

Carril 0 ladder, carril 1 clon 01, carriles 2 al 8 corresponden al aislado 4.1.5, carriles 9 al 13 corresponden al aislado 4.1.6.

Cuadro 3: “Clones de cDNA que codifican para antígenos recombinantes de *Toxocara canis*”.

N°	Clon	Tamaño (pb)	Seleccionado secuenciación
1	Clon 01	>1500	+
2	Clon 02	>1500	+
3	B5	> 1500	+
4	D3	“	+
5	D6	“	
6	D7	“	
7	E4	“	+
8	E5	“	
9	E7	“	+
10	E8	“	
11	B12	1500	+
12	B13	“	+
13	B14	“	
14	B15	“	
15	C9	“	+
16	A2	> 1200	+
17	A6	“	+
18	A9	1200	+ (en espera)
19	C3	“	
20	G11	“	
21	G13	“	+
22	H11	“	
23	A3	1100	+
24	A4	“	
25	A8	“	
26	B8	“	
27	B9	“	
28	B11	“	
29	G12	“	
30	G14	“	
31	A12	950	
32	A13	“	
33	A14	“	+
34	A15	“	
35	B4	“	
36	C4	“	
37	H4		
38	C11	800	+
39	C13	700	+
40	G9	“	
41	H2	“	
42	H9	“	
43	H12	“	
44	H13	“	
45	A5	680	+
46	H7	600	
47	H8	“	
48	G6	550	+
49	B7	500	+
50	H10	“	
51	C12	480	+
52	D12	“	
53	D13	“	+
54	D15	“	
55	D16	“	
56	D10	450	+
57	E3	“	+
58	E6	“	
59	E9	“	
60	E10	“	
61	E11	“	
62	E12	“	
63	B6	400	
64	G3	“	
65	G4	“	
66	G5	“	+
67	G7	“	
68	B3	250	+
69	C14	“	+
70	H5	“	
71	H6	“	
72	B10	200	
Totales: 72		---	26

Los insertos de mayor frecuencia fueron de: 1.200, 1.000, 700, y 250 pb (Ver Cuadro 4). El rango de los insertos encontrados oscilo entre mayores a 1.500 pb hasta 200 pb. Para este análisis solo se consideraron aquellos clones aislados en eventos independientes uno de otro, a fin de evitar el considerar copias de un mismo clon.

Cuadro 4. “Frecuencia de cDNAs de *T. canis* de igual tamaño que codifican para antígenos recombinantes*

Tamaño (expresado Pares de Base)	Número	Porcentaje
> 1.500	3	7,3
1.500	2	4,9
>1.200	1	2,4
1.200	4	9,8
1.100	1	2,4
1.000	4	9,8
950	3	7,3
900	1	2,4
800	1	2,4
700	4	9,8
680	1	2,4
600	2	4,9
550	1	2,4
500	2	4,9
480	2	4,9
450	2	4,9
400	2	4,9
250	4	9,8
200	1	2,4
Totales.	41	100%

*Solo se consideraron aquellos clones aislados en eventos independientes uno de otros, a fin de evitar el considerar copias de un mismo clon.

4.- Secuenciación del extremo 5’:

Para la secuenciación se seleccionaron 26 clones los cuales fueron elegidos de acuerdo al tamaño, la intensidad de la banda y grado de pureza en el PCR. Para estar completamente seguros que los clones elegidos eran realmente de diferentes tamaños, se corrieron todos juntos en una misma electroforesis (Ver Figura 11). La Figura muestra una serie de 19 clones analizados en los cuales encontramos clones con distintos tamaños y donde algunos de estos coinciden en tamaños, de este grupo analizado fueron enviados a secuenciar los clones A-3, A-5, A-14, B-3, B-7, C-3, D-10, D-13.

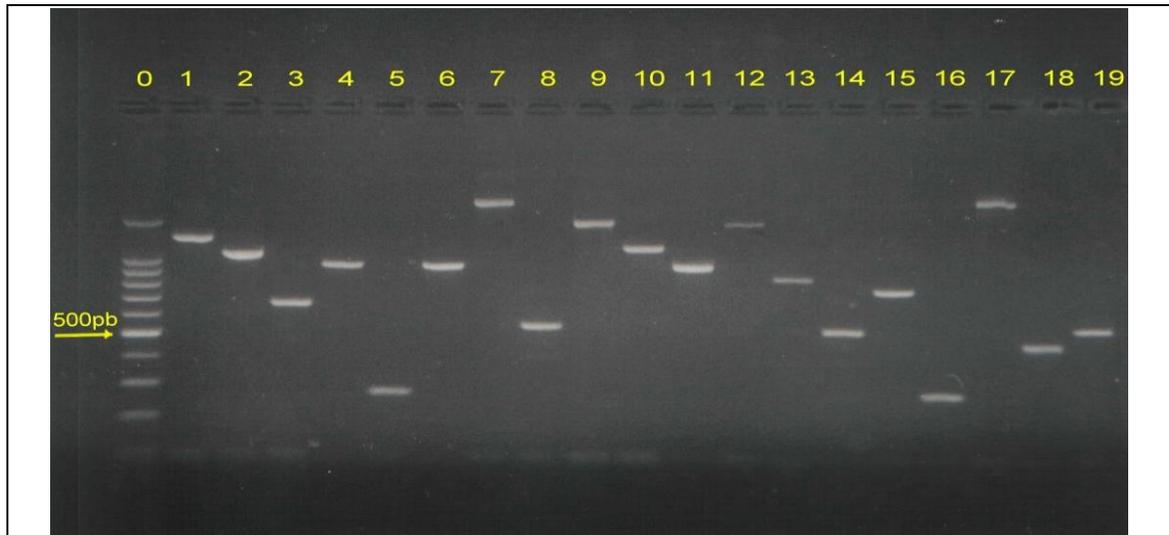


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de PCR de clones de *T. canis* evaluados para secuenciación.

Carriles 0 al 19 corresponden a: ladder, clon A-2, clon A-3, clon A-5, clon A-14, 6 clon B-3, clon B-4, clon B-5, clon B-7, clon B-12, clon C-3, clon C-4, clon C-9, clon C-11, clon C-12, clon C-13, clon C-14, clon D-3, clon D-10, clon D-13.

Los clones seleccionados fueron secuenciados usando el partidor JS1 y los resultados de estas secuenciaciones fueron analizados con distintos programas computacionales entre ellos “BioEdit Sequence Alignment Editor”, con el cual las secuencias fueron preparadas para los posteriores análisis. Las secuencias oscilaron entre 500 a 909 nucleótidos, de los cuales la lectura confiable era sólo unos 300 a 500 nucleótidos.

La selección de las secuencias de cDNAs se realizó ubicando los sitios de inserción de las secuencias, es decir, la ubicación del partidor directo de la genoteca y el sitio de poliadenilación del cDNA. Una vez localizados los sitios de inserción, se procedió a dejar exclusivamente la secuencia correspondiente al inserto, la cual posteriormente fue sometida a diferentes análisis con un banco de datos en línea localizado en www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi. Por ejemplo, en el Figura 12 se puede observar todo el segmento secuenciado del clon B-7, usando el partidor universal JS1. La localización del comienzo del inserto se logró, ubicando el partidor usado en la construcción de la genoteca (GAATTCGGCACGAG) destacado en amarillo. El extremo 3’ del inserto se localizó, ubicando el segmento de poliadenilación y sus correspondientes señales (destacadas en verde).

Cuadro 5. “Resultado del análisis de secuencias de *T. canis* mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool.*

N°	Código Clon Aislado	Posibles Secuencias Homologas	Score	Expect
1	Clon – 01	<i>Toxocara canis</i> C – type lectin Tc-ctl 4 mRNA, complete cds, length 1044	751	0,0
2	Clon – 02	<i>T. canis</i> excretory/secretory C type lectin TES – 32 (tes 32) mRNA, complete	619	10^{-174}
		<i>T. canis</i> mRNA for proteoglycan core protein, partial.	583	10^{-163}
		<i>T. canis</i> C type lectin Tc – ctl – 4 mRNA, complete	87	4×10^{-14}
3	Clon A – 3	<i>Drosophila simulans strain sim8</i> heat shock cognate protein 70 (Hsc70) gene, partial cds.	190	10^{-45}
4	Clon A – 6	Proteína ribosomal mitocondrial L24 Drosophila sp	47,7	10^{-4}
5	Clon A – 14	<i>Toxocara canis</i> surface coat glycoprotein TES-120 precursor (nmuc-1) mRNA, complete cds	69,9	5×10^{-09}
6	Clon B – 3	No se encontró secuencias relacionadas	---	---
7	Clon B – 7	Similar Tc – ant – 095 (abundant novel transcrip: ant)	502	10^{-39}
8	Clon B – 13	Similar Tc – ant – 30 (abundant novel transcrip: ant)	---	10^{-41}
9	Clon C – 3	No presenta inserto	---	---
10	Clon D – 10	K023h06.yl <i>Toxocara canis</i> (transcrito de parásito adulto de <i>T. canis</i>)	175	10^{-41}
11	Clon D – 13	<i>Toxocara canis</i> Surface coat glicoprotein, TES – 120 precursor (n muc – 1) mRNA, complete cds, length 750	750	10^{-143}
		<i>Toxocara canis</i> excretory / secretory mucin MUC – 2 (mus – 2) mRNA, complete cds, length 780	149	3×10^{-33}
		<i>Toxocara canis</i> excretory / secretory mucin MUC – 4 (mus – 4) mRNA, complete cds, length 791	83,8	10^{-13}
12	Clon E – 7	No se encontró secuencias relacionadas	---	---

* Los códigos (gi) de cada una de las secuencias del banco de datos, se encuentran en Materiales y Métodos.

Para el análisis más detallado, de algunas secuencias se procedió a realizar alineamientos múltiples usando el programa Clustal-X (Jeanmougin, *et al.*, 1998).

El análisis del banco de datos mostró que el clon 01 presentaba un “Score” de 751 en relación con un mRNA de *T. canis* identificado como “C – type lectin Tc-ctl 4” de un largo aproximado de 1044 pb, la realización del alineamiento mediante Clustal-X con un segmento de la secuencia nucleotídica mostró que el grado de similitud evaluado hasta las 395 pb aproximadamente era muy alto con sólo una variación en la ubicación 348, donde el clon – 01 presenta una citosina en vez de una adenina (Ver Figura 13).

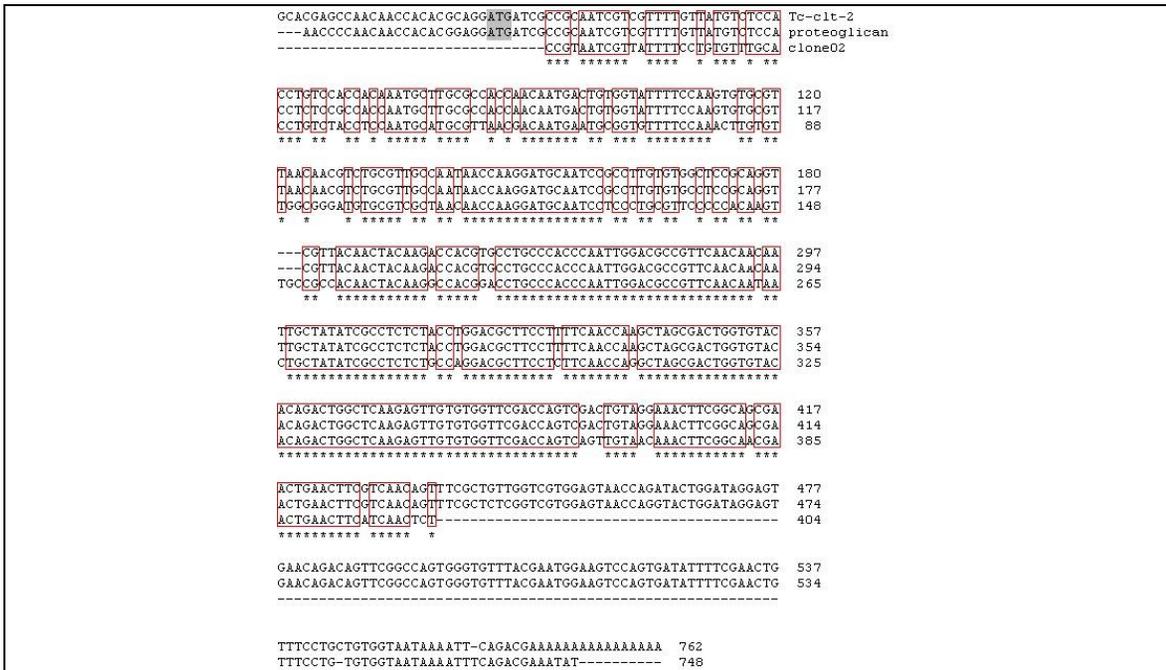


Figura 15: Muestra el alineamiento de secuencias nucleotídica entre mRNA *T. canis* para proteoglycan protein, *T canis* lectina tipo - C Tc – ctl – 2 y el clon – 02.

