

ARTICULO

Clonación de genes por *spliced leader* a partir de genotecas de expresión de cisticercos de *Taenia solium*

Oswgladys Garrido^{1,2}, Dayana Requena¹, Carlos Flores Angulo¹, Teresa Gárate³, Elizabeth Ferrer^{1,4}.

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

2 Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

3 Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

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

Correspondencia: Elizabeth Ferrer

E-mail: elizabeth.ferrer@gmail.com

Recibido: Dic. 2011 **Aceptado:** Abril 2012

Financiamiento: PROYECTO CDCH-UC-010610-2008.

RESUMEN

La cisticercosis es una enfermedad causada por el estadio larvario (cisticerco) de *Taenia solium*. El diagnóstico de la enfermedad se ve limitado por la disponibilidad de antígenos del parásito, donde una alternativa sería la clonación de genes codificantes de antígenos. En *T. solium*, al igual que en otros parásitos, ocurre un mecanismo alternativo en el procesamiento de algunos ARNm, denominado *trans-splicing*, en el cual una pequeña molécula de ARN conocida como *Spliced Leader* (SL) es añadida al extremo 5' de una molécula de pre-ARNm, formando diferentes ARNm maduros que

contienen un extremo 5' común. Debido a las limitaciones que presenta el diagnóstico, además del interés en el estudio de este mecanismo, el objetivo de este trabajo fue clonar moléculas que utilizan este procesamiento post-transcripcional. Para ello, se realizó un cribado mediante PCR a partir de genotecas de expresión de cisticerco de *T. solium* utilizando como cebador directo TSSL-DW2 y como reverso ZAP-3'UP que hibridan con la secuencia SL y con la del vector, respectivamente. Se obtuvieron productos de ADNc de diferentes tamaños, que fueron clonados en un plásmido de mantenimiento (pGEM-T-easy). Posteriormente, mediante PCR de colonias se verificó la presencia de los insertos y se estimó su tamaño, obteniendo un total de 56 clones de tamaño variable (150-1200 pb). Este diseño permitió la identificación de genes de *T. solium* que utilizan el mecanismo de *trans-splicing*; y además de ser una estrategia fácil para clonar moléculas completas, abre camino para futuras investigaciones enfocadas en el diagnóstico de cisticercosis.

Palabras claves: *Taenia solium*, cisticercosis, *Spliced Leader*, clonación.

ABSTRACT

Spliced leader gene cloning from expression library of *Taenia solium* cysticerci

Cysticercosis is caused by the larval stage of *Taenia solium* (cysticercus). The diagnosis of the disease is limited by the availability of parasite antigens; an alternative would be the cloning of gene encoding antigens. In *T. solium*, as in other parasites, an alternative mechanism in the processing of some mRNAs called *trans-splicing* occurs, in which a small RNA known as Spliced Leader (SL) is added to the 5' end of pre-mRNA molecules, forming a common 5'-terminal exon of the mature mRNAs. Due to limitations for diagnosing the disease, in addition to the interest in the study of this mechanism, the aim of this work was to clone molecules that use this

post-transcriptional processing. In this study we did a screening by PCR from cDNA library of *T. solium* cysticerci using the forward primer TSSL-DW2 and the reverse primer ZAP-3'UP that hybridize with SL and vector sequence, respectively. cDNAs of different sizes were obtained that were cloned in maintenance plasmids (pGEM-T-easy). The presence of inserts and their sizes were estimated by colony PCR, obtaining a total of 56 clones of different sizes (500-1200 bp). This design allows the identification of of *T. solium* genes using the trans-splicing mechanism; and besides being an easy strategy to clone complete molecules, it opens the way for future investigations on the diagnosis of cysticercosis.

Keywords: *Taenia solium*, cysticercosis, Spliced Leader, cloning.

INTRODUCCIÓN

La teniasis es una infección parasitaria intestinal producida por la fase adulta de *Taenia saginata* o *Taenia solium* en la cual el hombre es el único hospedador definitivo. La cisticercosis ocurre como consecuencia de la infección por el estado larvario del parásito (cisticerco o metacestode) en hospedadores intermediarios. El cisticerco de *T. saginata* (*Cysticercus bovis*) provoca la cisticercosis bovina y el cisticerco de *T. solium* (*Cysticercus cellulosae*) causa la cisticercosis porcina y humana, ya que el hombre también puede convertirse en hospedador intermediario de *T. solium* cuando ingiere accidentalmente los huevos en alimentos y aguas contaminadas (1).

