ARTICULO

Abordajes para la clonación de los productos de secreción del adulto de *Taenia solium* TSES33 y TSES38. Estudio preliminar de la antigenicidad de las moléculas recombinantes.

Nelly Martínez Villalobos [1γ], María Isabel Jiménez [1γ], Luis Miguel González [1γ], Elizabeth Ferrer [2,3], Milagros Cortez [2], Cruz Manuel Aguilar[4], Mike Parkhouse [5], Teresa Gárate [1*].

1 Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, España.

2 Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

3 Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.

4 Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET) "Dr. Witremundo Torrealba", Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, San Carlos, estado Cojedes, Venezuela.

5 Gulbenkian Institute for Science, Oeiras, Portugal

γ Autores que han contribuido por igual.

Correspondencia: Teresa Gárate:
E-mail: tgarate@isciii.es

RESUMEN

Las moléculas TSES33 y TSES38 son antígenos de secreción producidos por los adultos de *Taenia solium*, descritos previamente por su interés en el diagnóstico específico de teniosis intestinal. En el presente trabajo se diseñaron dos estrategias para su clonación, transcripción reversa del ARN a ADNc acoplado a amplificación posterior (RT-PCR) y síntesis de ADNc quimérico. En el caso de TSES38, la aproximación de RT-PCR permitió su obtención a partir del diseño de cebadores (primers) específicos y empleo de ARNms de cuello/escolex y proglótides maduras-grávidas del adulto de *T. solium*. Para la clonación de TSES33, fue necesaria la preparación de una molécula quimérica, sintetizando en primer lugar fragmentos truncados solapantes de la molécula mediante PCR que finalmente fueron ligados. Tras la obtención de los correspondientes ADNcs completos, éstos fueros subclonados en vectores de expresión, pGEX-4T, para la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes en el sistema procariota. Los productos recombinantes obtenidos resultaron ser insolubles y, si bien fueron ensayados en "Western blot", no fueron reconocidos por los

sueros de pacientes portadores de *Taenia saginata*, por los sueros de individuos sanos ni por los sueros de animales inmunizados con moléculas de secreción de metacestodos de *T. solium*.

Palabras clave*: Taenia solium,* TSES33, TSES38, RT-PCR, ADNc quimera, pGEX-4T/ BL21 *Escherichia coli*, teniosis.

ABSTRACT

Cloning approaches for secretion products of adult *Taenia solium* TSES33 and TSES38. Preliminary antigenicity study of recombinant molecules

TSES33 and TSES38 secreted antigens are molecules produced by *Taenia solium* adult described previously for its interest in the specific diagnosis of intestinal taeniosis. In this study two strategies were designed for cloning, reverse transcription of RNA to cDNA coupled to posterior amplification (RT-PCR) and synthesis of chimeric cDNA. In the case of TSES38, the RT-PCR approach enabled to obtain it by the design of specific primers and the use of mRNA from neck/scolex and gravid proglótides of *T. solium* mature-adult. For TSES33 cloning was necessary to prepare a chimeric molecule, synthesizing first overlapping truncated fragments of the molecule by PCR which were linked. After obtaining the corresponding complete cDNAs, these are subcloned in expression vectors, pGEX-4T to induce the expression of recombinant proteins in prokaryotic system. The recombinant products obtained were insoluble and, although they were tested in Western blot, were not recognized by sera from patients with *Taenia saginata,* by sera from healthy individuals or sera from immunized animals with the *T. solium* metacestodes secretion molecules.

Key words: *Taenia solium,* TSES33, TSES38, RT-PCR, cDNA quimera, pGEX-4T/ *Escherichia coli* BL21, Taeniosis**.**

Nº de Acceso al GenBank*: TSES 33 (FN356899) y TSES 38 (FN356899).*
Abreviaturas: *Neurocisticercosis (NCC), sistema nervioso central (SNC), antígenos de secreción-excreción (E/S), Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), ácido ribonucleico (ARN), ácido ribonucleico mensajero (ARNm), marco de lectura abierto (ORF, Open Reading Frame), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).*

INTRODUCCIÓN

Taenia solium puede producir dos enfermedades diferentes en el ser humano dependiendo de que la infección este causada por el cestodo adulto (teniosis) o por la forma larvaria (cisticercosis). En el primer caso, tras la ingestión de los cisticercos o metacestodos presentes en carne de cerdo, el cestodo se desarrolla hasta el estado adulto en el intestino del hombre, lo que suele cursar con pérdida de apetito, nauseas, malestar intestinal, constipación o diarrea, pero también existen muchos casos en los que la infección puede resultar asintomática (1-2).

En contraste, la cisticercosis, producida habitualmente por la ingestión de huevos de *T. solium,* puede resultar muy grave debido a la tendencia de los cisticercos a localizarse en el SNC (3). En este caso, neurocisticercosis (NCC), las manifestaciones clínicas dependen tanto del número y localización de las lesiones como de la severidad de la reacción inducida por el sistema inmunitario del enfermo frente al parásito. En la NCC, la epilepsia es el síntoma más frecuente (70% de los pacientes) pero también pueden aparecer otras manifestaciones entre las que se incluyen signos neurológicos focales, encefalitis, hidrocefalia, etc., pudiendo terminar con la vida del paciente.

En este sentido, la OMS estima que se producen alrededor de 50.000 muertes cada año por neurocisticercosis (2-6). Ya fuera del sistema nervioso central, la cisticercosis es frecuentemente asintomática, pero cuando los cisticercos se localizan en el ojo son causa habitual de ceguera (7).