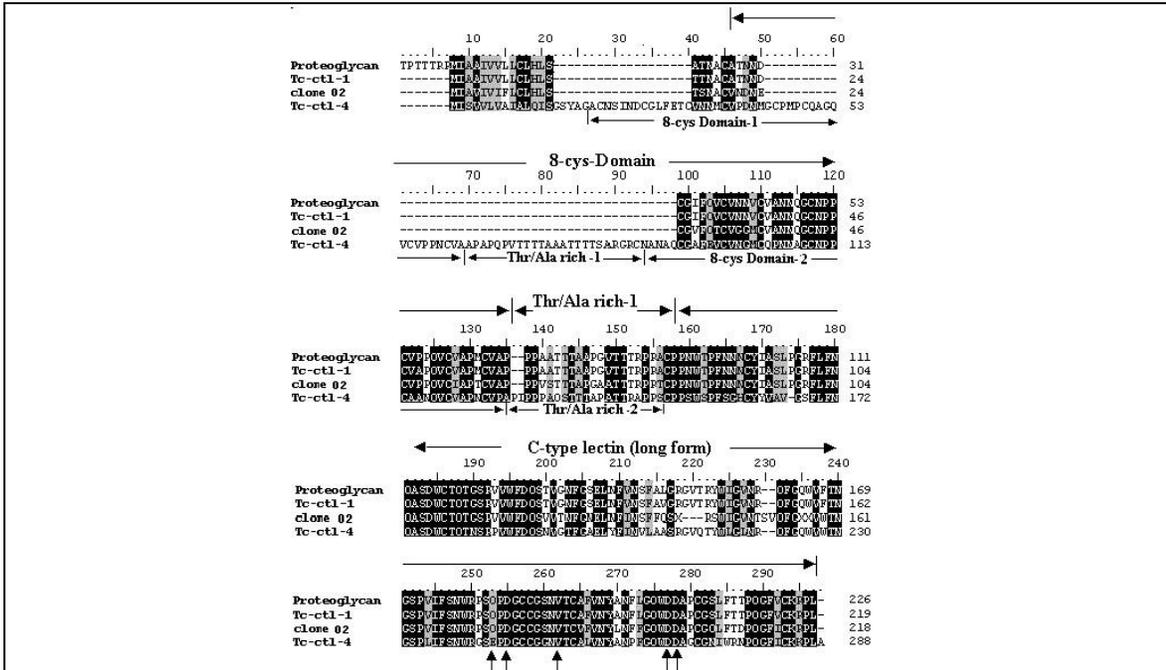
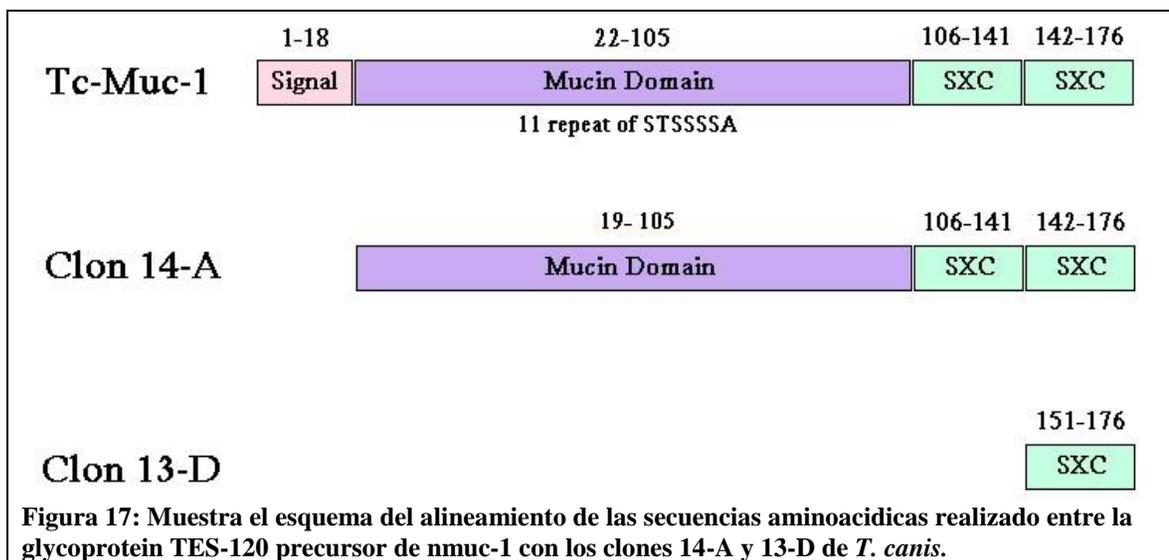


Figura 16: Muestra el alineamiento de secuencias aminocídicas entre mRNA *T. canis* para proteoglycan protein, *T canis* lectina tipo - C Tc – ctl – 1 y *T canis* lectina tipo - C Tc – ctl – 4 con el clon – 02.

Los clones A-14 y D-13, al ser analizados mostraron estructuras similares con un grupo de moléculas denominadas mucinas, para hacer el alineamiento de los clones se decidió compararlos con la glycoprotein TES-120 precursor de nmuc-1, la cual presenta similitudes con ambos clones. El alineamiento con las secuencias aminoacídicas, mostró que el clon A-14 presentó gran parte de los sitios conservados propios de este tipo de moléculas. Por el contrario, el clon D-13 sólo presenta un sitio perteneciente a los motivos de SXC. Esto probablemente se deba a degradación de los mRNA durante la obtención del cDNA (Ver Figura 17).



5.- Subclonamiento de algunos cDNAs de *T. canis* en un vector de alta expresión:

5.1) Amplificación de clones 01, 02, D-10 y B-7 con partidores internos: De los clones que fueron secuenciados y analizados se tomó la decisión de intentar expresar 4 clones, los cuales fueron evaluados con sus partidores internos que previamente se enviaron a sintetizar. Los resultados mostraron que los partidores fueron eficientes en 3 de los 4 clones. Con esto se decidió descartar el clon no detectado (clon D – 13) el que posiblemente no fue amplificado o fue teñido muy poco con bromuro de etidio, debido a su pequeño tamaño (70 pb aprox.) (Ver Anexo 1).

5.2) Purificación de productos de PCR de clones 01, 02, B-7: Los productos de PCR obtenidos en el paso 5.1, se sometieron a electroforesis en un gel preparativo (Anexo 2). En cada carril se observa claramente una ancha banda única, correspondiente a cada inserto.

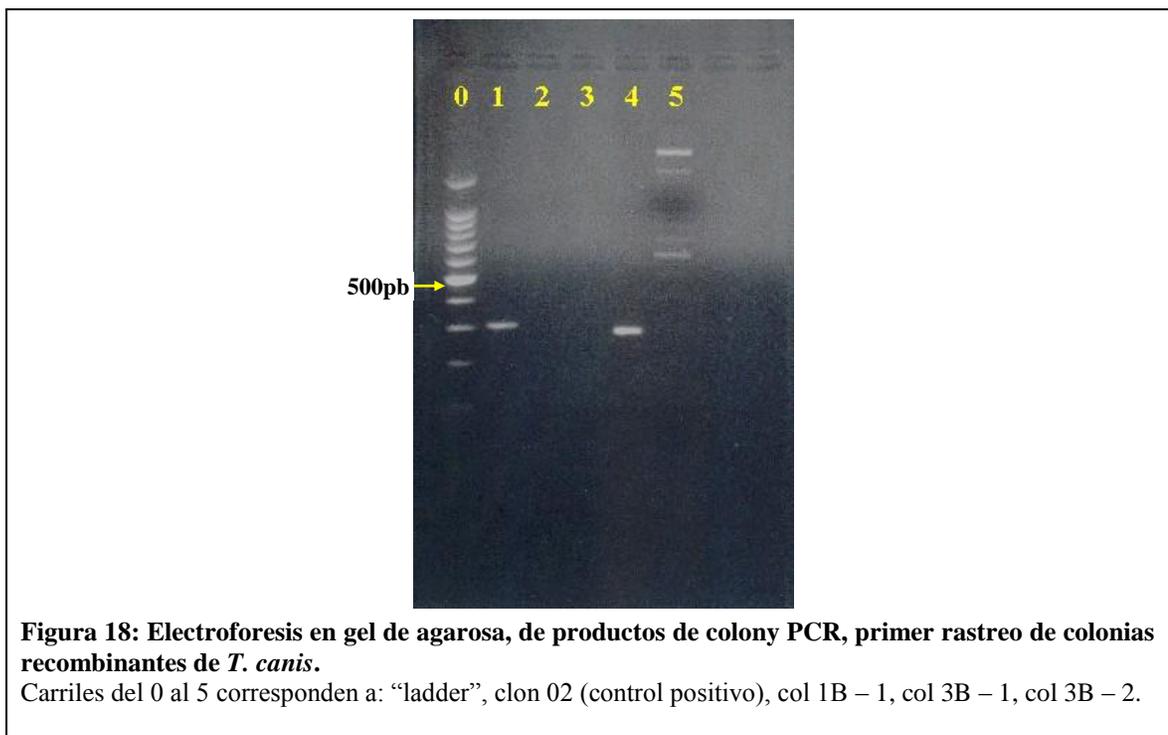
Cada banda del gel (Anexo 2) fue cortada y el DNA presente en ellas, fue sometido a purificación mediante un kit comercial (Glass MaxTM). En el caso del clon B – 7, se tomó la decisión de hacer 2 eluidos desde la resina con 50 µl cada uno para asegurar que se recuperaría el máximo de material genético. Una vez terminado el procedimiento, se chequeo el material mediante PCR, el cual se observa en el Anexo 3, en ella las bandas de los tres clones analizados se ve claramente, en el caso del clon B-7 (carriles 3 y 4) fue evaluado utilizando la primera y segunda elusión, debido a que la banda expresada en el PCR usado en la preparación de los insertos (Ver Anexo 2) fue el que presentó menor intensidad y por ende existía la posibilidad no tener mucho material genético. El objetivo del chequeo, fue verificar el rendimiento de la purificación, tamaño de los insertos y, el grado de pureza.

5.3) Ligación de los insertos: Previo a esta etapa, los insertos se sometieron a una reacción de “End Conversión” para eliminar la adenina que pudiera entorpecer la ligación, luego se realizó la ligación de acuerdo al protocolo del kit.

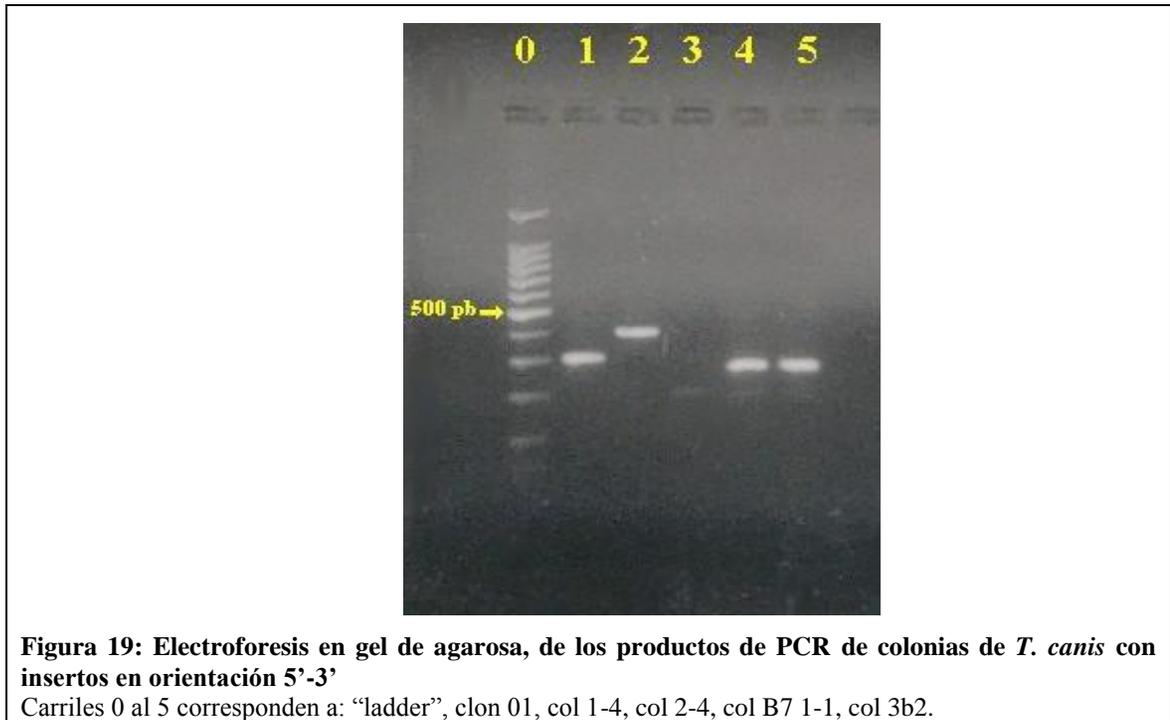
5.4) Transformación: Se realizó según protocolo establecido utilizando la bacteria “NovaBlue SinglesTM Cell Competens” (Ver Anexo 4). Los resultados en la primera transformación, dio colonias positivas en el clon – 01 y clon B – 7. Estos fueron posteriormente analizados por PCR de colonias.

Debido a los resultados obtenidos se decidió repetir el ensayo al día siguiente desde el paso 3, ya que las alícuotas sobrantes fueron almacenadas a 4 °C. Los resultados en este caso, fueron más satisfactorios. Se logró obtener 4 colonias del clon 01, de las cuales una fue de un color celeste claro por los que se decidió considerarla como positiva. Del clon 02 y B-7 se aislaron 5 colonias, respectivamente.