Cuando los cisticercos invaden el Sistema Nervioso Central (SNC) del hombre se produce una enfermedad denominada neurocisticercosis (NCC), que en la actualidad representa un serio problema de salud pública, no sólo en países en vías de desarrollo de América, África y Asia, sino también en Estados Unidos y en algunas naciones europeas que han experimentado

recientemente un movimiento migracional masivo de gente proveniente de áreas endémicas (2).

El binomio teniasis/cisticercosis ha sido por mucho tiempo parte de las enfermedades olvidadas, pero últimamente se han producido varias iniciativas importantes para conseguir su control, y se les considera como enfermedades potencialmente erradicables. La cisticercosis es una enfermedad que afecta a 50 millones de personas en todo el mundo y causa 50.000 muertes anuales (3). En este sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado una propuesta para declarar la NCC como una enfermedad de denuncia obligatoria (4).

Debido a que la NCC puede ser asintomática o cursar con signos y síntomas inespecíficos, es difícil realizar un diagnóstico de la enfermedad en base a las manifestaciones clínicas del paciente, por lo que se recurre a otros métodos, como son las técnicas de imagenología y los ensayos inmunológicos.

Las técnicas de neuroimágenes, tales como Tomografía Axial Computarizada (TAC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), son útiles para el diagnóstico, pero la infección puede pasar desapercibida cuando el número de cisticercos es bajo o las imágenes no son concluyentes. Por otro lado, estas técnicas son muy costosas y de difícil acceso en la mayoría de las áreas donde la cisticercosis es endémica (5).

La mayoría de las técnicas de inmunodiagnóstico se basan en la detección de anticuerpos anti-cisticerco tanto en suero como en líquido céfaloraquídeo (LCR) y resultan de gran utilidad para la identificación de cisticercosis. Sin embargo, estas pruebas carecen de la adecuada sensibilidad y especificidad debido a la gran reactividad cruzada con otras parasitosis (6). En base a esto se ha trabajado con antígenos purificados

que exhiben muy buena sensibilidad y especificidad (7), al igual que con los antígenos de excreción/ secreción (E/S) de cisticercos de *T. solium* (8).

Aunque se han realizado múltiples estudios sobre antígenos específicos para el diagnóstico de la enfermedad, la purificación de éstos requiere gran cantidad de material parasitario, que no es fácil de obtener, y de equipos sofisticados y técnicas laboriosas, por lo que se ha recurrido a la tecnología del ADN recombinante para la clonación de las moléculas de interés diagnóstico (9).

El *Spliced Leader trans-splicing* es un mecanismo de procesamiento de algunos ARNm durante el cual una pequeña molécula de ARN (39-41 nt) conocida como *Spliced Leader* (SL) o mini-exón es añadido al extremo 5' de una molécula de preARNm, formando diferentes ARNm maduros que contienen un extremo 5' común. En el proceso de *trans-splicing* ocurren dos reacciones de *trans*-esterificación similares al *cis-splicing*, pero se genera una estructura intermedia en forma de Y en lugar de un lazo donde se elimina una secuencia del ARNm llamada outrón (10).

Inicialmente el mecanismo SL *trans-splicing* fue descrito en parásitos del género *Trypanosoma* (11), pero ha sido demostrado en nemátodos (12), tremátodos (13) y más recientemente en céstodos (14-15). A pesar de que el mecanismo *trans-splicing* ya es conocido, aún no se conoce completamente cuáles son las características en moléculas de ARNm inmaduro que las seleccionan para sufrir esta modificación post-transcripcional (16), pues aunque en tripanosomas todos los ARN son modificados, en los demás géneros existen porcentajes de transcriptos que no sufren *trans-splicing*; lo que sí es conocido ya es que la molécula de SL añadida provee una caperuza 5' a los ARNm maduros necesarias para iniciar la traducción (17).

En el año 2002 se logró caracterizar el gen *Spliced Leader* y ARNms *trans-spliced* de cisticerco de *T. solium* mediante una PCR empleando cebadores degenerados dirigidos contra secuencias conservadas 5' y 3' SL-ARNs de *Echinococcus* y tremátodos, respectivamente, y utilizando como molde ADN cromosomal aislado a partir de cisticerco de *T. solium* (15).