Desde el punto de vista epidemiológico, el complejo teniosis/cisticercosis es endémico en la mayoría de los países latinoamericanos, en muchos países del África subsahariana, y en Asia (principalmente India, China y países del sureste asiático). También se han descrito un número relevante de casos en Europa, particularmente en Portugal y España, número que se incrementa de manera marcada como consecuencia de la inmigración (8-10).

En relación con el diagnóstico de las enfermedades, hoy en día la detección de teniosis continúa presentando limitaciones, en contraposición a la cisticercosis en la que se ha concentrado todos los esfuerzos con buenos resultados (11). Así, las técnicas coprológicas, tanto macro como microscópicas, son económicas pero carecen de la especificidad y sensibilidad adecuadas (12); por ejemplo, es imposible diferenciar los huevos de los ténidos ya que todos exhiben idéntica morfología, o clasificar proglótides rotas o en mal estado, o detectarlas en el estado pre-patente de la enfermedad o en la fase de patencia en períodos sin eliminación de formas parasitarias.

Otra alternativa sería optar por los métodos moleculares, principalmente PCR, que a partir de los años 90 se han ido describiendo en la literatura, y que permiten la identificación especie-específica de *T. saginata* y *T. solium* (13-22). Estos protocolos están basados en el polimorfismo que presenta el ADN de los parásitos, como fragmentos de ADN repetidos, el ADN ribosomal, el ADN mitocondrial y otras secuencias de interés, diferencias que después se reflejan en el diseño de protocolos de amplificación, amplificación-restricción, o amplificación-secuenciación. Aunque este tipo de aproximación diagnóstica muestra una especificidad exquisita, y funciona con una sensibilidad excelente con ADN purificado de muestras del parásito, a veces se aprecia problemas cuando se procesa muestras biológicas, más concretamente cuando se trabaja con heces sin o poca cantidad de huevos de pacientes portadores del ténido.

Otra alternativa diagnóstica son los métodos inmunológicos; hasta la fecha, se han descrito diferentes protocolos (ELISA-captura, “Western blot”, etc) para el diagnóstico de teniosis intestinal basados en la detección de coproantígenos (23), y en la de anticuerpos en el suero de los pacientes (24). Con respecto a coproantígenos, se han preparado tanto anticuerpos policlonales (25-27) como monoclonales (28), aunque en el caso de los monoclonales sólo se describió este último y no se volvió a utilizar. Los anticuerpos policlonales reconocen antígenos de los ténidos adultos, que son específicos del género *Taenia.*

Los ensayos no discriminan entre *T. solium* y *T. saginata*, son por tanto género-específicos y capaces de detectar la infección en su prepatencia, con una sensibilidad independiente del número de huevos eliminados,

muestran gran robustez y se tornan negativos tras el tratamiento eficaz (25, 29-30). Las críticas en relación con este tipo de pruebas derivan de que la mayoría de ellas se basan en el empleo de anticuerpos policlonales con problemas de reproducibilidad y casos de detección de falsos positivos, desconocimiento de la naturaleza de los antígenos detectados, y falta de especificidad, al no diferenciar entre *T. saginata* y *T. solium*. Con respecto a la detección de anticuerpos específicos contra el adulto de *T. solium* en el suero de pacientes con la patología intestinal, Wilkins *et al* (24) describieron una prueba con antígenos de E/S del parásito adulto con una sensibilidad y especificidad excelentes, próximas al 100%. Más recientemente, mediante aproximaciones de proteómica y genómica, los mismos autores han clonado, caracterizado y expresado en células de insecto, los genes que producen dichos antígenos de E/S (TSES33 y TSES38) (31), y han adaptado los antígenos recombinantes a un ensayo de inmuno- electrotransferencia (32).

En el presente trabajo, se ha subclonado los antígenos TSES33 y TSES38, moléculas de E/S producidas por el adulto de *T. solium* con propiedades diagnósticas, utilizando como abordajes moleculares RT-PCR y construcción de genes quiméricos. Además, se llevó a cabo el análisis preliminar de la antigenicidad de las correspondientes proteínas recombinantes expresadas en sistema procariota utilizando suero de pacientes con teniosis (*T. saginata*) y suero de animales inmunizados con el parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Parasitario. Un adulto de *T. solium* fue aislado de un paciente venezolano, sometido a tratamiento tenicida. Del adulto se separaron el escolex/cuello por una parte, y el estróbilo por otra, almacenándose las dos porciones en Trizol (Sigma) hasta su manipulación en el laboratorio.

Sueros. 12 sueros humanos, de pacientes con teniosis (*T. saginata*), confirmada mediante análisis molecular, multiplex HDP2-PCR (14), de las proglótides eliminadas. 30 sueros humanos procedentes de individuos sanos. Sueros de conejo: mezcla de sueros de 3 conejos inmunizados con glicoproteínas de metacestodos de *T. solium* (TEW53, TEW54, TEW55), obtenidas por cromatografía de afinidad con lectinas de acuerdo con Tsang *et al.* (33).