5.5) “Colony PCR”: Se analizaron las colonias col 1B-1 (clon 01), col 3B-1 y col 3B-2 (clon B7), mediante el partidador universal directo Pet-up, aledaño al sitio de inserción y los partidores inversos C1E-AS y B7-AS, respectivamente. Además, se incluyó como control positivo al clon – 02, con sus partidores TCO2 (Dir) y TCO2 (AS). Se observó un producto de amplificación correspondiente a la colonia 3B-2 perteneciente al clon B – 7 con una banda de aproximadamente 400 pb (Figura 18 carril 4). El análisis del segundo grupo de colonias aisladas, dió 4 positivas (Carriles 5 ,9 ,10 y 11) correspondiente a las colonias 1-4, 2-4, 2-5 y B7 1-1 respectivamente. Las colonias que presentan insertos.



Finalmente, se realizó un PCR para re-evaluar la presencia de los insertos antes de prepararlas para la transformación. Para ello se utilizó como partidador directo Pet-up para todas las colonias y sus respectivos partidores inversos C1E-AS, C2E-AS, B7-AS. Además se consideró el uso del clon 02 con los partidores TCO2-Dir y TCO2 As, como control positivo. Tal como se observa en la Figura 19, no se detectó ningún producto de amplificación de la colonia 2-4, debido a esto se decidió repetir el PCR, para este clon con resultados positivos, por lo que fue considerado en la purificación de plasmidios (Ver Anexo 5 carril 3).



5.6) Purificación de plasmidios por miniprep:

Se realizó según protocolo establecido en el kit Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System (GIBCO BRL®, company). La purificación se evaluó por PCR, con los partidores antes señalados. Los resultados fueron satisfactorios para todas las colonias (Ver Anexo 5). El producto obtenido fue en alta concentración y en la corrida electroforetica se observó que estas eran de gran tamaño por lo que migraron muy poco. Las dos bandas de DNAs se deben a plasmidios en distinto grado de sobreenrollamiento (relajado y superenrollado).

6) Intentos de expresión de proteínas recombinantes de *T. canis*, codificadas por las construcciones: p 1-4, p2-4, p2-5, p3b-2 y pB7-1-1.

6.1) Uso de distintas cepas de bacterias *E. coli* para expresar proteínas recombinantes:

En este proceso se realizaron varios intentos, para lograr transformar las cepas de bacterias apropiadas. Durante esta etapa, el protocolo inicial (Anexo 6) sufrió pequeñas modificaciones con el objeto de mejorar la transformación.

a) Transformación de bacterias Tuner™ (DE3) lacL con plasmidios recombinantes.

1ª Transformación: Los plasmidios recombinantes utilizados fueron los cinco seleccionados en el paso anterior, es decir los plasmidios: p1-4, p2-4, p2-5, p3b-2, pB7-1-1. Junto con ellos se agregó una sexta muestra que era un plasmidio control que pertenecía al kit y cuyo objetivo era evaluar el grado de competencia de las bacterias utilizadas (Tuner™ (DE3)lacL). El protocolo se desarrolló según la Anexo 6, y utilizando 2 placas petri por colonia, las cuales se sembraron con 10 y 50 µl, respectivamente, de la mezcla de bacterias competentes más los plasmidios con los insertos. Estas fueron incubadas a 37° C durante 14 hrs. Los resultados obtenidos en este rastreo fueron negativos. En el caso del plasmidio control se observó que este tuvo una respuesta moderada con la formación de colonias. Debido a esto se decidió repetir el ensayo pero aumentando el volumen de la solución de bacterias competentes mas plasmidios con insertos.

2ª Transformación: Para este ensayo se decidió mantener el protocolo según Anexo 6 y considerando a los mismos plasmidios de la 1ª transformación, pero aumentando el volumen de sembrado por placa petri. En la placas A se sembró 20 µl y en la B 80 µl, los cuales fueron esparcidos en la superficie de cada placa.

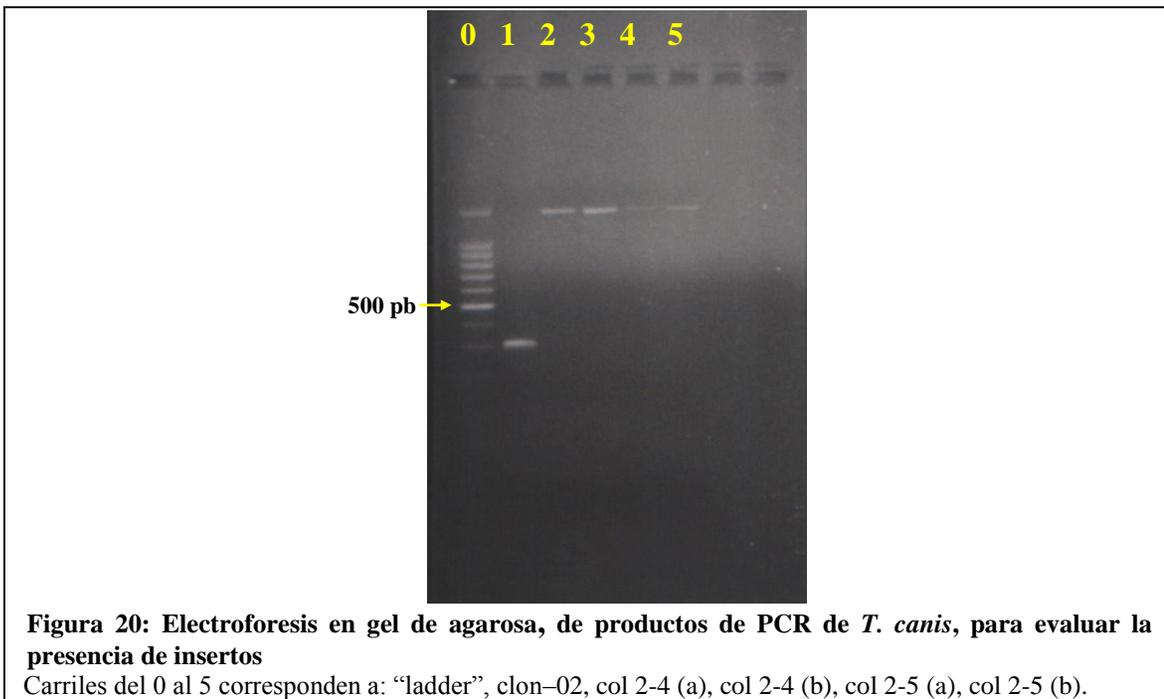
3ª Transformación: Previamente se realizó un protocolo para preparar bacterias competentes basado en Sambrook et al., 1989.

Usando los mismos plasmidios de la 2ª transformación, se hicieron modificaciones usando un mayor volumen de plasmidios (3 µl) y bacterias (100 µl). El primer tratamiento en frío de la solución de bacterias competentes más plasmidios, se aumentó de 5 minutos a 30 minutos y el volumen de siembra se aumento a 150 µl en la placa petri B.

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron satisfactorios, ya que de los cinco plasmidios seleccionados, en dos de ellos correspondientes al clon – 02 se detectaron bacterias transformadas (2 colonias de cada uno respectivamente).

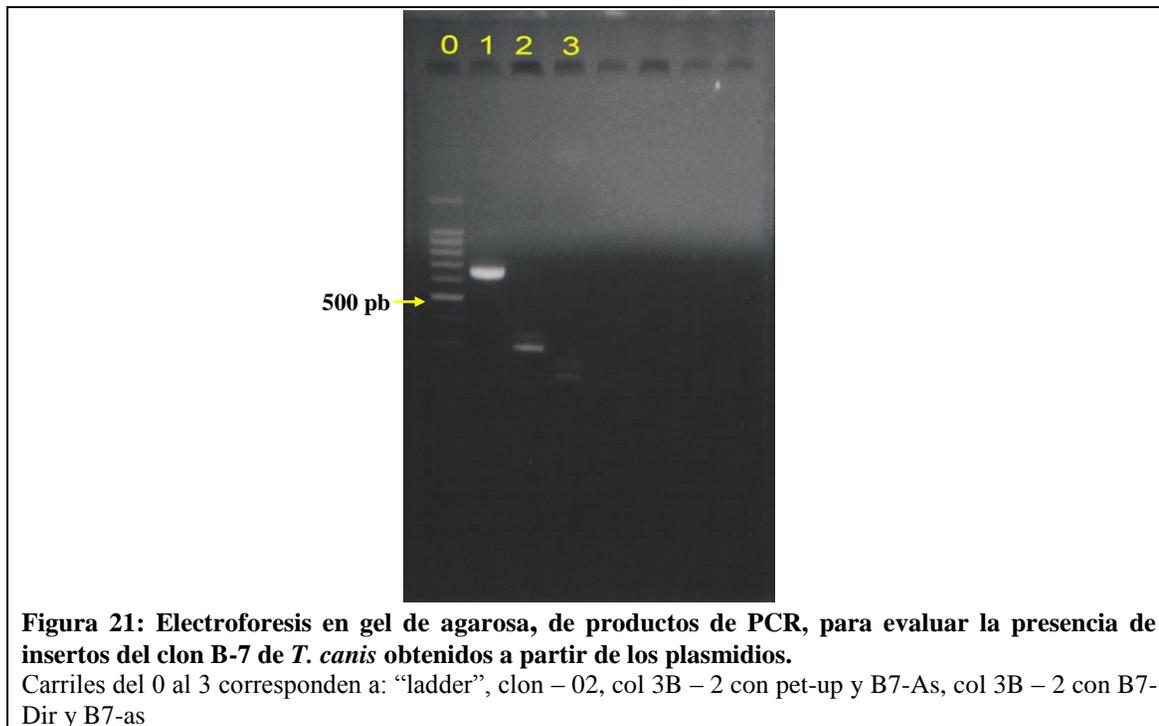
Para la evaluación de estas colonias se realizó un “colony PCR” usando como partidor directo a Pet-up y como inverso al C2E-AS, este confirmó la presencia de los insertos (Ver

Figura 20). Se utilizó como control positivo al clon – 02 en el carril N° 1 con partidores internos (TCO2-Dir y TCO2- As), las bandas de las 4 colonias pertenecientes al clon – 02 migraron de la misma forma. Es importante destacar que el tamaño de los insertos de las colonias aisladas son más grandes que el tamaño del clon – 02, debido a que el extremo 5' del pet-up está a 90 nts, río arriba del sitio de inserción.



4ª Transformación usando plasmidio p3b-2: Después del intento de expresión de proteínas del clon-02 en bacterias Tuner™ (DE3) pLacI, se decidió hacer un último intento de transformar estas bacterias con el clon B-7. El protocolo fue modificado en el número de muestras.

El resultado de esta transformación dió una colonia positiva en la placa petri B, al usar 6 µl de plasmidios El resultado del análisis, de estas colonias, mediante PCR, se muestra en la Figura 21. Para determinar la orientación del inserto se usó un partidior directo universal (Pet-up) y un partidior interno inverso (B7-AS). Para determinar el largo del inserto, se usaron dos partidiores respectivos (B7-Dir y B7-AS). Los resultados de PCR mostraron que el plasmidio p3b-2 presenta un inserto.



b) Transformación usando bacterias Nova BlueSingles™ Competent Cells para capturar nuevas construcciones a partir del clon 01 y 02.

5º Transformación: Previo al uso de las bacterias Rosetta (DE3) pLysS, se realizaron nuevas ligaciones para obtener nuevos plasmidios conteniendo los clones 01 y 02. Para detectar estos nuevos plasmidios se emplearon bacterias Nova Blue Singles™, de acuerdo a protocolos descritos anteriormente. El resultado obtenido en esta transformación fue exitoso (Ver Cuadro 6).

Cuadro 6: Resultado de la 5ª transformación usando células Nova Blue Singles™ Competent Cells”.

Placas petri evaluadas.	µl sembrados	Número de colonias positivas	Total de colonias positivas
Clon – 01 placa petri A	20	3	33
Clon – 01 placa petri B	80	30	
Clon – 02 placa petri A	20	1	60
Clon – 02 placa petri B	80	59	

Para el análisis por “colony PCR” se evaluaron las 33 colonias aisladas del clon – 01 y 34 colonias del clon – 02, estas fueron analizadas tanto con partidores aledaños como internos. Se comenzó evaluando primero las colonias con un partidador directo aledaño y uno inverso interno, para determinar que los plasmidios contaban con insertos. Luego aquellas colonias que eran detectadas, fueron re-analizadas con un partidador directo interno más un partidador inverso interno. El código usado para denominar las colonias de cada clon fue primero el número (1 ó 2) que indica a que clon pertenece, la letra A o B para indicar la placa petri de la cual fue extraída y finalmente otro número que enumera a la colonia aislada.

Producto del “colony PCR” fueron preseleccionadas 6 colonias del clon – 01 y 8 colonias del clon – 02 (Ver Figura 22). La selección final se hizo a través de la técnica de PCR Nido con partidores internos. Para estar seguros de tener una alta concentración de material genético, grado de pureza y discriminar bien entre colonia. El resultado de los estudios con PCR mostró que: Tanto el clon-01 como el clon-02 dieron 2 colonias positivas, las colonias 1B-23 y 1B-27, y las colonias 2B-19 y 2B-32, respectivamente (Ver Figura 23). En ambos clones, al realizar el PCR Nido, nos encontramos con la aparición de bandas de diferentes tamaños (Ver Figura 23). Es por ello que como criterio de selección de las colonias se consideraron sólo aquellas colonias con mayor grado de pureza y tamaño similar al del inserto esperado.



Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de “colony PCR” de las colonias del clon-02 de *T. canis*, para evaluar las colonias con insertos.
 Carriles del 0 al 16 corresponden a: “ladder”, Clon – 02, 2B-20, 2B-21, 2B-22, 2B-23, 2B-24, 2B-25, 2B-26, 2B-27, 2B-28, 2B-29, 2B-30, 2B-31, 2B-32, 2B-33, 2B-34.



Figura 23: Electroforesis en gel de agarosa, de productos de PCR Nido del clon –01 de *T. canis*.
 Carriles del 0 al 7 corresponden a: “ladder”, clon-01, 1B-22, 1B-23, 1B-24, 1B-25, 1B-26, 1B-27.

c) Transformación de bacterias competentes comerciales Rosetta™ (DE3) pLysS (Novagen) con plasmidios recombinantes (p1B-23, p1B-27, p2B-19, p2B-32 y un plasmidio control).

Debido a los resultados obtenidos en el intento de expresión de proteínas anterior, se reevaluó el protocolo del kit y además se hizo un nuevo análisis de las secuencias de los clones y se encontró que estos tenían codones que son desconocidos para células procariontes. Es decir, son propios de células eucariontes (**ATA / AGG / AGA / CTA / CCC / GGA**) y que podrían actuar como codones de término en estas células. Por esta razón se cambió la célula transformante por otra cepa denominada Rosetta™(DE3) pLysS, cuyas características principales son: la expresión de proteína recombinantes en concentraciones altas, poseer un plasmidio que contiene información para la lectura de codones desconocidos para la bacteria. Además, cuenta con una actividad de proteasas disminuidas.

6° Transformación: Con los plasmidios seleccionados anteriormente, se realizó el primer intento de transformación con bacterias Rosetta™(DE3) pLysS, para lo cual se desarrollaron protocolos similares a los anteriores para la purificación de los plasmidios y competencia de las bacterias. Se consideraron los plasmidios p1B-23, p1B-27, p2B-19, p2B-32 y un plasmidio control. En este caso el resultado de transformación fueron negativos, no presencia de colonias transformadas, por otra parte la evaluación del plasmidio control mostró que la actividad de estos en el ensayo fue óptimo.

7° Transformación: Se realizó una nueva transformación de bacterias Rosetta™(DE3) pLysS bajo similares condiciones a las anteriores y con los mismos plasmidios. Se logró obtener 5 colonias positivas preseleccionadas, 3 correspondientes al clon - 01 denominadas: 1B-23A; 1B-27A y 1B-27B y 2 del clon - 02 identificadas como 2B-19A y 2B-19B.

Las colonias preseleccionadas fueron sometidos a “colony PCR” para ver la presencia de los insertos. El resultado mostró que de las colonias col 1B-23 y 1B-27 no tenían una construcción adecuada, y que en los del clon - 02 fueron positivas (Ver Figura 24).

8° Transformación usando los plasmidios p1B-23, p1B-27 y p2B-19: Se repitió el protocolo anterior con los mismos plasmidios, el resultado mostró 21 colonias positivas las cuales pertenecían a col 2B-19. El análisis mediante “colony PCR” de un grupo de ellas dio positivo en todas, con una doble banda (Ver Figura 24).

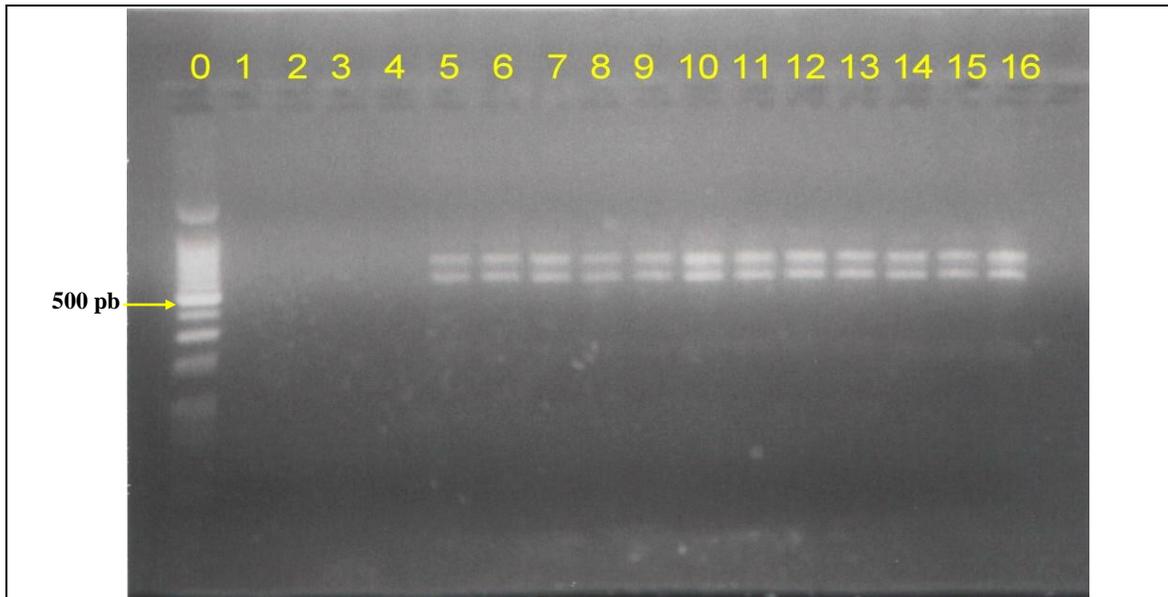


Figura N° 24: Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de PCR de colonias Rosetta™(DE3) pLysS transformadas con los plasmidios p1B-23, p1B-27 y p2B-19 de *T. canis*. Carriles del 0 al 16 corresponden a: “ladder”, clon – 01, col 1B-23A, col 1B-27A, col 1B-27B, col 2B-19V, col 2B-19 W, col 2B-19A, col 2B-19B, col 2B-19C, col 2B-19D, col 2B-19E, col 2B-19F, col 13 2B-19G, col 2B-19H, col 2B-19I, col 2B-19J.

9° Transformación: Se considera el mismo protocolo y el uso de la bacteria Rosetta™(DE3) pLysS Competent Cells (NOVAGEN company), se consideró usar los plasmidios p2B-32 y pB7-1-1 obtenidos anteriormente. Junto a las anteriores, se incluyeron plasmidios de un clon de *Typanosoma cruzi* ya conocido para utilizarlo como control positivo, este era una polimerasa β (pol- β) cuyo código de identificación era pet32b (211). Los resultados de este ensayo fueron negativos para los plasmidios p2B-32 y pB7 1-1, pero se obtuvieron colonias positivas para el plasmidio de *T. cruzi* pet32b(211).

d) Transformación de bacterias Rosetta Blue™ (DE3) pLysS con plasmidios pB7-1-1 y p2B-32.

10° Transformación: Se realiza un penúltimo intento de transformación con los plasmidios indicados. Para ello se consideró el cambio de las bacterias hospederas, se optó por el uso de la cepa Rosetta Blue™ (DE3) pLysS (NOVAGEN company). Los resultados en este ensayo fueron negativos para el plasmidio p2B-32. Para el plasmidio pB7 1-1 se preseleccionaron 4 colonias positivas (colonias B-7A, B-7B, B-7C, B-7D), las cuales al ser sometidas al análisis del “colony” PCR resultaron negativas.

11° Transformación: Se considera hacer un último intento de transformación, para lo cual se usó el mismo protocolo y tipo de cepa antes utilizado. Se ocuparon plasmidios aislados de las colonias 1B-23; 1B-27; B7-1-1 y 2B-32. Los resultados fueron positivos, el grupo preseleccionado fue evaluado por “colony PCR” (Ver Figura 25), este dió positivo en las colonias del clon B-7 (carriles N° 2 al 4), mostrando unas bandas anchas que aparentemente son dobles bandas, en el caso del clon 02 (carriles N° 5 al 8) las bandas son de aproximadamente 700 pb y se ven muy tenuemente en el gel. De este grupo fueron seleccionados para la expresión de proteínas recombinantes las colonias B-7E y 2B-32B.

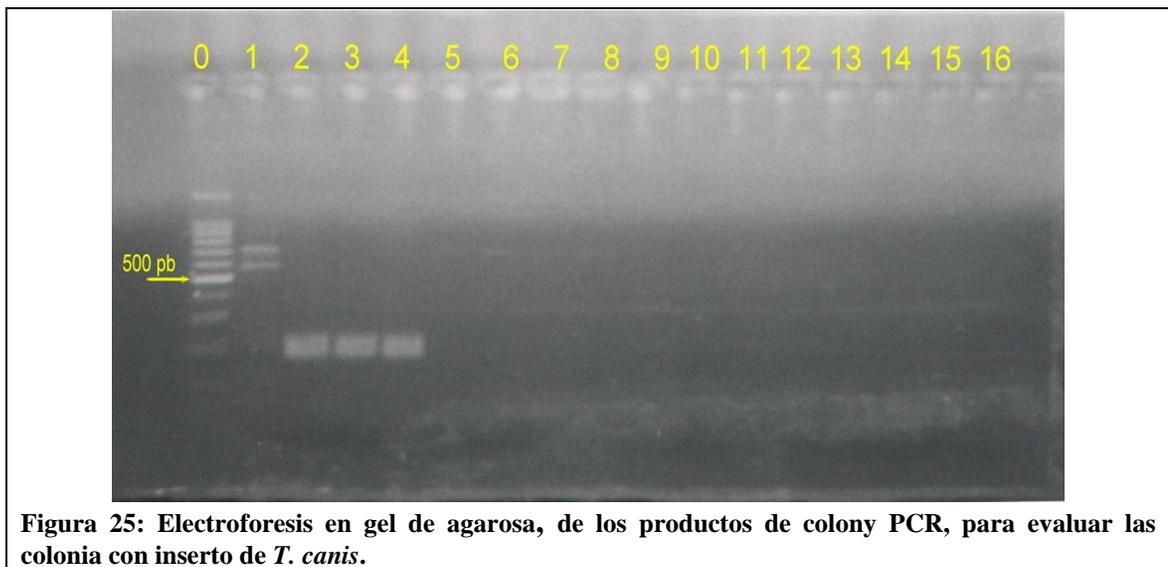


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa, de los productos de colony PCR, para evaluar las colonia con inserto de *T. canis*.

Carriles del 0 al 16 corresponden a: “ladder”, clon – 02, col B-7E; col B-7 F; col B-7H; col 2b-32A; col 2B-32B; col 2B-32C; col 2B-32D; col 1B-23A; col 1B-23B; col 1B-23C; col 1B-23D; col 1B-27A; col 1B-27B; col 1B-27C; col 1B-27D.

6.2) Intento de expresión de proteína recombinante de *T. canis* y análisis con “Western – Blot”:

1° Intento de expresión de proteínas recombinantes en bacterias TunerTM(DE3) placl:

Para el primer intento de expresión de proteína se utilizó la colonia col 2-4 (a) obtenida en la tercera transformación, el protocolo desarrollado se basó en el recomendado por el catalogo del kit comercial (Ver Anexo 7).

Una vez terminada la primera parte del protocolo se realizó la electroforesis de las muestras, y las proteínas de los geles se transfirieron a filtros de nitrocelulosa los cuales fueron posteriormente tratados. Las proteínas recombinantes generadas con el vector pET Blue-2, usado en este trabajo, en el extremo amino terminal tienen adicionada un péptido de poli histidina, para facilitar su detección y purificación. En este trabajo, para detectar las proteínas recombinantes, se utilizaron sueros de pacientes humanos con toxocarosis, y en algunos casos un anticuerpo monoclonal comercial anti histidin- tag. Para detectar los primeros anticuerpos, en el primer caso se usó un segundo anticuerpo anti-IgG humana, y en el segundo caso, un anticuerpo anti-IgG de ratón, respectivamente, ambas conjugadas con fosfatasa alcalina (Ver Anexo 8)

Una vez finalizada la etapa de revelado, los filtros son analizados para reconocer la presencia de proteína recombinante por medio de los 2 métodos mencionados (Ver Anexo 9).

Para este primer intento se consideró un tiempo cero (T_0) y luego cada 2 horas en tres tiempos distintos se colectó muestras inducidas con y sin IPTG. El resultado fue negativo, pues el perfil observado en el Filtro (A) en las muestras inducidas con IPTG era equivalente con los encontrados en las muestras control sin inducción. Al evaluar el Filtro B, se confirmó la ausencia de proteína recombinante ya que no presentó reacción cromogenica, es decir, no detectó la presencia de él péptido histidin-tag ligado a la proteína.

Posteriormente se realizó un intento de expresión con la colonia col 2-5 (a), los resultados fueron igual negativos al no detectar la presencia de proteína recombinante.

2° Intento de expresión de proteínas recombinantes usando células Tuner™ (DE3) pLacI:

Se utilizó la colonia col 3B-2 obtenida en la cuarta transformación, los resultados obtenidos fueron negativos.

