

Uso del sistema de expresión de genes heterólogos basado en Baculovirus en la generación de un antígeno híbrido recombinante útil en el inmunodiagnóstico de la hemoncosis de rumiantes

Estefan Miranda-Miranda,* María Hortensia Murillo-Sánchez,* Raquel Cossío-Bayúgar**

RESUMEN

Reportamos en este trabajo la clonación y expresión en el sistema de Baculovirus, de una cisteína proteasa (CP), del nematodo parásito gastrointestinal de rumiantes *Haemonchus contortus*, con el objetivo de obtener con fines inmunodiagnósticos una proteasa recombinante con propiedades bioquímicas e inmunogénicas semejantes a las naturales aplicable a las campañas de diagnóstico, prevención y control de la hemoncosis ovina. Se aisló el gen correspondiente a la CP por medio de PCR, partiendo de cADN de *H. contortus*, la secuencia de ADN se clonó en fase con el promotor de polihedrina en un vector de expresión replicable en bacterias, se usaron células de lepidóptero Sf9 co-transfектadas simultáneamente con el CP-vector y ADN desnudo de baculovirus, las cuales originaron por recombinación homóloga, virus recombinantes con capacidad de expresar la CP en cultivos de células de insecto. La CP se identificó como un precursor inactivo fusionado con un sitio de afinidad 6XHis y se aisló por cromatografía de afinidad para generar CP activa enzimáticamente. La proteasa recombinante fue identificada por el suero de ovinos experimentalmente infestados con *H. contortus* tanto por inmunoelectrotransferencia como por ELISA, así como por su efecto catalítico sobre proteínas copolimerizadas en SDS-PAGE, el sistema de expresión en baculovirus mostró un rendimiento de 400 mg de antígeno diagnóstico recombinante por cada litro de medio (400 mg L⁻¹). Se concluye que la CP recombinante obtenida es semejante a la natural proveniente del parásito, se produce *in vitro* en grandes cantidades y puede ser aplicada en ensayos inmunodiagnósticos e inmunoprofilácticos destinados

ABSTRACT

We report a molecular cloning and expression in the baculovirus system of an *Haemonchus contortus* recombinant cysteine protease (CP) gene, with the objective of obtaining a recombinant CP with biochemical and immunochemical properties similar to the natural one obtained from the parasite, with applications to the diagnosis prevention and control of sheep haemonchosis. The CP gene was isolated by PCR from *H. contortus* cDNA, the gene was cloned downstream to the polyhedrin promoter within a bacterial expression vector, Sf9 insect cells were used co-transfected simultaneously with the CP-vector and baculovirus naked DNA which originated recombinant viruses by homologous recombination capable to express recombinant CP in vitro in an insect cell culture. A recombinant protease was identified as an inactive fusion protein with an affinity 6XHis moiety, it was purified by affinity chromatography in order to obtain enzymatically active recombinant protease which was identified by *H. contortus* experimentally infested ovine sera assayed by western blot and ELISA as well as by enzyme activity on PAGE-gelatin, the baculovirus expression system yielded 400 mg of recombinant diagnostic antigen per liter of culture media (400 mg L⁻¹). We concluded that the obtained recombinant CP is similar to the natural one obtained from the parasite, can be obtained in large amounts from the transfected insect cell culture and may be applied in the immunodiagnostics and control of ruminant haemonchosis.

* Unidad de Helmintología, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria.

** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

Correspondencia:

Dr. Estefan Miranda-Miranda, Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso. Jiutepec Morelos México. E-mail: miranda.estefhan@inifap.gob.mx. Fax: (777)192850 ext 126.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el fondo SAGARPA-CONACYT. No. de proyecto 2004-C01-6/B-1.

Este trabajo cumplió con las normas de Bioética del INIFAP en el uso de animales de laboratorio.

Recibido: 21-05-2007

Aceptado: 10-09-2007

dos al inmunodiagnóstico y control de la hemoncosis de rumiantes.

Palabras clave: Baculovirus, hemoncosis, cisteín proteasa, antígeno recombinante, inmunodiagnóstico.

INTRODUCCIÓN

Las cisteín proteasas (CP) se catalogan como una amplia familia de enzimas genéricamente conocidas como catepsinas. Son proteasas relacionadas con la papaína, que pueden ser subdivididas en más de 10 subfamilias basándose en sus secuencias de aminoácidos y afinidades por diferentes substratos sintéticos.¹ Las CP de los parásitos son de un considerable interés, ya que su actividad parece estar estrechamente relacionada con la invasividad, y procesos vitales de muda de la cutícula y la digestión de la sangre que sirve de alimento a una variedad de helmintos parásitos, por lo que las CP podrían ser el punto de partida de nuevos componentes quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos e inmunodiagnósticos para el control de los helmintos parásitos.²⁻⁴ Se han encontrado CP análogas a las catepsinas B humanas en los nematodos *Haemonchus contortus*, *Ancylostoma duodenale*, *Toxocara canis* y *Onchocerca volvulus*,^{1,2,4,5} así como en los trematodos *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* y *Paragonimus westermani*.⁶⁻⁹ Se sabe que las CP están involucradas de manera importante en la apólisis o separación de la cutícula de la epidermis subyacente, un proceso esencial en la muda de las diferentes fases larvarias de los helmintos, proceso que implica la formación de una nueva cutícula y el desecho de la anterior o ecdisis.^{4,5,10}