Vectores de clonación. -TOPO® pCR4® (Invitrogen). Vector para la clonación de productos de PCR. Contiene los cebadores T3 y T7, flanqueando la región de policlonaje. Gen de resistencia a ampicilina y kanamicina, y peso molecular de 3,9 Kb. Utiliza células *Escherichia coli* TOPO10 para su propagación. -pGEX-4T-3 (General Electric). Vector para la expresión de los genes de interés. Rinde proteína de fusión con la enzima glutation S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, propiedad que facilita su purificación y seguimiento. Contiene una región de policlonaje variado. Gen de resistencia a ampicilina, promotor T7 y tamaño de 4,9 Kb. Utiliza *E. coli* BL-21 para la expresión de las proteínas recombinantes.

Extracción de ARN total, RT-PCR. Para la extracción del ARN total de las dos porciones del verme adulto, escolex/cuello y proglótides maduras-grávidas, se utilizó el kit “SV-Total ARN Isolation System” de Promega, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. El ARN total extraído se cuantificó de acuerdo con Sambrook y Russell (34) y se almacenó

a –80 ºC hasta su uso. Después se realizó la amplificación por transcripción reversa, RT-PCR, empleando el kit "Retrotools DNA-cDNA Polymerase" de Biotools, el ARN total como molde, y los cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia AY128681 de la molécula TSES38. Los cebadores específicos fueron TSES38F1´(5'-CGGCTGAGAATGATGAGAATTATTGTGG-3') y TSES38R1 (5´-TTACTTCCACAAAAGTATCACCATC-3`). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático "Gene Amp PCR, System 2400", Perkin Elmer, con las siguientes condiciones de reacción: Inicio (60 ºC/ 30 min, 85 ºC/ pausa, 94º C/3 min); 45 ciclos (94 ºC/ 10 sec, 55 ºC/ 20 sec, 72 ºC/ 1 min); Extensión final (72 ºC/ 7 min).

Construcción de una quimera de ADNc. Se procedió a la construcción de ADN quimérico mediante PCR para obtener la molécula TSES33 según la metodología empleada por Jado *et al.* (35). Para ello utilizamos la "*Taq GOLD*" de Applied Biosystem y los cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia con número de acceso AY183761, que corresponde a la molécula indicada y contiene un marco de lectura abierto de 804 pb. Se diseñaron cebadores directos y reversos solapantes con una longitud entre 59 y 75 nucleótidos que nos permitió sintetizar dos fragmentos (inicial y terminal) de forma independiente y que se corresponden con el ORF de la molécula TSES33 (Figura 2). Las amplificaciones se realizaron con las siguientes condiciones de reacción: Inicio (94 ºC/ 2min); 40 ciclos (94 ºC/ 30 sec, 55 ºC/ 1min, 72 ºC/ 30 sec); Extensión final (72 ºC/ 5 min).

Geles de agarosa, purificación de productos de amplificación. Los productos de amplificación, y otras mezclas de fragmentos de ADN, se fraccionaron en geles de agarosa de 1-3% según el tamaño de los amplicones (34). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se utilizaron como marcadores el ADN del fago lambda digerido con *Hind*III o *Bst* EII y PCR markers (Sigma). Las bandas de amplificación se purificaron bien de los geles de agarosa empleando el kit "QIAquick gel extraction (QIAGEN) o bien el kit "QIAquick PCR purification" (QIAGEN).

Secuenciación. Los ADNs se secuenciaron por el método de Sanger *et al* (36), a partir del producto purificado y usando los cebadores universales suministrados por los vectores de clonación. Se empleó secuenciación automática (modelo 377 de Applied Biosystem) y el protocolo de reacción "Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (ABI-PRISM, PE Biosystems). La información fue analizada y editada mediante el paquete informático Lasergene (DNASTAR). Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas fueron comparadas con las secuencias de los genes descritos en las bases de datos Genbank y EMBL mediante el algoritmo BLAST y PSI-BLAST (37). La secuenciación así como la síntesis de cebadores fue llevada a cabo por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

Expresión de proteínas de fusión. La subclonación de las moléculas TSES33 y TSES38 en el vector de expresión pGEX-4T-1 se llevó a cabo en dos etapas. Una primera etapa que consistió en la introducción de los sitios de restricción en cada extremo de ambos antígenos mediante PCR y subclonación en el plásmido pCR 4® TOPO®. Para ello, a la molécula TSES38 se añadieron las secuencias *Eco*RI (extremo 5´) y *Xho*I (extremo 3´) y por otro lado, a los fragmentos inicial y terminal de la molécula TSES33 se añadieron las secuencias *Eco*RI (extremo 5')/*Hind* III (extremo 3') y *Hind* III (extremo 5')/*Xho* I (extremo 3'), respectivamente. Una segunda etapa que consistió en la digestión de los clones recombinantes con las enzimas de restricción adecuadas y posterior ligación con el vector pGEX-4T-1 (Figuras 1 y 2). Las células BL21 competentes se transformaron con las dos construcciones TSES33 y TSES38 en el vector pGEX-4T-1, siguiendo los protocolos

habituales (34). La inducción de las proteínas recombinantes y su purificación se realizaron según Ferrer *et al.* (38).