Por todo lo antes expuesto, se planteó clonar ADNc codificantes de proteínas de *T. solium* a partir de una genoteca de expresión de cisticercos empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como cebadores la secuencia SL y del vector. De esta manera se podría proporcionar, mediante técnicas de ADN recombinante, moléculas nuevas que sean útiles para ser empleadas como antígenos en ensayos inmunoenzimáticos o como posibles vacunas, o quizás proveer información nueva sobre moléculas involucradas en la relación parásito-hospedador. Otra posible utilidad sería identificar probables blancos terapéuticos, por estar involucrados en vías metabólicas clave para el parásito y diferentes a las del humano, en el cual no ocurre esta modificación post-transcripcional. Además, la clonación de estas moléculas puede contribuir al estudio sobre la identificación de las características en común que presentan los ARNm que utilizan esta modificación post-transcripcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico. Se trabajó con dos genotecas de expresión de metacestodos de *T. solium* construidas previamente en el vector Uni-ZAP XR® (Stratagene). Según los tamaños de los ADNc clonados, las genotecas fueron clasificadas en Genoteca de ADNc grandes y Genoteca de ADNc medios. El vector utilizado para la clonación fue el plásmido de mantenimiento *pGEM®-T Easy* (Promega), un vector diseñado

para el clonaje directo de productos de PCR purificados.

Cribado de las genotecas de expresión de cisticerco de *Taenia solium* mediante "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR). Esta técnica se empleó para seleccionar los ADNc codificantes de genes de *T. solium* que utilizan el mecanismo *trans-splicing*.

En el ensayo de PCR se utilizó como cebador directo TSSL-DW2 (5'-GGTCCCTTACCTTGCAATTTTGT-3'), específico de la secuencia SL de *T. solium*, diseñado previamente (15), y como cebador reverso ZAP-3'UP (5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'), específico del vector Uni-λZAP[®] XR; se utilizó como ADN molde diluciones de las genotecas de expresión de cisticerco de *T. solium* previamente construidas (18). Las condiciones de la reacción fueron: MgCl₂ 1,5 mmol/L, desoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 0,2 mmol/L, cebadores 0,5 μmol/L y *Taq* Polimerasa Promega 1U. Se utilizó 10 μl de una dilución 1:10 del ADN molde, incubados en Tris-HCl 50 mmol/L pH 9,0 y NaCl 50 mmol/L. Como control positivo se utilizó la molécula M21a que contiene la secuencia SL (GenBank: AM412593.1), y como control negativo agua desionizada estéril. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (C1000[™], BIO-RAD), programado para 32 ciclos: un primer ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 10 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 52°C por 30 s, extensión a 72°C por 5 min, y un último ciclo de extensión final a 72°C por 10 min (15). Posteriormente, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 μg/ml) (19) en un trans-iluminador UV Gel Doc 1000 (Bio-Rad[®]), con ayuda del programa Multi-Analyst (Bio-Rad[®]).

Extracción y purificación de los productos de la PCR. El conjunto de bandas que se observaron producto de la PCR en el gel de agarosa al 1% se agrupó en tres grupos de acuerdo a su tamaño: fracción 1 (F1) las moléculas más grandes, fracción 2 (F2) las moléculas de tamaño mediano y fracción 3 (F3) las moléculas de tamaño pequeño (Figura 1), y luego fueron purificadas a partir del gel utilizando el kit comercial Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADN eluido y solubilizado en agua libre de nucleasas se congeló a -20°C hasta su posterior ligación en el plásmido de mantenimiento.

Preparación de células competentes

***E. coli* XL1-Blue MRF.** La preparación de células competentes se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo: a partir de placas de LB agar (10 g/L triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl, pH 7,5; 15 g/l de agar) de *E. coli* XL1-Blue MRF' que además contenían 12,5 μg/ml de tetraciclina; se tomó una colonia y se cultivó en 50 ml de medio LB (10 g/L triptona, 5g/l extracto de levadura, 5g/l NaCl, pH 7,5) a 37°C y 200 rpm, hasta obtener una DO_{600nm} entre 0,5 - 0,7. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min a 4°C, y el sedimento de bacterias se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ 100 mmol/L a 4°C. Se repitió el paso de centrifugación, y luego, el sedimento de bacterias se resuspendió en 2 ml de solución CaCl₂ 100 mmol/L, glicerol 15% a 4°C. Finalmente, se realizaron alícuotas de 200 μl cada una, y se congelaron rápidamente a -80°C.