3° Intento de expresión de proteínas recombinantes usando células Rosetta Blue™ (DE3)

pLysS: Se utilizó a las colonias col B7-1-1(e), col 2B-19(f), col 2B-32(b), col pet 32b (211) obtenidas en las transformaciones 8°, 9° y 11°. Para este ensayo se realizaron ciertas modificaciones al protocolo, se consideraron una muestra en tiempo cero (T_0), una muestra a las 2 horas (T_2) y una muestra a las 4 horas (T_4). En el caso de las bacterias control, se consideró sólo usar el tubo B-1 y las muestras fueron tomadas en T_0 y T_4 . Por otro lado, se optó por usar, como primera aproximación análisis mediante SDS – PAGE, con el objetivo de detectar expresión de proteínas recombinantes en general.

Los resultados obtenidos con los clones de *T. canis*, fueron negativos, pero a diferencia de los casos anteriores, aparentemente, la colonia control col pet 32b (211), si expresó una banda de mayor intensidad, claramente dependiente de la presencia de IPTG, pero al analizar su tamaño este no corresponde al esperado (aproximadamente 50 kDa). Por otra parte, no existía un bandeo claro y definido en todos los carriles, posiblemente por la existencia de proteasas que provocaron la degradación de proteínas, y que en el caso de col pet 32b (211), estuvieran degradando parcialmente a la proteína recombinante modificando el tamaño esperado. Esta degradación de proteínas puede deberse a la utilización de bacterias Rosetta – Blue la cual no tiene su actividad de proteasas inhibidas. Debido a lo anterior, se decidió repetir el ensayo, pero aplicando un “cocktail” de inhibidores de proteasas.

Se realizó el protocolo de igual forma a la anterior, pero una vez preparada la muestra para la electroforesis, se trataba con un “cocktail” de inhibidores de proteasas, los resultados

encontrados en este caso fue: que todas las muestras tenían un patrón de bandeo similar entre ellas. Otra situación bastante interesante, fue que la muestra correspondiente a la colonia col pet 32b (211) no presentó la banda de gran intensidad que mostró anteriormente, lo cual nos hizo replantear la existencia de esta proteína recombinante. En dos oportunidades más se volvió a evaluar estas muestras, perfeccionando la técnica para el “cocktail” de inhibidores de proteasas lo que mejoró el bandeo y fue posible evaluar la aparición de una posible banda de proteínas distinta a la del perfil de proteico de la colonia control. En este caso se obtuvieron resultados similares a los anteriores (Ver Figura 26).

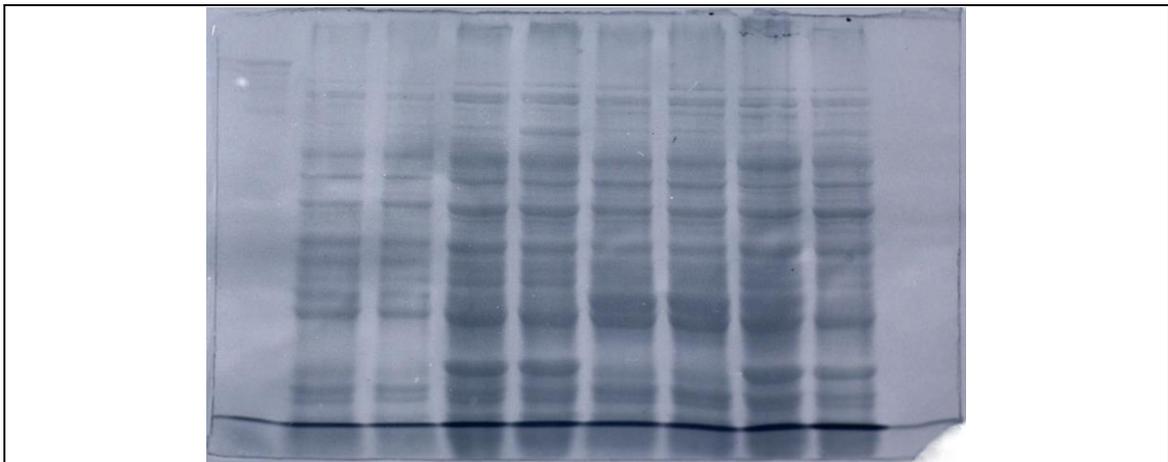


Figura 26: Electroforesis en gel de poliacrilamida, de los productos de expresión de proteínas de *T. canis* usando bacterias Rosetta Blue™ (DE3) pLysS detectadas a T₄ de incubación con inhibidor de proteasas.

Carril 0 corresponde al marcador de peso molecular; carriles 1 y 2 clon B7-1-1(e), carriles 3 y 4 clon 2B-19(f), carriles 5 y 6 clon 2B-32(b), Carriles 7 y 8 clon Pet 32b(211)

4° Intento de expresión de proteínas recombinantes: Para este intento de expresión se consideró el uso de la colonia col 2B-19(f), la colonia col 32b (211) y bacterias Rosetta™ (DE3) pLysS como control. El protocolo utilizado fue el mismo que el anterior, pero en esta oportunidad se decidió cargar dos geles con las mismas muestras y uno de ellos se trató con tinción de azul de coomassie, el otro fue tratado por Western – Blot, el cual se incubó con suero de pacientes con toxocarosis humana y luego fue revelado con los reactivos cromogénicos. Los resultados obtenidos en este rastreo también fueron negativos, mediante las dos técnicas, debido a que mediante ninguna de las dos fue posible detectar proteínas recombinantes del clon 2B-19(f) (Ver Figuras 27 y 28)

Tiempo en hrs.	0	2	4	0	2	4
IPTG	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Carriles	1	2	3	4	5	6

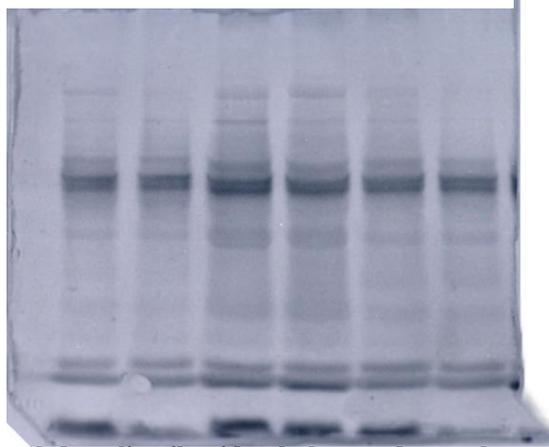


Figura 27: Electroforesis en gel de poliacrilamida, de los productos de expresión de proteínas en bacteria Rosetta™ (DE3) pLysS solo y la misma bacteria transformadas con clon – 02 de *T. canis*. Carriles 1 – 3 corresponde a la bacteria Rosetta™ (DE3) pLysS; carriles 4 – 6 bacteria Rosetta™ (DE3) pLysS transformada con plasmidios p2B-19f.

Tiempo en hrs.	0	2	4	0	2	4
IPTG	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Carriles	1	2	3	4	5	6

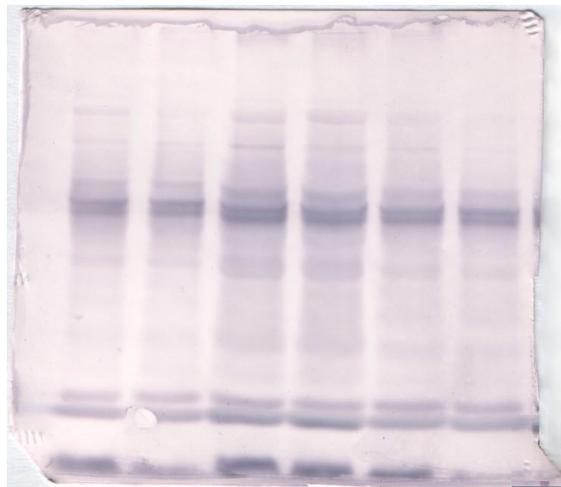


Figura 28: Western – Blot de los productos de expresión de proteínas en bacteria Rosetta™ (DE3) pLysS sola y la misma bacteria transformadas con clon – 02 de *T. canis*, el cual fue tratado con sueros de pacientes con toxocarosis humana.

Carriles 1 – 3 corresponde a la bacteria Rosetta™ (DE3) pLysS; carriles 4 – 6 bacteria Rosetta™ (DE3) pLysS transformada con plasmidios p2B-19f.

DISCUSIÓN

La información referente a identificación y caracterización de antígenos recombinantes de *T. canis* es muy limitada en relación a otros parásitos. A su vez, pocos son los estudios que han intentado explicar de manera molecular los mecanismos de evasión de la respuesta inmune en este nematodo.

En el clonamiento de cDNA de *T. canis*, se analizaron un gran número de colonias. De estas, 72 presentaron insertos, en los cuales se encontró una gran variedad de tamaños, que van desde cDNAs de más de 1.500 pb hasta pequeños fragmentos de 200 pb (Ver Cuadro 3). Este resultado es coincidente con lo encontrado por Tetteh *et al.* (1999), en los cuales se realizaron clonamientos al azar que permitieron secuenciar parcialmente 266 clones de cDNA de larvas infectantes de *T. canis*. Donde las secuencias aisladas presentaron gran diversidad de tamaños. En 12 clones secuenciados, mas de la mitad correspondieron a secuencias propias del parásito, y de estas se pudo reconocer un grupo de moléculas denominadas lectinas tipo-C y mucinas que han sido descritas tanto este como en otros nematodos y cuya función podría estar relacionada con estrategias de evasión de la respuesta inmune (Theodoropoulos *et al.*, 2001; Gruden *et al.*, 2003). Este resultado es comparable con el obtenido por Tetteh *et al.*, (1999) donde un alto porcentaje de las secuencias analizadas correspondieron a este tipo moléculas.

Como se mencionó anteriormente, 12 fueron los clones secuenciados y posteriormente analizados. Uno de ellos no fue posible estudiarlo ya que no se encontró la secuencia insertada. Otros dos clones (B-3 y E-7), al analizarlos en los bancos de datos no hubo ninguna secuencia que se asimilara con ellos, por ello, hoy en día, la única manera de llegar a conocer su posible función en la biología del parásito, sería a través de estudios funcionales realizados con las proteínas recombinantes que ellos estarían codificando.

Los clones A-3 y A-6, presentaron similitud con genes de *Drosophila melanogaster* que codifican para una proteína "shock" térmico hsc-70 (Begun y Whitley, 2000) y una proteína ribosomal L24 (código gi: 3901281).

Las siete secuencias restantes, analizadas en el banco de dato, presentaron similitud estadísticamente significativa, un valor de E igual o inferior a 1×10^{-8} , de acuerdo al análisis mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Tool on National Center for Biotechnology Information).

Los clones B-7 y B-13, se encontró que tenían un alto grado de similitud con dos secuencias del banco de dato correspondientes a transcritos de *T. canis* abundantemente expresados denominados Tc-**ant**-095 y Tc-**ant** - 30 (Tetteh *et al.*, 1999). No se conoce cual sería la función que estos transcritos cumplen en *T. canis*, ni que posible proteínas estarían codificando.

El clon D-10 tuvo un alto grado de similitud con otra secuencia del banco de dato denominada K023h06.yl de *T. canis* (gi 20063457). El cual es un transcrito expresado en estadios adultos de este parásito. Esta secuencia sólo fue publicada en el banco de dato y no hay una publicación científica que se refiera a ella a la fecha.

Los clones A-14 y D-13 presentaron una gran similitud con una secuencia previamente descrita en *T. canis* que corresponde a un transcrito que codifica para una mucina denominada nmuc-1 relacionada con una glicoproteína excretada-secretada denominada TES-120 (Gems y Maizels, 1996; Tetteh *et al.*, 1999). El hecho que ambas secuencias clonadas por nosotros, presenten similitud con la misma secuencia de *T. canis*, con la única diferencia que el clon D-13 corresponde al extremo 3' del transcrito nmuc-1, indica que ambos clones codificarían exactamente para una misma proteína. El clon D-13 sería un producto de degradación del mismo transcrito contenido por el clon A-14. Esto es lo más probable debido al hecho que la genoteca de cDNA se construyó usando como partidor un oligo-dT que hibridiza con la cola de poliA de cada uno de los mRNA previamente purificados (comunicación personal, Dra. Cindy Tripp de Eska Corp. USA). Por lo tanto todos los cDNA de la genoteca van a tener intacto el extremo 3'

del correspondiente transcrito purificado de larvas de *T. canis*, en cambio el extremo 5' de dichos transcritos pudo haber sufrido algún grado de degradación. Algunos autores proponen que las mucinas, además de formar parte de la cutícula del nematodo otorgándole gran resistencia mecánica, podrían tener algún papel en mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Gems y Maizels, 1996; Doedens *et al.*, 2001).