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), "Western Blot". El fraccionamiento de los extractos proteicos en geles de poliacrilamida, su posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa, y el desarrollo del "Western blot" con los sueros humanos y de conejos se realizó siguiendo protocolos ya previamente descritos (39).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue el aislamiento de los genes TSES33 y TSES38, productos E/S producidos por el adulto de *T. solium*. Para ello, se utilizaron dos estrategias. Un primer abordaje consistió en la clonación del ORF de la molécula TSES38 mediante RT-PCR, con la combinación de cebadores específicos TSES38F1/TSES38R1. Dicha reacción se realizó empleando diferentes cantidades de ARN total de cuello-escólex (13,5 ng) y proglótides maduras-grávidas (22,95 ng), obteniéndose unas bandas con un tamaño esperado de 800 pb (**Figura 1).**

Las bandas fueron purificadas y subclonadas en el plásmido pCR4® TOPO®. La secuenciación de los clones recombinantes nos confirmó que habíamos clonado la molécula TSES38 (AY128681). Además, este resultado puso de manifiesto que dicha proteína se estaba expresando en las porciones analizadas del verme adulto, cuello-escólex y proglótides maduras y grávidas de *T. solium*.

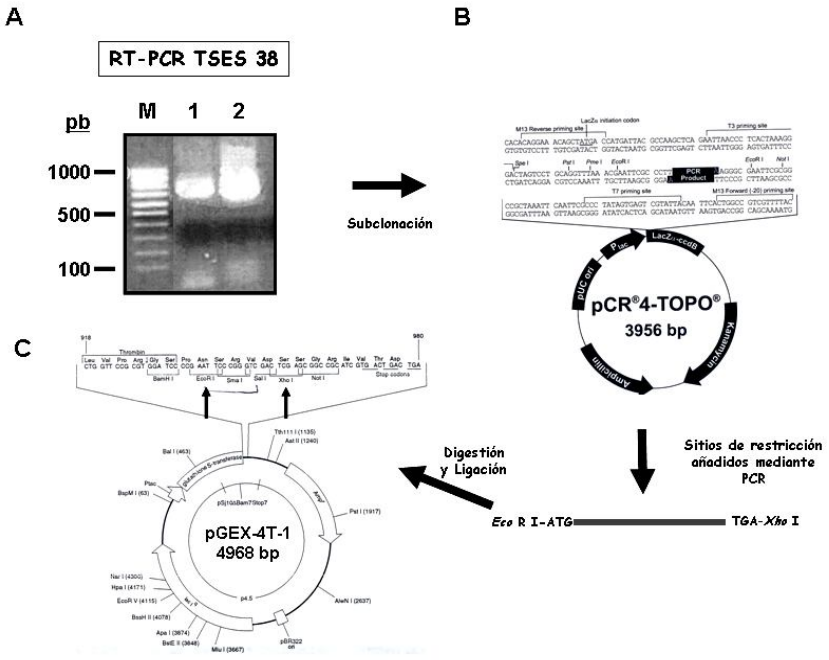

Figura 1. Esquema del aislamiento y subclonación de la molécula TSES38. A) Electroferesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, donde se observa el ADNc de TSES38 amplificado por RT-PCR: (1) RNA de cuello-escólex de adulto de *T. solium;* (2) RNA de proglótides maduras-grávidas de adulto de *T. solium*; (M) marcador de 100 pb ladder (Biotools). B) Estrategia para la subclonación del cDNA de TSES38 en el vector pCR 4®-TOPO®. C) Estrategia para la subclonación del cDNA en el vector de expresión pGEX-4T-1.

El segundo abordaje consistió en la síntesis del ORF de la molécula TSES33 mediante ingeniería genética utilizando como herramienta la PCR (construcción de un ADNc quimérico). Con este objetivo, se estudió el ORF de 804 pb de TSES33 (Nº de acceso AY183761) mediante el subprograma MAPDRAW del paquete LASERGENE para seleccionar un sitio de restricción único en dicha secuencia. Se confirmó que presentaba un sitio único para la endonucleasa *Hind*III, localizado en el nucleótido 642, rindiendo la digestión dos fragmentos de 642 pb y 162 pb. Posteriormente, se diseñaron una serie de parejas de cebadores directos y reversos solapantes para cada uno de los fragmentos indicados.

La construcción se realizó mediante 7 y 2 amplificaciones seriadas para el fragmento inicial y terminal respectivamente, en las que el producto obtenido de cada reacción se utilizó como molde para la siguiente amplificación. Por tanto, fuimos sintetizando amplicones de 106 pb, 202 pb, 286 pb, 384 pb, 475 pb, 588 pb y 642 pb para el fragmento inicial y 108 pb y 162 pb para el fragmento terminal. Con los amplicones finales de ambos fragmentos se realizó la ligación en el vector pCR 4® TOPO®. Finalmente, una vez confirmadas por secuenciación la composición de los clones inicial y final obtenidos, se procedió a introducir los sitios de restricción adecuados. Así, en el fragmento inicial se introdujo los sitios *Eco*RI en el extremo 5´ y *Hind*III en el extremo 3´, y en el fragmento final los sitios *Hind*III en el extremo 5´ y *Xho*I en el extremo 3´; de esta manera se permitió su posterior subclonación en los vectores de expresión pGEX-4T-1. Todas las modificaciones indicadas se llevaron a cabo mediante PCR con los cebadores diseñados para este fin (Figura 2).