Clonación en el plásmido de mantenimiento pGEM[®]-T Easy.

Cada una de las tres fracciones de los productos de PCR (inserto), una vez purificados se ligó con el vector en la proporción 1:3 (vector:inserto) con 1 U de T4 ADN ligasa (Promega[®]) en presencia de un tampón adecuado (Tris-HCl 30 mmol/L pH 7,8; MgCl₂ 10

mmol/L, DTT 10 mmol/L, ATP 1mmol/L y polientilenglicol 5%) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, e incubado durante toda la noche a 4°C.

Transformación de las células competentes con la mezcla de ligación. Posteriormente, se realizó la transformación de las células competentes con la mezcla de ligación. Para ello se colocaron 50 µl de las células en tubos Corning de 15 ml, identificados como MF₁, MF₂ y MF₃ para los fragmentos provenientes de la genoteca mediana, y GF₁, GF₂ y GF₃ para los fragmentos provenientes de la genoteca grande, donde se agregó la mezcla de ligación (volumen final 10 µl) y se incubó en hielo por 30 min. Finalizada esta etapa se realizó el choque térmico, incubando en baño de María a 42°C durante 60 s, y seguidamente se incubaron en hielo durante 2 min. Luego, se añadieron 950 µl de medio LB precalentado a 42°C, y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación constante (200 rpm) (19).

Selección de las células transformadas. Las células transformadas se cultivaron sobre placas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml) como indicador de transformación, más 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal, 8 mg/ml) e isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG, 40 mmol/L) como indicadores de recombinación, y se incubaron a 37°C durante toda la noche (19).

PCR de colonias para verificar los fragmentos clonados y estimar el tamaño de los mismos. Se seleccionaron las colonias color blanco empleando el método de selección fenotípica basado en la presencia de colonias blanco/azul y la presencia de los insertos se verificó mediante PCR utilizando como ADN molde estas colonias previamente identificadas (20). Para ello, se utilizaron los cebadores específicos del vector T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' y SP6 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

y las reacciones de amplificación se realizaron bajo las siguientes condiciones: MgCl₂ 1,5 mmol/L, dNTPs 0,2 mmol/L, cebadores 0,25 µmol/L cada uno y *Taq* Polimerasa (Promega®) 1U, y se tomó el contenido de cada una de las colonias blancas tomadas de la placa de LB agar con una punta estéril que se sumergió 10 veces en los tubos que contenían la mezcla de amplificación. Posteriormente, esta misma punta se utilizó para inocular las bacterias provenientes de la colonia en placas Máster agar LB/ampicilina (100 µg/ml) para el mantenimiento de las mismas. El programa usado para esta amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 50°C por 30 s, extensión a 72°C por 2 min, y una extensión final a 72°C por 7 min. Posteriormente, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo las condiciones previamente descritas.

RESULTADOS

Cribado de las genotecas de expresión de cisticercos mediante PCR. Como producto de la PCR en ambas genotecas de expresión (mediana y grande) de cisticercos de *T. solium* se obtuvo un conjunto de bandas de diversos tamaños que oscilan de 150 a 1500 pb, aproximadamente. En la figura 1 se observa el patrón electroforético de los productos de PCR provenientes de la genoteca de expresión mediana, cuyo patrón electroforético es similar al obtenido en la amplificación a partir de la genoteca de expresión grande (resultados no mostrados). Cada una de estas bandas corresponde a productos amplificados de ARNm's diferentes que presentan un extremo 5' común correspondiente a la molécula *Spliced Leader*.

PCR de colonias para verificar los fragmentos clonados y estimar el tamaño de los mismos. Como resultado de la transformación de las

células competentes *E. coli* XL1-Blue MRF con el producto de la ligación de los fragmentos en el vector de mantenimiento *pGEM[®]-T Easy* se obtuvo un total de 86 colonias blancas (recombinantes), las cuales fueron verificadas mediante PCR de colonias. Se obtuvo un total de 56 colonias recombinantes con insertos de diferentes tamaños. En la Figura 2 se observa el producto de amplificación de varias colonias recombinantes (carriles 2-4,8-9,12-13,15-18) a partir de la PCR de colonias, donde se evidencia una amplia gama de insertos incorporados cuyo tamaño varían entre 150 a 1200 pb aproximadamente; también se muestra en los carriles 2, 5-7,10-11 y 14 la ausencia de producto PCR lo cual es característico de las colonias no recombinantes. Se obtuvieron 9, 7 y 30 recombinantes de las fracciones MF₁, MF₂, y MF₃, respectivamente, provenientes de la genoteca mediana, así como, 4 y 6 de las fracciones GF₁ y GF₂ y ninguno de la fracción GF₃, procedentes de la genoteca grande. En total se obtuvieron 56 fragmentos clonados.