El análisis mediante BLAST y bancos de datos disponibles en Internet, de los clones 01 y 02, mostró que estos presentaban una gran similitud con las lectinas tipo - C de *T. canis* Tc-ctl-4 y la TES-32/Tc-ctl-1 (Tetteh *et al.*, 1999). Debido al hecho que estas lectinas de *T. canis* presentan gran similitud estructural con lectinas tipo - C descritas en células que participan en la respuesta inmune humana, Maizels ha postulado la posibilidad que las lectinas tipo - C del parásito podrían competir por los mismos ligando que unen las lectinas del hospedero humano interfiriendo con la respuesta inmune contra este patógeno (Loukas *et al.*, 2000a; Loukas y Maizels, 2000). Un mecanismo planteado por estos mismos autores propone la posibilidad de interferir con la infiltración de leucocitos hacia el foco de infección mediante la unión de glicoconjugados epiteliales, fundamentales para la infiltración de los leucocitos, por lectinas tipo - C secretadas por larvas del parásito, tal como es la proteína TES-32 codificada por los transcritos Tc-ctl-1 (Loukas y Maizels, 2000). Otra posibilidad es que lectinas tipo - C de superficies, unidas a la membrana de las larvas infectantes, capturen glicoproteínas del hospedero, tales como seroalbumina, inmunoglobulinas, etc, cubriéndose con ellas. De esta forma el parásito adquiriría una especie de "abrigo" con glicoproteínas del mismo hospedero no pudiendo ser reconocido como un agente extraño por el sistema inmune del individuo infectado (Loukas y Maizels, 2000). Otros tipos de mecanismos de interferencia de la respuesta inmune mediadas por lectinas tipo - C del parásito, tales como inducción de una polarización hacia una respuesta del tipo Th2, más benigna para el agente patógeno, como se ha visto en otros helmintos, no se pueden descartar. Como así mismo, otros mecanismos basado en la interferencia en la detección del agente infeccioso llevada a cabo por células dendríticas (Maizels y Yazdanbakhsh, 2003). En esta área es muy interesante destacar el hecho que un importante receptor de estas células presentadoras de antígenos, es una lectina tipo - C denominada DC-SIGN, el cual participa en el reconocimiento de glicoconjugados presentes en agentes infecciosos (Snyder *et al.*, 2005). Podríamos especular proponiendo la posibilidad que algún subtipo de lectina tipo - C secretada por larvas de *T. canis* pudiera afectar esta función compitiendo por los mismos ligandos que reconocen los receptores DC-SIGN de las células

dendríticas. Si bien es cierto el clon 02 presentó un alto porcentaje de similitud con la secuencia TES-32/Tc-ctl-1, descrita anteriormente (Loukas *et al.*, 2000a), nuestra secuencia no es idéntica a ella, presentando varios segmentos diferentes (Ver Fig. 15). Esto sugiere la posibilidad que el clon 02 este codificando para una nueva lectina tipo - C de *T. canis* de funciones aún desconocidas.

CONCLUSIÓN.

Mediante el uso de una genoteca lamda – ZAP de cDNAs de *T. canis* fue posible clonar, aislar y purificar 72 colonias con insertos de DNA de este parásito, los cuales fueron analizados mediante PCR y se observó que tenían una gran variedad tamaños lo que indica que existe una abundante expresión de proteínas por parte de la larva en estadio infectante.

12 clones fueron seleccionados para ser secuenciados, de estos más de la mitad correspondieron a cDNAs que codificaban para proteínas propias del parásito, siendo cuatro de nuestras secuencias muy similares a lectinas tipo-C y mucinas anteriormente descritas en *T. canis*. Ambos tipos de proteínas podrían estar íntimamente relacionadas con la evasión de la respuesta inmune de este nematodo. Hubo dos secuencias cuyo análisis indicó que no existía secuencias ni estructuras proteicas similares a estas en los bancos de datos, por lo que es posible estar frente a nuevas moléculas cuya función biológica aun es desconocida.

No fue posible expresar proteínas recombinantes de *T. canis* pese a reiterados intentos bajo distintas estrategias.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- ALSCHUL, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol. Bull.* **215**, 403-410.
- 2.- BANEYX, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-421.
- 3.- BEGUN, D.J., Whitley, P. (2000) Reduced X-linked nucleotide polymorphism in *Drosophila simulans*. *PNAS* **11**, 5960-5965.
- 4.- BURKE, J. (1977) Visceral larva migrans (Toxocariasis). *J.Ky Med Assoc.* **75**, 6770.
- 5.- CARPOUSIS, A. J., Vanzo, N. F., Raynal, L. C. (1999) mRNA degradation: a tail of poly (A) and multiprotein machines. *Trends Genet* **15**, 24-28.
- 6.- COBUM, G. A. Mackie, G. A. (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**, 55-108.
- 7.- COOPER, P.J. (2001) Early human infection with *Ochocerca volvulus* is associated with an enhanced parasite-specific cellular immune response. *J.Infect. Dis.***183**, 1662-1668.
- 8.- CORDERO, M.; Rojo, F. (1999) Parasitología Veterinaria. *Mc Graw-Hill interamericana*. España. 636-642.
- 9.- De SAVIGNY, D.H., Voller, A., Woodruff, W. (1979) Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J.Clinic. Pathologi* **32**, 284-288.
- 10.- DOEDENS, A., Loukas, A., Maizels, R.M. (2001) A cDNA encoding *Tc*-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. *Acta Tropica* **79**, 211-217.
- 11.- EISE, K.J., Filkelman, F.D, Maliszewski, C.R, Grecis, R.K. (1994) Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *J. Exp. Med.* **178**, 347-351.
- 12.- FIEDMAN, S., Henada, A. R. (1960) Severe miocarditis with recovery in a child with visceral larva migrans. *J. Pediatr* **56**, 9.
- 13.- GEMS, D., Ferguson, Ch.J., Robertson, Br.D., Nieves, R., Page, A.P., Blaxter, M.L., Maizels, R.M. (1995) An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae

encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J. Biol Chem.* **270**, 18517-18522.

14.- GEMS, D., Maizel, R.M. (1996) An abundantly expressed mucin-like protein from *T. canis* infective larvae: The precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proc Natl. Acad. USA.* **93**, 1665-1670.

15.- GEORGIU, G., Telford, J. N., Shuler, M. L., Wilson, D. B. (1986) Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing β -lactamase or alkaline phosphatase. *Appl Environ Microbiol* **52**, 1157-1161.

16.- GRUDEN-MOVESESIJAN, A., Petrovic, M., Sofronic-Milosavijevic, L. (2003) Interaction of mannan-binding lectin with *Trichinella spiralis* glycoproteins, a possible innate immune mechanism. *Parasite Immunology.* **25**, 545-552.

17.- HALL, T.A. 1999 BIOEDIT: a user – friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows. 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser* **41**, 95-98.

18.- HARLOW, E., Lane, D. (1988) Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory.

19.- HERMAN, C., Thévenet, D., Bouloc, P., Walker, G. C., D'Ari, R. (1998) Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic protein by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). *Genes Dev* **12**, 1348-1355.

20.- HERSKOVIC, P., Astorga, B. (1985) Toxocarosis humana en Chile. *Rev. Med. Chile* **113**, 18-21.

21.- HERSKOVIC, P., Leiva, S., Astorga, B., Mazouka, E. E., Cepeda, V. (1986) Toxocarosis humana en Chile. Evaluación del diagnóstico mediante ELISA. *Parasitol al Día* **10**, 76-80.

22.- HOFFMANN, K.F., Wynn, T.A., Dunne, D.W. (2002) Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. *Adv. Parasitol.* **52**, 265-307.

23.- HUMBER, P., Niezborala, M., Salembier, R., Aubin, F., Piarroux, R., Buchet, S., Barale, T. (2000) Skin manifestation associated with toxocarosis: a case – control study. *Dermatology* **201**, 230 – 234.

24.- JACQUIER, P., Gottstein, B., Stingenlin, Y., Eckert, J. (1991) Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbente assay kit. *J. Clin. Microbiology.* **29**, 1831-1835

25.- JEANNIN, P., Lecoanet, S., Delneste, Y., Gauchat, J., Bonnefoy, J., (1998) IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J. Immunol.* **160**, 3555-35611.

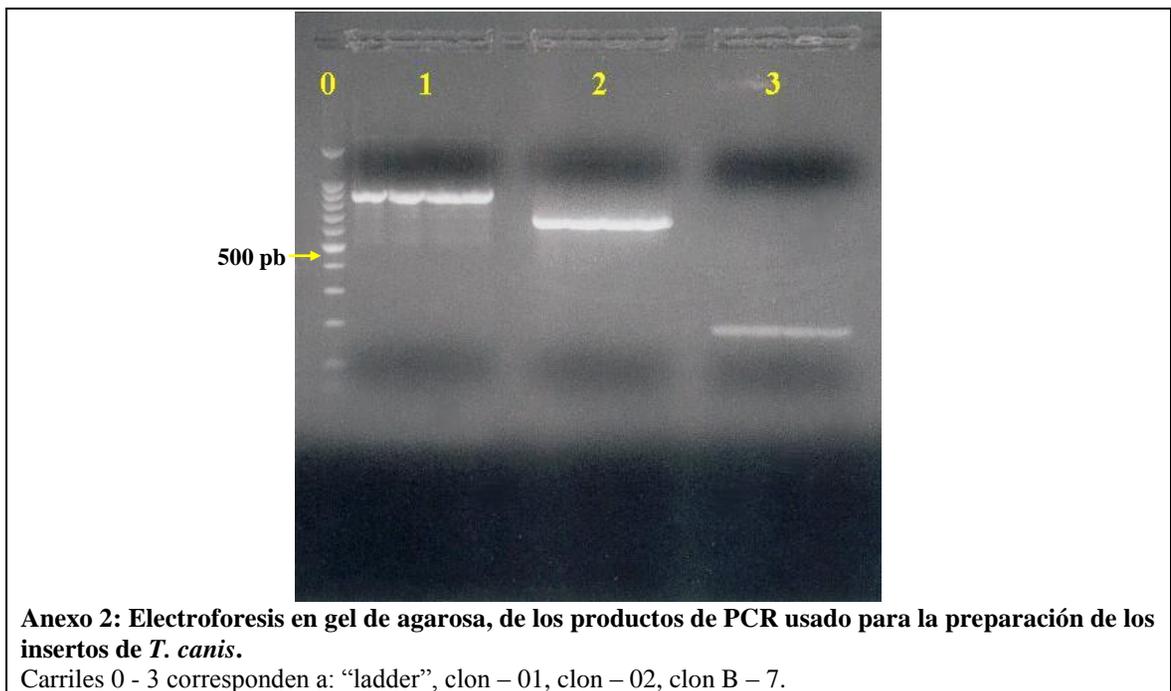
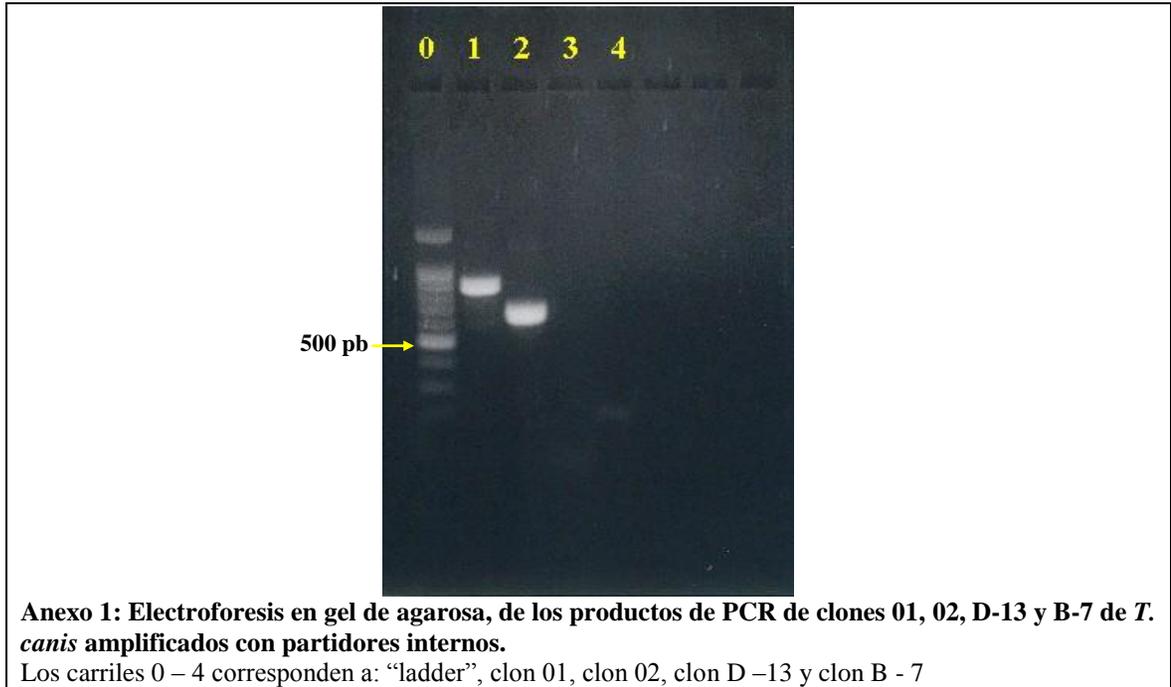
26.- JEANMOUGINS, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trens on Biochem. Sci.* **23**, 403-405.