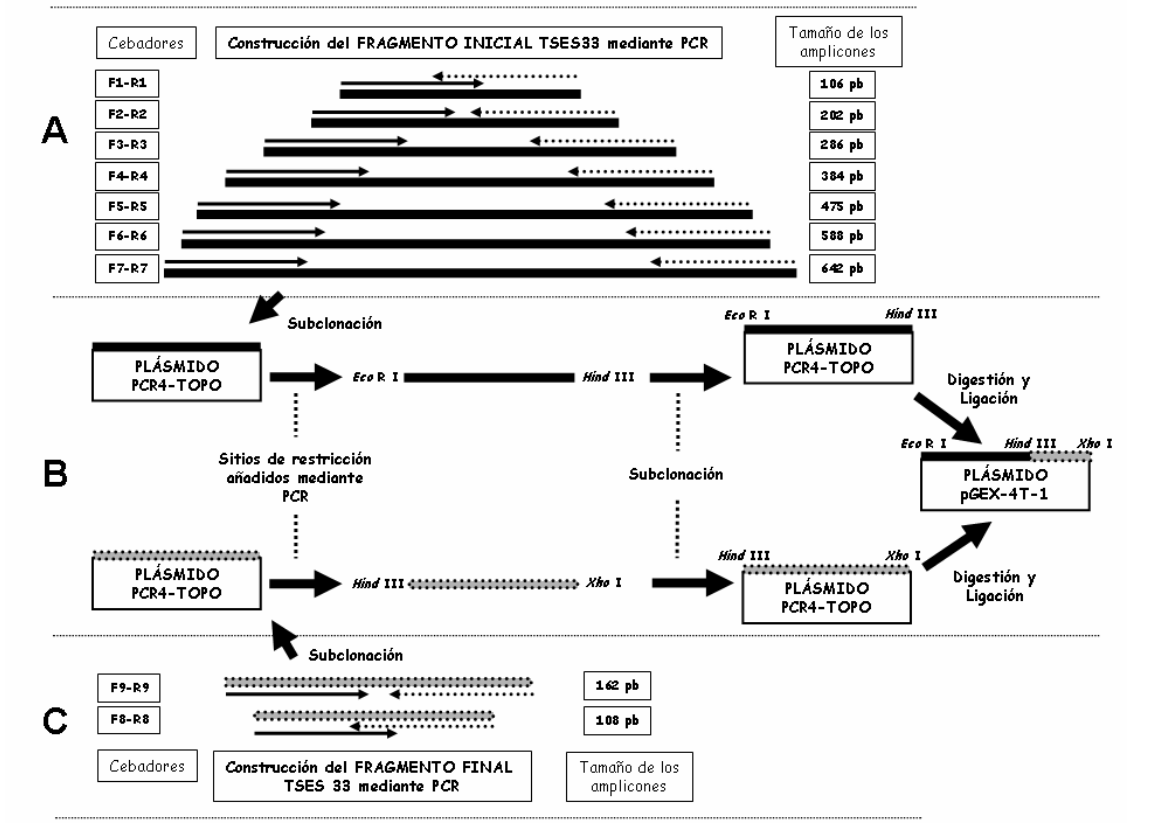

Figura 2. Estrategia para la obtención y subclonación de la molécula quimérica TSES33. A) Esquema de la construcción del fragmento inicial de la molécula TSES33: pareja de cebadores así como tamaño de los amplicones obtenidos en las siete PCRs seriadas llevadas a cabo. B) Estrategias para la subclonación de los fragmentos iniciales y terminales de la molécula TSES33 en el vector pCR 4®-TOPO® y en el vector de expresión pGEX-4T-1. C) Esquema de la construcción del fragmento terminal de la molécula TSES33: pareja de cebadores así como tamaño de los amplicones obtenidos en las dos PCRs seriadas empleadas

Es importante señalar que se eligió el abordaje de la construcción de ADNc quimérico para el antígeno TSES33, ya que dicho antígeno no se pudo aislar mediante RT-PCR a partir del ARN total de *T. solium* (dato no mostrado) tras realizar varios intentos. Si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en la RT-PCR con la molécula TSES38, podemos afirmar que el ARN total utilizado estaba en buenas condiciones, y el resultado negativo con TSES33 se podría explicar porque este antígeno exhibe menores niveles de expresión, y, por tanto, sería necesario más ARN total en la reacción de partida, aspecto que no se contempló en su momento. Otra posibilidad a considerar podría ser que esta molécula se expresa solamente en proglótides inmaduras y no en las porciones del adulto utilizadas en la extracción de ácidos nucleicos.

Reflexionando sobre todas las posibilidades comentadas, sería interesante en el futuro averiguar si existe una expresión diferencial de las dos moléculas entre las distintas regiones del adulto de *T. solium*, haciendo uso por ejemplo de aproximaciones de PCR en tiempo real. Por otra parte, la metodología de construcción de una quimera de ADN ha sido empleada por otros autores para la síntesis de varios fragmentos de ADN no codificantes de *Rickettsia prowazekii*, *R. bellii* y *R. aeschlimannii*. Dichos fragmentos

permitieron la optimización de una multiplex-PCR que fue capaz de identificar, de manera especie-específica, dichos patógenos bacterianos con muestras de pacientes (35). Sin embargo, en nuestro trabajo, y a diferencia del estudio anterior, el fragmento quimérico sintetizado se correspondió con el ORF de la molécula TSES33. Por tanto, hubo que trabajar de manera precisa en su síntesis para que no existiera ningún error en la secuencia del ADNc, como mutaciones puntuales o "gaps", errores comunes que se producen como consecuencia del uso de la enzima *Taq* polimerasa de forma continuada. De hecho, se desarrollaron dos intentos de clonación, ya que durante el primero se perdió un nucleótido que varió el marco de lectura encontrándonos con un codón de parada antes de tiempo (dato no mostrado), y fue el segundo intento el que condujo a la obtención del ORF correcto y de esta manera la correspondiente proteína TSES33. Por tanto, hemos podido comprobar y confirmar la ventaja de este abordaje molecular, que resulta particularmente útil cuando no se dispone del correspondiente material parasitario y se tiene información sobre la secuencia a clonar.