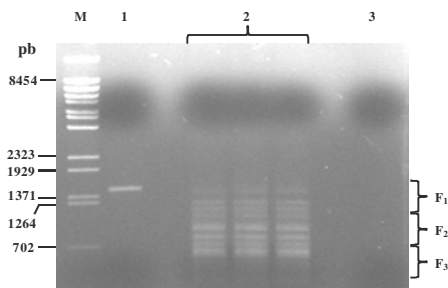


Figura 1. **Productos de PCR del cribado de la genoteca de expresión mediana de cisticercos de *T. solium*.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en el que se observa el conjunto de bandas productos de la PCR *spliced leader*. (M) Marcador de Tamaño molecular λ BstEII (Roche), (1) Control Positivo (Molécula M21a de 1443 pb), (2) productos de amplificación, F₁, F₂ y F₃ indican los grupos de bandas correspondientes a moléculas grandes medianas y pequeñas (3) control negativo.

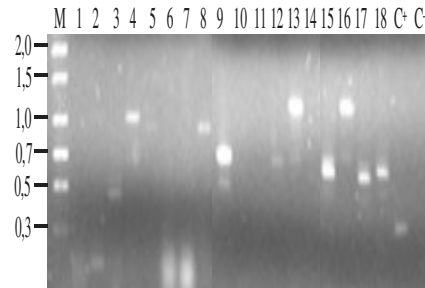


Figura 2. **Identificación por PCR de las colonias recombinantes.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio en el que se observan los productos de una PCR de colonias. (M) Marcador de ADN de 1Kb (Axygen). En los carriles 1, 5-7,10-11 y 14 no hubo amplificación de insertos en esas colonias. En los carriles 2-4, 8-9, 12-13 y 15-18 se observan productos amplificados de los insertos clonados, (C+) control positivo, (C-) control negativo.

DISCUSIÓN

Generalmente, la determinación de los transcritos que sufren *trans-splicing* se ha llevado a cabo por medio de la hibridación sobre genotecas de expresión utilizando sondas marcadas construidas a partir de secuencias SL de otros organismos, como por ejemplo en la caracterización de la molécula de ARN-SL de *Ascaris lumbricoides* (21), o en la caracterización de un nuevo miembro de retro-transposones de *Trypanosoma cruzi* (22) y en la determinación de la secuencia del gen ARN-SL de *Leishmania mexicana amazonensis* (23). Sin embargo, esta metodología no garantiza que las secuencias hibridadas se encuentren completas, pues suele suceder que éstas se encuentren truncadas; por lo que se han diseñado estudios basados en la amplificación selectiva mediante PCR-SL. En la presente investigación, los transcritos con la secuencia SL fueron identificados por PCR utilizando un juego de iniciadores diseñados que hibridan con SL en la región 5' y una región del extremo 3' del vector, siendo una estrategia metodológica similar a la reportada por otros investigadores que

emplearon oligo dT en lugar del cebador del vector, tal es el caso del estudio para conocer que existen transcritos con SL en el genoma del parásito *Onchocerca volvulus* (24) o del estudio en *Toxocara canis* en el que incluyen en la metodología una PCR-SL con cebadores 5`SL y 3` poli A, y consiguen amplificar un transcripto que sólo se expresa en las larvas, mas no en el adulto y que codifica una glicoproteína abundante en la superficie del parásito (25).

En este estudio se realizó la búsqueda dirigida de moléculas dentro de una genoteca de expresión de cisticercos de *T. solium* que contuviese en su secuencia la región SL, obteniéndose un amplio conjunto de transcritos de tamaños diversos (150-1500 pb).