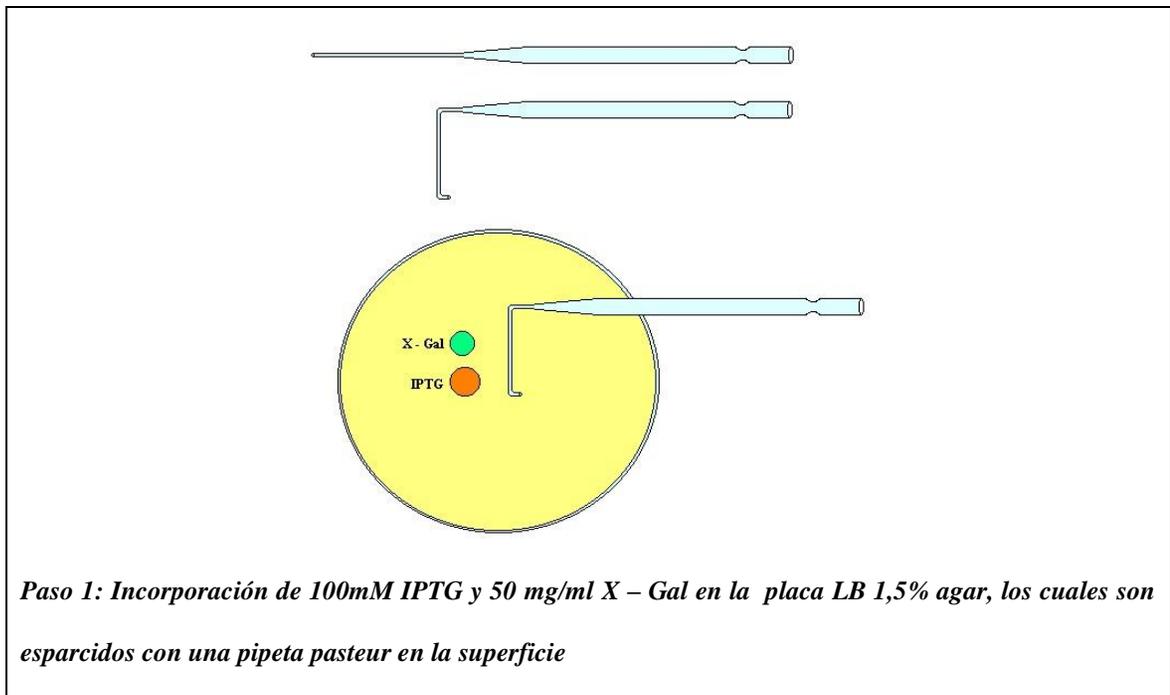
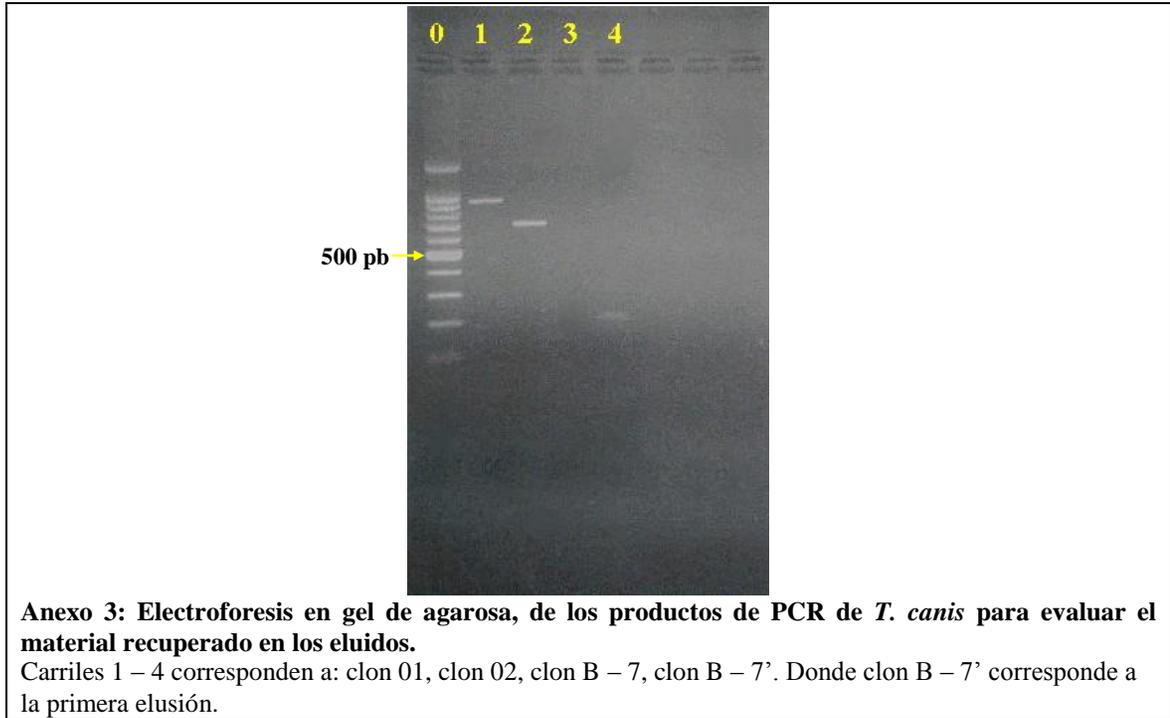
- 27.- LAWRENCE, R.A., Allen, J.E., Osborne, J., Maizels, R.M. (1994) Adult and microfilarial stages of the filarial parasites *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and immunoglobulin isotype responses in BALB/c mice. *J. Immunol.* **153**, 1216-1224.
- 28.- LAWRENCE, R.A., Allen, J.E., Gregory, W.F., Kopf, M., Maizels, R.M. (1995) Infection of IL-4 deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T_H2 dominated immune response. *J. Immunol.* **154**, 5995-6001.
- 29.- LAWRENCE, C.E.(1998). IL-4 regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur. J. Immunol* **28**, 2672-2684.
- 30.- LILIE, H., Schwarz, E., Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of protein produced in E. Coli. *Curr Opin Biotechnol.* **9**, 497-501
- 31.- LOUKAS, A., Mullin, N. P.,Tetteh, K. K., Moens, L., Maizels, R. M. (1999) A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Curr Biol* **9**, 825-828
- 32.- LOUKAS, A., Maizel, R. M. (2000) Helminth C-type lectins and host-parasite interactions. *Parasitol today* **16**, 333-339.
- 33.- LOUKAS, A., Doedens, A., Hintz, M., Maizels, R.M. (2000a) Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology* **121**, 545-554.
- 34.- LOUKAS, A., Hintz, M., Linder, D., Mullin, N.P., Parkinson, J., Tetteh, K.K., Maizels, R.M. (2000b) A family of secreted mucins from the parasitic nematode *T. canis* bears diverse mucins domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J. Biol. Chem.* **275**, 39600-39607.
- 35.- MAIZELS, R. M., Bundy, D. A. P., Selkirk, M. E., Smith, D. F., Anderson, R. M. (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* **365**, 797-805.
- 36.- MAIZELS, R.M., Holland, M.J. (1998). Parasite immunity: pathways for expelling intestinal parasites. *Curr. Biol.* **8**, R711-R714.
- 37.- MAIZELS, R. M., Yazdanbakhsh, M. (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology* **3**, 733-744.
- 38.- MAGNAVAL, I. F., Michault, A., Calone, N., Charlet, I. P. (1994) Epidemiology of human toxocarosis in "la Reunion". *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg* **88**, 531-533.
- 39.- MOORE, J., Todorova, V., Kennedy, M.W. (1995) A cDNA encoding ribosomal protein L3 from the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Gene* **165**, 239-242.
- 40.- MUKHOPADHYAY, A.(1994) A: Inclusion bodies and purification of protein in biologically active forms. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **56**, 61-109

- 41.- NEWMAN, C. G. H. (1978) Toxocariasis. *Develop Med Child Neurol* **20**, 218-226.
- 42.- NOEMI, I, Rugiero, E. (1999) Capitulo larva migrante. En: *Atias, A; Parasitología Medica. Publicaciones Mediterráneo, Ltd.* Pag 332-337.
- 43.- NOVAGEN. (2000) Catalog, Molecular tools for life science research. *Novagen Inc*, Pag 20-21.
- 44.- NUNES, C. M., Tundisi, R. N., Garcia, J. F., Heinemann, M. B., Ogassawara, S., Richtzenhain, L. J. (1997) Cross reactions between *T. canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by Western-Blotting technique. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* **39**, 253-256.
- 45.- OLSON, P., Zhang, Y., Olsen, D., Owens, A., Cohen, P., Nguyen, K., Ye J.-J., Bass, S., Mascarenhas, D. (1998) High-level expression of eukaryotic polypeptides from bacterial chromosomes. *Protein Expr Purif* **14**, 160-166
- 46.- OSBORNE, J., Devaney, E. (1999) Interleukin-10 and antigen-presenting cells actively suppress T_H1 cells in BALB/c mice infected with the filarial parasite *Brugia pahangi*. *Infect. Immun* **67** 1599-1604.
- 47.- PEARCE, E.J., MacDonald, A.S., (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Rev. Immunol.* **2**, 499-511.
- 48.- PLATTS-MILS, T., Vaughan, J., Squillace, S., Woodfolk, J., Sporik, R. (2001). Sensitisation, asthma, and a modified T_H2 response in children exposed to cat allergen: a population based cross-sectional study. *Lancet* **357**, 752-756.
- 49.- RASMUSSEN, L. M., Dirdal, M., Birkelaek, N. H. (1993) Covert toxocariasis in child, treated with low dose diethylcarbamazine. *Acta Paediatr (Norway)* **82**, 116-118
- 50.- REIS, Sousa, C., (2001) Dendritic cells as sensor of infection. *Immunity* **14**, 495-498.
- 51.- SAMBROOK, J., Fritsch, E.T., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
- 52.- SAPUNAR, J., Verdaguer, J., Centeno, J., (1989) Larva migrans ocular por Toxocara: análisis de 31 casos. *Parasitol. al Día* **13**, 21-33.
- 53.- SCHANTZ, P. M., Glickman, T. L. (1978) Toxocara visceral larva migrans. *N England. J Med* **298**, 436-439.
- 54.- SCHANTZ, P. M., Meyer, D., Glickman, T. L. (1979) Clinical serological and epidemiological characteristics of ocular toxocariasis. *Am J Trop Med Hyg* **28**, 24-28.
- 55.- SNYDER, G.A., Colonna, M., Sun, P.D. (2005) The structure of DC-SIGNR with portion of it repeat domain lends insights to modeling of the receptor tetramers. *J. Mol. Biol* **347**, 979-989.

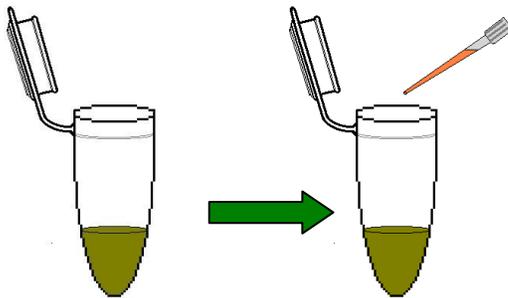
- 56.- SPEISER, F., Gottstein, B. (1984) A collaborative study on larval excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Trop.* **41**, 361-372.
- 57.- STILES, T.J.(1963) Incidence of *Toxocara canis* and other helminth parasites of dogs in Mexico City. *J.Parasitol* **53**, 822.
- 58.- SUGANE, K. Y., Oshima, T. (1983) Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology.* **50**, 113-120.
- 59.- TETTEH, K.K., Loukas, A., Tripp, C., Maizels, R.M. (1999) Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy. *Infect Immun.***67**, 4771-4779.
- 60.- THEODOROPOULOS, G., Hicks, S.J., Corfield, A.P., Miller, B.G., Carrington, S.D. (2001) The role of mucins in host-parasite interactions: Part II- helminth parasites. *Trends in Parasitology.* **17**, 130-135.
- 61.- THOMAS, J. G., Baneyx, F. (1998) Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overproducing heat-shock protein. *J. Biol. Chem* **271**, 11141-11147.
- 62.- WISLEY, E. J, Schants, P. M., Kate, F. (1980) Human Toxocarosis in a rural community. *Am. J. Dis. Child* **134**, 967-969.
- 63.- Worley, D.E. (1964) Helminth parasites of dogs in southeastern Michigan. *J Am Vet Med Assoc* **144**, 342.
- 64.- ZAHN, K. (1996) Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol* **178**, 2926-2933
- 65.- ZHANG, Y., Olsen, D. R., Nguyen, K. B., Olson, P. S., Rhodes, E. T., Mascarenhas, D. (1998) Expression of eukaryotic protein in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **12**, 159-165.

ANEXOS.

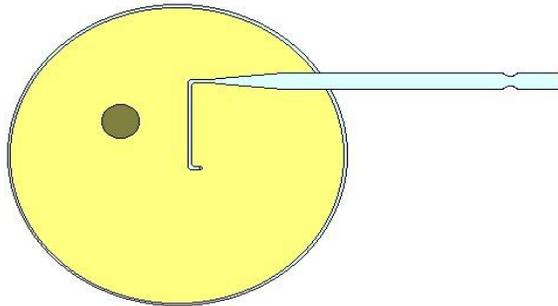




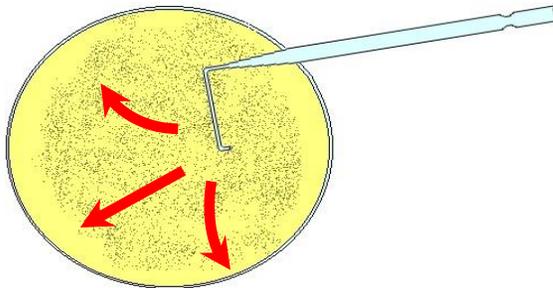
Anexo 4: continua en la siguiente pagina.