Después, se llevó a cabo la subclonacion de los dos ADNc (TSES33 y TSES38) en el vector de expresión pGEX-4T-1, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a GST. Para visualizar dichas expresiones, se realizó el fraccionamiento de los extractos proteicos de *E. coli*, previamente tratados con tampón de lisis B-PER (Pierce), en un gel al 10% SDS-PAGE. Podemos observar en la Figura 3 que las proteínas mayoritarias presentes en el extracto de *E. coli* inducido se corresponden con las proteínas de fusión de GST (26 kDa) más los antígenos recombinantes TSES33 (28,8 kDa) y TSES38 (30,58 kDa), con un peso total de 54,8 kDa y de 56,58 kDa respectivamente. Además, se confirmó que dichas moléculas se expresaban como productos insolubles.

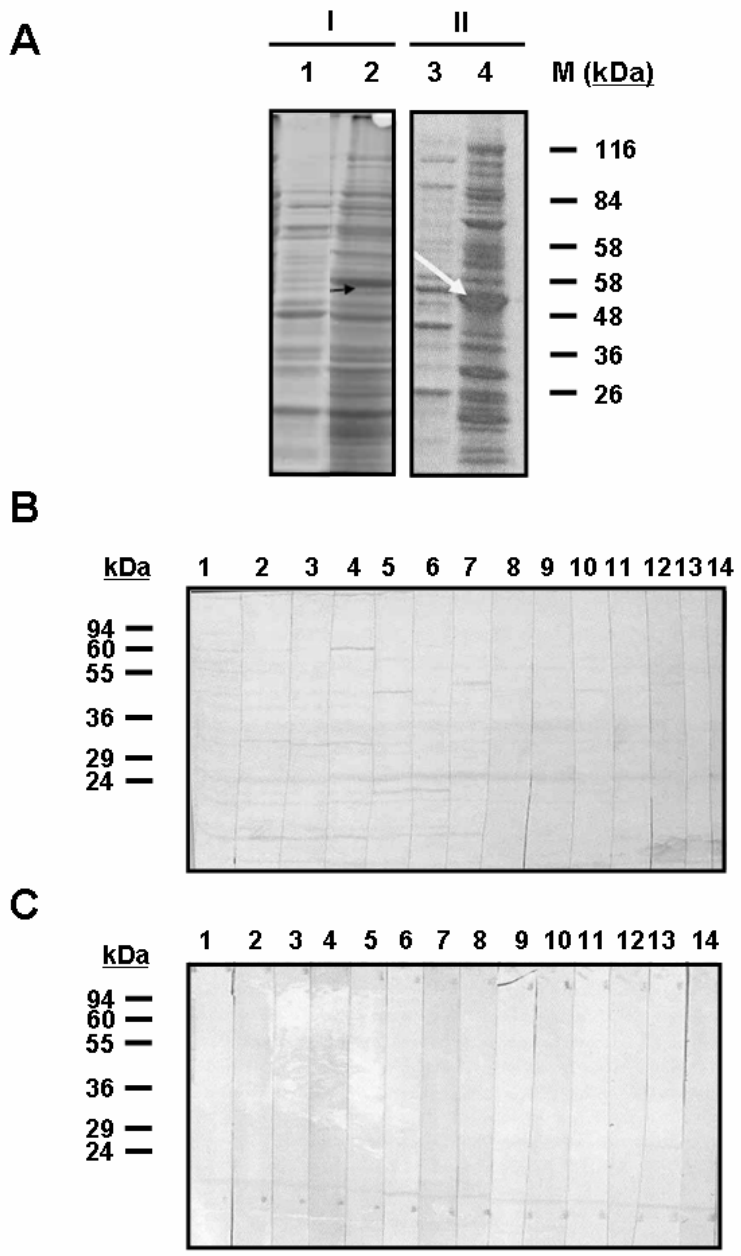

Figura 3. A) Electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% con el fraccionamiento de los productos de expresión pGEX-4T-1 de las moléculas TSES38 (I) y TSES33 (II), teñido con Azul de Coomassie. (M) marcador de peso molecular ("Sigma marker wide ranger MW"), (1) extracto proteico inducido soluble, (2) extracto proteico inducido insoluble. Las flechas indican la posición de las proteínas recombinantes expresadas. B) Análisis inmunoenzimático "Western-blot" de la proteína recombinante inducida del clon TSES38. C) Análisis inmunoenzimático "Western-blot" de la proteína recombinante inducida del clon TSES33. (1-12): cada tira incubada con un suero de paciente infectado con *T. saginata*, (13) tira incubada con una mezcla de sueros de pacientes sanos, (14) tira incubada con una mezcla de suero de conejos inmunizados con glicoproteínas de metacestodos de *T. solium* (TEW53, TEW54, TEW55).