Estos resultados son similares a los obtenidos en investigaciones anteriores que emplearon la misma estrategia de amplificación, también sobre una genoteca de expresión de cisticercos de *T. solium* (15). De esta forma se realiza una amplificación selectiva de forma rápida de sólo aquellos ADNc provenientes de ARNm que sufren el mecanismo *trans-splicing*, diferenciándolos de aquéllos que no sufren esta modificación post-transcripcional a partir de una genoteca que contiene ambos transcritos juntos. En cuanto al sistema de clonaje, se obtuvo una gran cantidad de moléculas recombinantes de diferentes tamaños (150-1200 pb) en un corto tiempo y de forma fácil, lo que indica que éste es un método novedoso y eficiente de clonaje. Además, permite garantizar que todos los ADNc clonados se encuentran completos, debido a la presencia de la secuencia SL en el extremo 5` y a la región de poliadenilación (cola poliA) en el extremo 3`. Este último es la secuencia que se utilizó para la purificación de los ARNm que conforma la genoteca de expresión. Esto es un hecho muy beneficioso a la hora de realizar el clonaje de estas moléculas en un vector de expresión, pues se garantiza

la correcta expresión de las proteínas codificadas por los genes clonados.

La presencia de clones de diferente tamaños crea la necesidad de un estudio detallado de cada una de las secuencias de los clones, ya que a través de esta vía se podrá conocer la participación de la secuencia SL en diversas actividades celulares, además de que permite estudiar un conjunto de moléculas de cisticercos de *T. solium* que quizás no hayan sido nunca caracterizadas por el hecho de que aún se desconocen muchas moléculas de este parásito y el proyecto genoma de este organismo aún no está finalizado (26). Cabe destacar que la mera presencia de la secuencia SL en una molécula no indica directamente que tales transcritos sufran *trans-splicing* como ha sido descrito en el adulto de *Onchocerca volvulus* (27) y *Ascaris lumbricoides* (28), donde la secuencia SL está ubicada dentro del transcripto y no en el extremo 5` como ha sido caracterizado en la mayoría de los organismos (14, 29-32). Esta información resalta en importancia puesto que nuestros resultados preliminares concuerdan con los del grupo de Zeng (24) en cuanto al tamaño de los transcritos identificados, quienes posterior a conocer su secuencia determinaron que cuatro de las moléculas estudiadas tenían tamaños de 490-905 pb y la secuencia SL dentro del mensajero y no en el extremo 5`, sugiriendo que tal vez la región SL participe en la regulación traduccional de ciertos genes utilizando otros mecanismos (24).

Este tipo de estrategia de captura y amplificación selectiva de moléculas con SL y su subsecuente clonación en un vector ha sido utilizada por varios investigadores con diferentes objetivos posteriores; por ejemplo, para la creación de genotecas de sólo ADNc-SL de diferentes organismos parasitarios (*Nematoda*, *Platyhelminthes*), empleando igualmente una PCR-SL a partir de

ADNc de ARN total para aislar sólo aquellas moléculas que sufren la modificación post-transcripcional de cada uno de los organismos. Sin embargo, la estrategia de clonación fue diferente ya que emplearon clonación dirigida con enzimas de restricción, aunque obtuvieron resultados similares con el organismo *E. granulosus* en cuanto al número de colonias recombinantes (96) y a la diferencias de tamaños de los insertos clonados (500-3000pb) (33). Otros estudios han empleado la capacidad de hibridación de los cebadores SL como un posible nuevo mecanismo de tratamiento contra los parásitos de género *Trypanosoma*, ya que se conoce que estos oligos por complementariedad a SL-ARNm bloquean la traducción de las proteínas de estos parásitos mas no la del humano, debido a que no posee este procesamiento post-transcripcional (29).

Basados en nuestro estudio y estudios similares, se podría concluir que el empleo de PCR-SL es una excelente estrategia de selección de moléculas a partir de una genoteca de expresión que garantiza la amplificación de moléculas que se encuentran completas y que pueden ser luego fácilmente clonadas para ser empleadas en diferentes estudios posteriores.