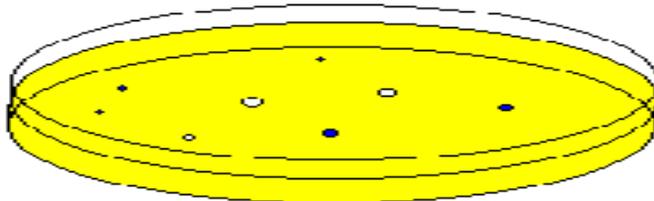
Paso 2: Mezcla de la solución de ligación con bacterias competentes.



Paso 3: Alícuota de cada clon en las placas previamente preparadas



Paso 4: Con una pipeta pasteur se esparce homogéneamente la solución sobre la placa



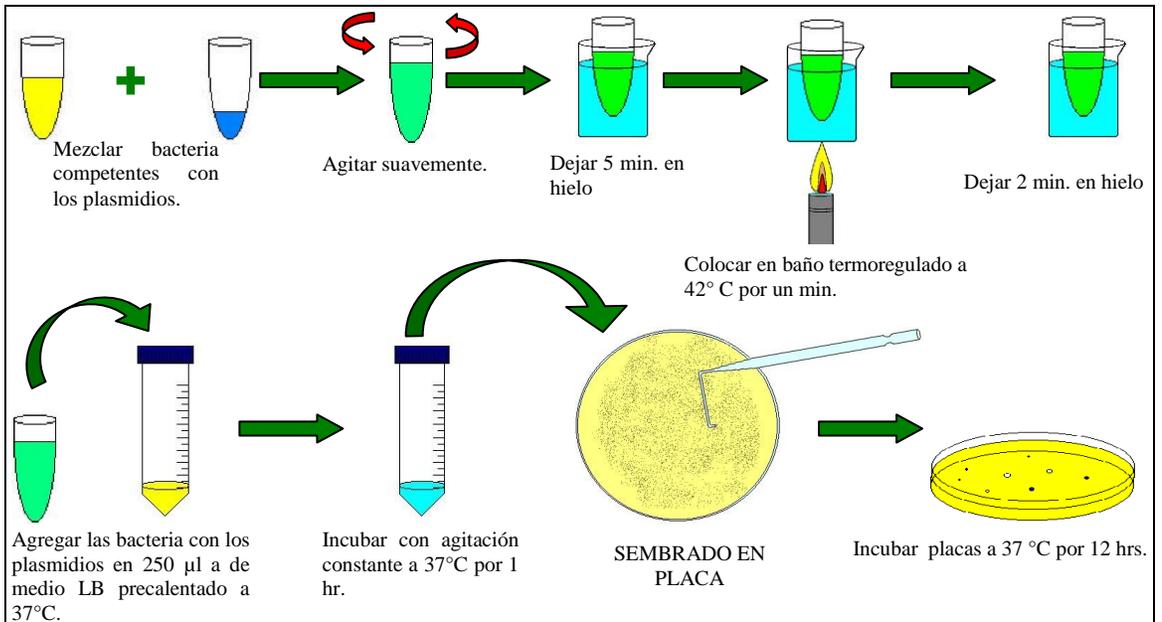
Paso 5: Las placas con incubadas a 37 °C toda la noche y hasta aparición de colonias

Anexo 4: Muestra los pasos realizado para llegar a la obtención de colonias transformadas con los plasmidios recombinantes

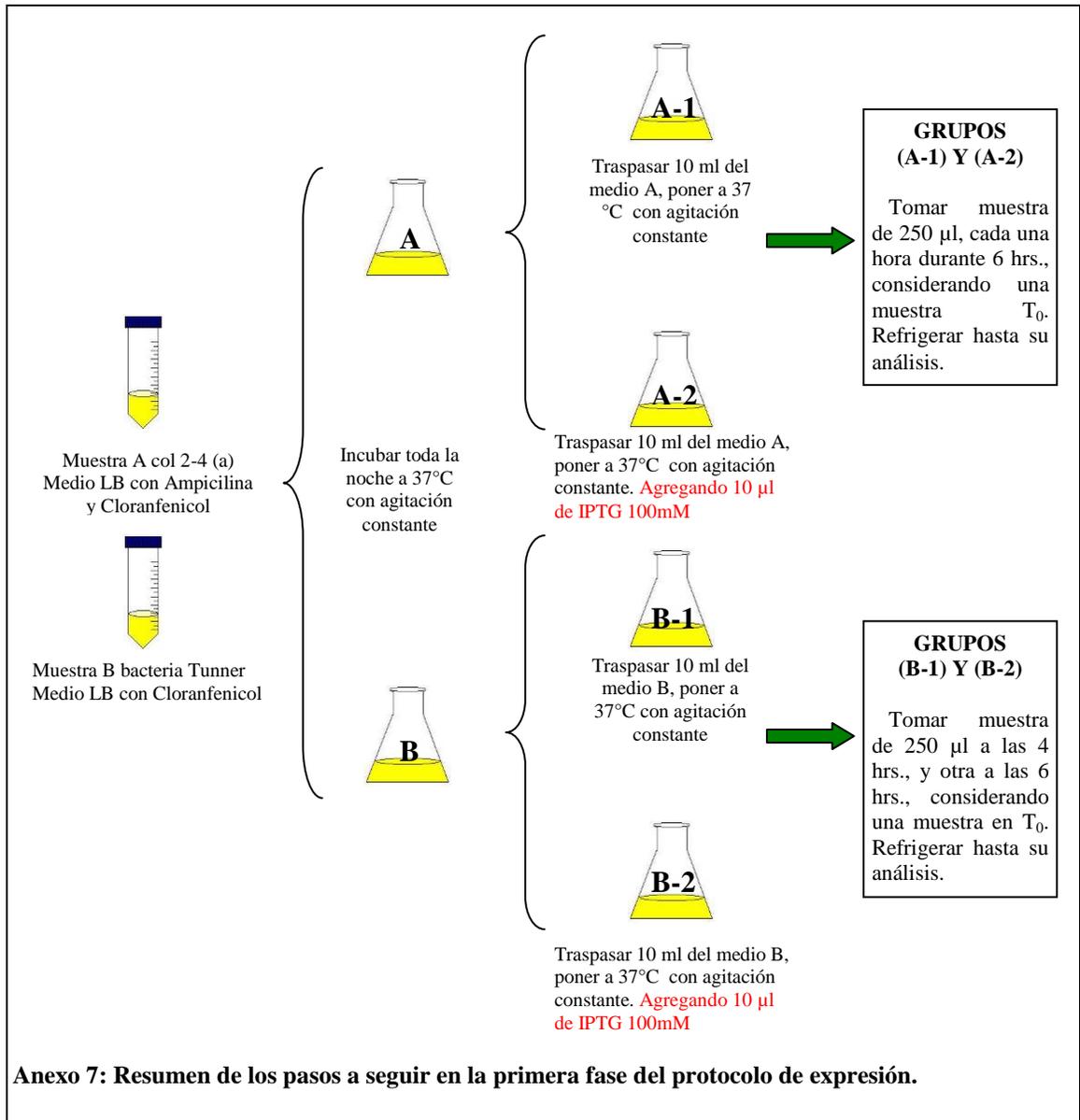


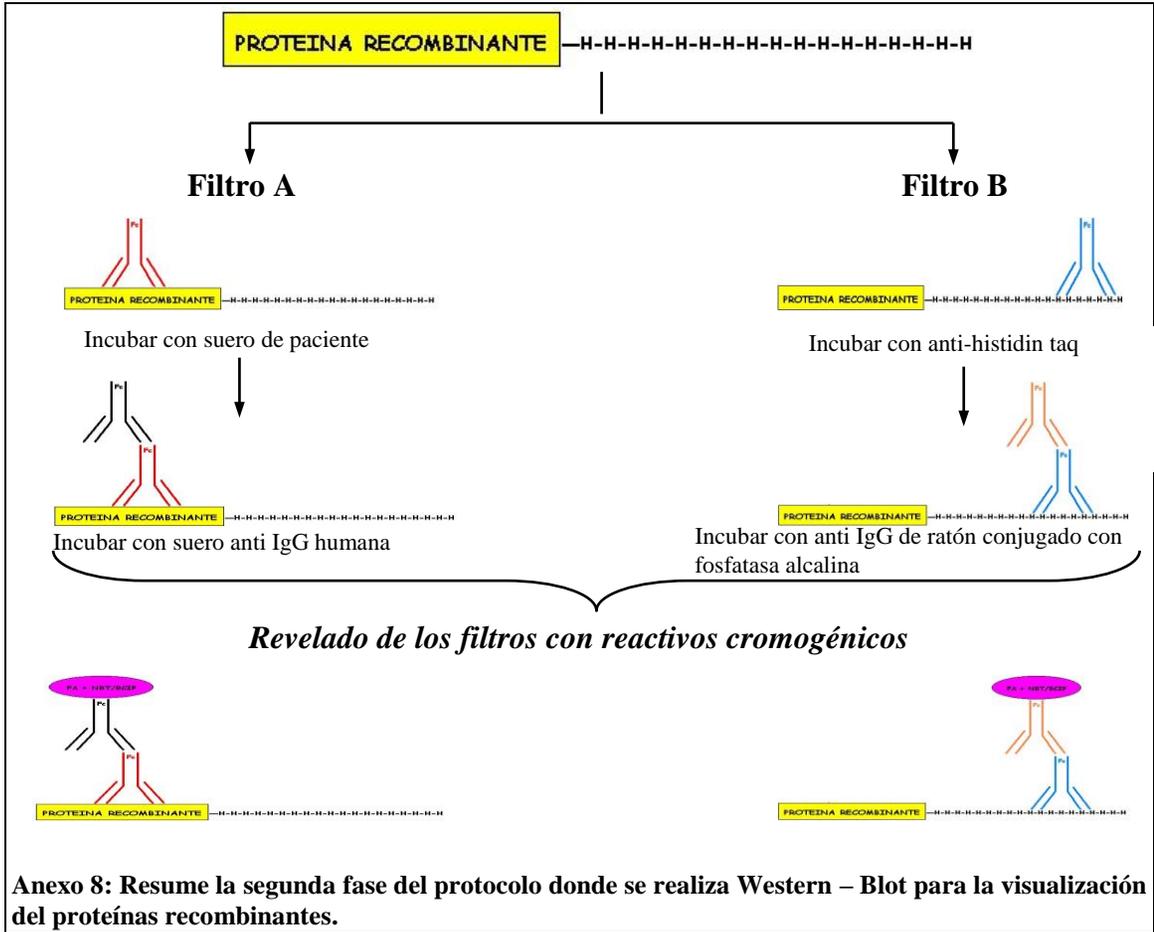
Anexo 5: Electroforesis en gel de agarosa, de productos de PCR de Plasmidios purificados de *T. canis* y *T. cruzi*.

Carriles del 0 – 6, corresponden a: “ladder”, clon 02, p1-4, p2-4, p2-5, p3b2 y pB7-1-1.

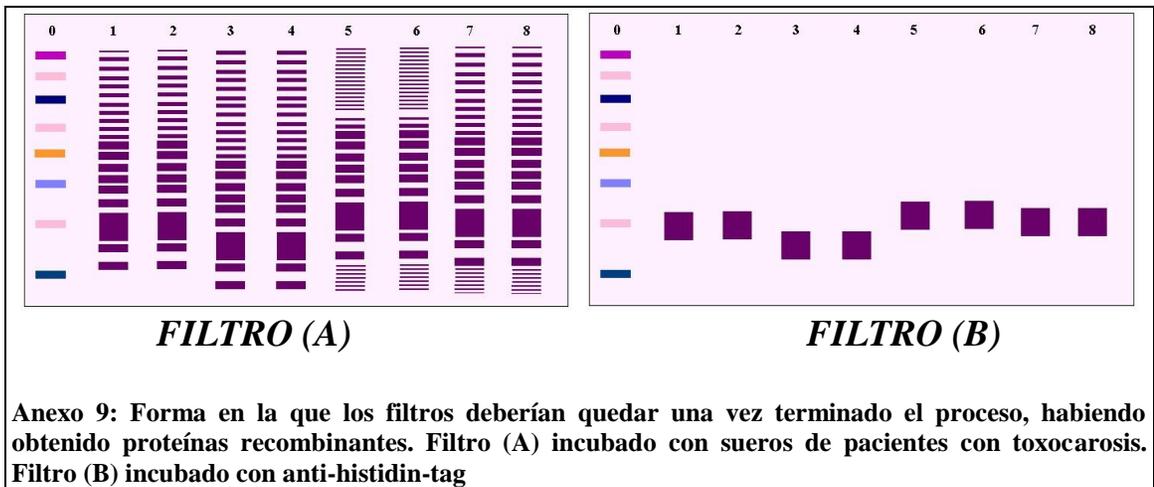


Anexo 6: Pasos realizados en el protocolo de transformación de bacterias Tuner™ (DE3)placI con los plasmidios.





Anexo 8: Resume la segunda fase del protocolo donde se realiza Western – Blot para la visualización del proteínas recombinantes.



Anexo 9: Forma en la que los filtros deberían quedar una vez terminado el proceso, habiendo obtenido proteínas recombinantes. Filtro (A) incubado con sueros de pacientes con toxocarosis. Filtro (B) incubado con anti-histidin-tag