Posteriormente, se llevó a cabo el "Western blot" con extracto proteico inducido de *E. coli* correspondiente a la fracción insoluble fraccionada, ante

la imposibilidad de purificar las proteínas recombinantes expresadas. Las membranas fueron incubadas con sueros de pacientes portadores de *T. saginata*, así como con una mezcla de sueros de pacientes sanos y una mezcla de sueros de conejos inmunizados con glicoproteínas de metacestodos de *T. solium*.

Las proteínas expresadas no fueron reconocidas por los sueros de los pacientes portadores de *T. saginata*, ni por las otras muestras utilizadas, resultando moléculas no antigénicas en nuestras condiciones de trabajo. En relación con la mezcla de sueros de conejos inmunizados con glicoproteínas del metacestodo de *T. solium*, el resultado negativo obtenido se podría explicar teniendo en cuenta la naturaleza estado-específica de los antígenos estudiados (31), si bien se necesitan otros estudios con las proteínas expresadas en sistemas eucariotas y más sueros para confirmar dicha hipótesis. Con respecto a los sueros de pacientes portadores de *T. saginata*, los resultados negativos podrían explicarse por la naturaleza especie-específica de TSES33 y TSES38 de *T. solium*, como lo han defendido algunos autores (31).

También se debe considerar que la inmunogenicidad de las proteínas nativas reside exclusivamente en epitopos glucídicos, ya que las secuencias aminoacídicas deducidas contienen sitios hipotéticos de glicosilación, y los antígenos en el presente trabajo se expresaron en *E. coli*. En este sentido, Levine *et al.* (31) aislaron dichas proteínas nativas por abordajes de proteómica y expresaron las proteínas recombinantes en un sistema eucariota (Baculovirus), que aporta modificaciones postraduccionales en relación con los sistemas procariotas utilizados en el presente estudio.

Estos autores obtuvieron unos resultados excelentes de especificidad y sensibilidad frente a un panel de sueros humanos de pacientes portadores de *T. solium* y de pacientes con cisticercosis. Más tarde, el mismo grupo de investigación llevó a cabo un trabajo empleando un mayor número de sueros para confirmar las propiedades de las proteínas recombinantes TSES33 y TSES38, expresadas en el mismo sistema (32). Los autores observaron falsos positivos con la proteína TSES38, con 17 de los 26 sueros peruanos de individuos portadores de *T. saginata*. Sin embargo, no observaron ningún falso positivo con dichos sueros frente a la proteína TSES33.

En nuestro caso, las proteínas TSES33 y TSES38, expresadas en un sistema procariota (sin modificaciones postraduccionales) y frente a un panel reducido de sueros, no han mostrado antigenicidad. Hasta el momento, en el Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III no se ha registrado ningún suero de paciente portador de *T. solium* que podría ser utilizado en el estudio. En el futuro próximo, se llevará a cabo la subclonación de dichos antígenos en un sistema eucariota (Baculovirus) y se harán trabajos en zonas endémicas, como Venezuela, México y Bolivia, donde se puede tener acceso a las muestras séricas necesarias.

AGRADECIMIENTOS *Esta investigación ha sido financiada por el Programa Intramural-ISCIII (MPY 1472), y también por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Instituto de Salud Carlos III dentro de la Red de Investigación de Enfermedades Tropicales (RICET, RD 06/0021/0019) y el Proyecto CDCH-010610-2008, Universidad de Carabobo, Venezuela. La Dra.Villalobos fue financiada por FMV-UNAM y CONACYT (Proyecto 400310-5-35418-B).*

BIBLIOGRAFIA

1. Chester P, Clifton J, Wayne EC. (1986). Parasitología Clínica. Salvat editores. México
2. Willingham AL, Engels D. (2006) Control of *Taenia solium* Cysticercosis/Taeniosis. Adv Parasitol. 61:509-547.
3. Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E. (2004). Symptomatic human neurocysticercosis--age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. J Neurol. 251(7):830-7.
4. Sotelo J, Del Brutto OH. (2002). Review of neurocysticercosis. *Neurosurg* Focus. 12(6):e1.
5. Carpio A, Escobar A, Hauser WA. (1998). Cysticercosis and epilepsy: a critical review. Epilepsia. 39(10):1025-40.
6. Roman, G., Sotelo, J., Del Brutto, O., Flisser, A., Dumas, M., Wadia, N., Botero, D., Cruz, M., Garcia, H., de Bittencourt, P., Trelles, L., Arriagada, C., Lorenzana, P., Nash, T., Spina-França. (2000). A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bull World Health Organ. 78 (3): 399-406.
7. Chadha V, Pandey PK, Chauhan D, Das S. (2005). Simultaneous intraocular and bilateral extraocular muscle involvement in a case of disseminated cysticercosis. Int Ophthalmol. 26(1-2):35-7.
8. Cordero del Campillo M, Castañón L, Reguera A. (1994). Índice-Catálogo de zooparásitos ibéricos. Universidad de León. Secretariado de publicaciones, pp. 109-139.
9. Roca C, Gascon J, Font B, Pujol T, Valls ME, Corachan M. (2003). Neurocysticercosis and population movements: analysis of 23 imported cases in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 22(6):382-4.
10. Terraza S, Pujol T, Gascón J, Corachán M. (2001). Neurocysticercosis: an imported disease? *Med. Clin. (Barc.)* 116(7):261-263.
11. Flisser A., Gyorkos T.W. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. Parasite Immunol. 2007; 29: 637-649.
12. Proctor, B.M.,. Identification of tapeworms. South. Afric. Med. J. 1972; 46: 234-238.
13. Bowles, J., McManus. D.P. Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described Taeniid cestode of Humans. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50: 33-44.
14. Gonzalez, L.M., Montero, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. J Clin Microbiol. 2000; 38: 737-744.
15. Mayta, H., Talley, A., Gilman, R.H., Jiménez, J., Verastegui, M., Ruiz, M., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 2000; 38: 133-137.
16. Gonzalez, L.M., Montero, E., Puente S., Lopez-Velez, R., Hernández, M., Sciutto, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T. PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geographical locations. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002; 42: 243-249.