REFERENCIAS

1. Botero D, Restrepo M. Parasitosis tisulares por larvas de helmintos; Parasitosis Humana; 4ta ed. Corporación para investigaciones Biológica. Bogotá 2005; p.356-71.
2. Giménez-Roldán S, Díaz F, Esquivel A. Neurocysticercosis e inmigración. Neurología 2003;18:385-88.
3. Schantz P, Cruz M, Sarti E, Pawlowski Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. Bull Pan Am Health Organ 1993;27:397-03.
4. Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, Garcia H, Bittencourt PR, Trelles L, Arriagada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-Franca A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bull Pan Am Health Organ 2000; 78:399-06.
5. Del Brutto O, Wadia N, Dumas M, Cruz M, Tsang V, Schantz P. Proposal of diagnostic criteria for human neurocysticercosis. J Neurol Sci 1996;42:1-6.
6. Gottstein B, Zini D, Schantz PM. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop Med Parasit 1987;38:299-03.
7. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis 1989;159:50-9.
8. Ng TF, Ko RC. Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994;88:421-22.
9. Ferrer E. Teniasis/cisticercosis: del diagnóstico convencional al diagnóstico molecular. Salus 2007;11:57-61.
10. Martínez Calvillo S, Vizuet de Rueda JC, Florencio Martínez LE, Manning Cella RG, Figueroa Angulo EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. J Biomed Biotechnol 2010;1-15.
11. Lenardo MJ, Dorfman DM, Donelson JE. The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as a cap donor structure. Mol Cell Biol 1985;9:2487-90
12. Bektesh SL, Hirsh DI. *C. elegans* mRNAs acquire a spliced leader through a *trans*-splicing mechanism. Nucleic Acids Res 1988;16:5692
13. Rajkovic A, Davis R, Simonsen N, Rottman F. A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:8879-83.
14. Brehm K, Jensen K, Frosch M. mRNA Trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. J Biol Chem 2000;275:38311-18.

15. Brehm K, Hubert K, Sciutto E, Garate T, Frosch M. Characterization of a spliced leader gene and of *trans*-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:105-10.
16. Liang X, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. *trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors and regulation. *Eukaryot Cell* 2003;2:830-40.
17. Zwierzynski TA, Buck GA. In vitro capping in *Trypanosoma cruzi* identifies and shows specificity for the spliced leader RNA and U-RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:4197-206.
18. Ferrer E. Caracterización molecular de antígenos de *Taenia Solium/T. saginata* relevantes en el inmunodiagnóstico de cisticercosis. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid 2003.
19. Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York 2001.
20. Sheu DS, Wang YT, Lee CY. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from environment by colony PCR. *Microbiology* 2000;146:2019-25.
21. Nilsen T, Shambaugh J, Denker J, Chubb G, Faser C, Putnam L, Bennett K. Characterization and expression of a spliced leader RNA in the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. *Mol Cell Biol* 1989;9:3543-47.
22. Villanueva M, Williams S, Beard C, Richards F, Aksoy S. A new member of a family of site-specific retrotransposons is present in the spliced leader RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol* 1991;11:6139-48
23. Agami R, Shapira M. Nucleotide sequence of the spliced leader RNA gene from *Leishmania mexicana amazonensis*. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1804
24. Zeng W, Alarcon C, Donelson J. Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genome contain the spliced leader sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 1990;10:2765-73.
25. Gems D, Maizels R. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1665-70.
26. The *Taenia solium* Genome Project. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://www.taeniasolium.unam.mx/taenia/> (Fecha de consulta: 28/11/2011).
27. Henkle-Duhrsen K, Liebau E, Walter R. The *Onchocerca volvulus* mRNAs for a hsp70, a collagen-like protein and a ribosomal protein possess a 5' spliced leader sequence. *Trop Med Parasitol* 1993; 44:337-39.
28. Maroney P, Denker J, Darzynkiewicz E, Laneve R, Nilsen T. Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. *RNA* 1995; 1:714-23
29. Walder J, Eder P, Engman D, Brentano S, Walder R, Knutzon D, Dorfman D, Donelson J. The 35-nucleotide spliced leader sequence is common to all trypanosome messenger RNA's. *Science* 1986; 233(4763):569-71.
30. Tessier L, Keller M, Chan R, Fournier R, Weil J, Imbault P. Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *EMBO J* 1991; 10:2621-25.
31. Davis R, Hardwick C, Tavernier P, Hodgson S, Singh H. RNA trans-splicing in flatworms. Analysis of trans-spliced mRNAs and genes in the human parasite, *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 1995; 270(37):21813-19.
32. Allen MA, Hillier LW, Waterston RH, Blumenthal T. A global analysis of *C. elegans* trans-splicing. *Genome Res* 2011;21:255-64
33. Fernandez C, Maizels R. Generating EST Libraries: Trans-Spliced cDNAs. *Methods Mol Biol* 2009; 533:125-51.