17. Rodriguez-Hidalgo, R., Geysen, D., Benitez-Ortiz, W., Geerts, S., Brandt, J. Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenia saginata* and an improved polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment. J. Parasitol. 2002; 88: 1007-1011.

18. Nunes, C.M., Lima, L.G., Manoel, C.S., Pereira, R.N., Nakano, M.M., Garcia, J.F. *Taenia saginata*: polymerase chain reaction for taeniasis diagnosis in human fecal samples. Exp Parasitol. 2003; 104: 67-69.

19. Yamasaki, H., Allan, J.C., Sato, M.O., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Qiu D., Mamuti, W., Craig, P.S., Ito, A. DNA differential diagnosis of Taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42: 548-553.

20. Nunes, C.M., Dias, A.K., Dias, F.E., Aoki, S.M., de Paula, H.B., Lima, L.G., Garcia, J.F. *Taenia saginata*: differential diagnosis of human taeniasis by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. Exp Parasitol. 2005; 110: 412-415.

21. Dias, A.K., Aoki, S.M., Garcia, J.F., Nunes, C.M. *Taenia solium* and *Taenia saginata*: identification of sequence characterized amplified region (SCAR) markers. Exp. Parasitol. 2007; 117: 9-12.

22. Jeon, H.K., Chai, J.Y., Kong, Y., Waikagul, J., Insisiengmay, B., Rim, H.J., Eom, K.S. Differential diagnosis of *Taenia asiatica* using multiplex PCR. Exp. Parasitol. 2009; 121:151-156.

23. Allan J.C., Craig P.S. Coproantigens in taeniasis and echinococcosis. Parasitol Int. 2006; 55: S75-80.

24. Wilkins P.P., Allan J.C., Verastegui M., Acosta M., Eason A.G., Garcia H.H., Gonzalez A.E., Gilman R.H., Tsang V.C. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. Am J Trop Med Hyg. 1999; 60:199-204.

25. Allan, J.C., Avila G., Garcia Noval J., Flisser A., Graig, P.S. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. Parasitol. 1990; 101: 473-447.

26. Deplazes, P., Eckert, J., Pawlowski, Z., Machowska, L., Gottstein, B. An enzime-linked immunosorbent assay for diagnostic detection of *Taenia saginata* copro-antigens in humans. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1991; 85: 391-396.

27. Machnicka B., Dziemian E., Zwierz C. Detection of *Taenia saginata* antigens in faeces by ELISA. Appl Parasitol. 1996; 37:106-110.

28. Montenegro T.C., Miranda E.A., Gilman R. Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium.* Ann Trop Med Parasitol. 1996; 90:145-155.

29. Allan J.C., Mencos F., Garcia-Noval J., Sarti E., Flisser A., Wang Y., Liu D., Craig P.S. Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. Parasitology. 1993; 107: 79-85.

30. Allan J.C., Velasquez-Tohom M., Torres-Alvarez R., Yurrita P., Garcia-Noval J. Field trial of the coproantigen-based diagnosis of Taenia solium taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay.Am J Trop Med Hyg. 1996; 54: 352-356.

31. Levine M.Z., Calderón J.C., Wilkins P.P., Lane W.S., Asara J.M., Hancock K., Gonzalez A.E., Garcia H.H., Gilman R.H., Tsang V.C. Characterization, cloning, and expression of two diagnostic antigens for Taenia solium tapeworm infection. J Parasitol. 2004; 90:631-638.

32. Levine M.Z., Lewis M.M., Rodriquez S., Jimenez J.A., Khan A., Lin S., Garcia H.H., Gonzales A.E., Gilman R.H., Tsang V.C. Development of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay using two baculovirus expressed recombinant antigens for diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. J Parasitol. 2007; 93: 409-417.

33. Tsang V.C., Brand J.A., Boyer A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989; 159 :50-59.

34. Sambrook J. And Russell D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

35. Jado I., Escudero R., Gil H., Jiménez-Alonso M.I., Sousa R., García-Pérez A.L., Rodríguez-Vargas M., Lobo B., Anda P. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. J Clin Microbiol. 2006; 44: 4572-4576.

36. Sanger F., Nicklen S., Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74: 5463-5467.

37. Altschul S.F., Madden T.L., Schffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997; 25: 3389-3402.

38. Ferrer E., Bonay P., Foster-Cuevas M., González L.M., Dávila I., Cortéz M.M., Harrison L.J., Parkhouse R.M., Gárate T. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. Mol Biochem Parasitol. 2007;152:90-100.

39. Ferrer E., Moyano E., Benitez L., González L.M., Bryce D., Foster-Cuevas M., Dávila I., Cortéz M.M., Harrison L.J., Parkhouse R.M., Gárate T. Cloning and characterization of *Taenia saginata* paramyosin cDNA. Parasitol Res. 2003; 91:60-67.