La inmunodetección de proteasas para el diagnóstico de helmintos parásitos ha sido utilizado en el formato de ELISA aplicado al diagnóstico de diferentes helmintiasis tanto humanas como animales,¹¹⁻¹³ estos trabajos se fundamentan en el hecho de que estas enzimas constantemente estimulan el sistema inmune del hospedero como antígenos de excreción-secreción (Ex-Se) que fundamentalmente son una mezcla de diferentes proteasas y proteínas del parásito cuyo fin es la degradación de los tejidos y sangre del hospedero que sirven de alimento al parásito,^{13,14} análisis posteriores de la respuesta inmune de ovinos experimentalmente infestados con *H. contortus* han

Key words: *Baculovirus, hemonchosis, cystein protease, recombinant antigen immunodiagnosis.*

permitido determinar que los hospederos son capaces de reconocer 103 antígenos Ex-Se diferentes y que la mayor parte de éstos corresponden con serín, metalo y cisteín proteasas, confirmando de nueva cuenta el valor de estas enzimas en el proceso de alimentación del parásito.¹⁵ Tal es la importancia de estas enzimas en la fisiología parasitaria, que es posible inducir en el hospedero anticuerpos capaces de neutralizar la actividad de las proteasas por la interacción de antígeno-anticuerpo usando la enzima como inmunógeno vacunal, línea favorecida en el caso de la hemoncosis, ya que se ha demostrado que los inmunógenos enriquecidos con proteasas intestinales inducen protección, disminuyendo un 77% la carga de parásitos en intestino y hasta un 95% el recuento de huevos en heces,¹⁶⁻¹⁷ tal protección es explicada por la producción de anticuerpos con efecto neutralizador de al menos parte de la función enzimática digestiva, ya que es posible correlacionar la disminución de la actividad de proteasas del nematodo con los niveles de protección.^{16,18} El uso de CP en la protección de rumiantes contra la hemoncosis, así como la utilidad de estas enzimas en el inmunodiagnóstico, ha motivado la búsqueda de la producción de estos inmunógenos en grandes cantidades utilizando la tecnología de expresión de genes heterólogos en cultivos celulares de insecto,¹⁸⁻¹⁹ esto es posible utilizando el sistema de baculovirus ya que actualmente existen disponibles comercialmente una serie de herramientas que permiten clonar y expresar diversos genes de proteasas parasitarias con altos rendimientos y conservando la función biológica, así como su antigenicidad.^{15,18}

En este trabajo se abordó la compleja tarea de clonar y expresar una copia de CP de *H. contortus* mediante un Baculovirus recombinante con capacidad de transfectar *in vitro* líneas de cultivos celulares de insecto, permitiendo la obtención de una proteasa recombinante de *H. contortus* aplicable a una variedad de aplicaciones técnicas encaminadas al diagnóstico, control, prevención y tratamiento de la hemoncosis de rumiantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de CP

Se utilizó cADN mediante la reacción de transcriptasa inversa a partir del mARN de 50,000 larvas *L₃* de *H. contortus* siguiendo las instrucciones de los paquetes comerciales RNAqueous-4PCR (Ambion, EU) y Retroscript (Ambion, EU) cuyos protocolos se encuentran disponibles en línea (www.ambion.com). Se aisló el gene CP por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador PCR Sprint Thermal Cycler. (Thermo Scientific, EU) usando los iniciadores específicos 5'-ATGAAATACTGGTGCTT-GC-3'; 5'-GTAATCCAGCTTTATCGAA-3', diseñados a partir de secuencias contenidas en el GENE BANK (No. de acceso M31112). Se colocaron 15 pM de cada iniciador en solución amortiguadora de PCR consistente en 50 mM de KCl (Sigma-Aldrich, EU), 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 (Sigma-Aldrich, EU) y 1.5 mM de MgCl₂ (Sigma-Aldrich, EU) contenido 100 pg de cADN de *H. contortus*, 1 unidad de Taq polimerasa (Promega, EU) y 200 mM de dNTPs (Promega, EU) en un volumen final de 20 μ L bajo las siguientes condiciones de PCR : inicio caliente 4 min, 94°C, seguido por un paso de desnaturación 1 min a 94°C, hibridación a 55°C 1 min y elongación a 72°C 1 min repitiendo los tres pasos previos por 35 ciclos, seguidos

de un último paso de elongación de 15 min. a 72°C. Los productos de PCR se verificaron por medio de electroforesis submarina en agarosa al 1% en amortiguador Tris 50 mM pH 8.3, ácido bórico 10mM y EDTA 5mM (TBE) de acuerdo a metodología previamente reportada.²⁰ El producto de PCR se clonó en plásmido pbluebac 4.5v5 histopo (Invitrogen, EU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante disponibles en línea (www.invitrogen.com).

Generación de Baculovirus recombinante

Se combinaron el vector pbluebac 4.5v5 histopo-CP y el ADN desnudo del Baculovirus en cultivo de células Sf9 en crecimiento exponencial, siguiendo las instrucciones del paquete comercial Bac-N-Blue (Invitrogen, EU) disponibles en línea (www.invitrogen.com). Los virus recombinantes resultantes se titularon y se usaron para transfectar cultivos frescos de células Sf9 (*Figura 1*).

Expresión de CP recombinante en cultivo celular

Se utilizaron concentrados virales con un título mayor a 10⁷ pfu/mL en cultivos confluentes de células Sf9 a 27°C después de 96 horas de infección, las células se colectaron y se obtuvieron extractos celulares por sonicación de acuerdo al procedimiento previamente reportado.^{21,22}

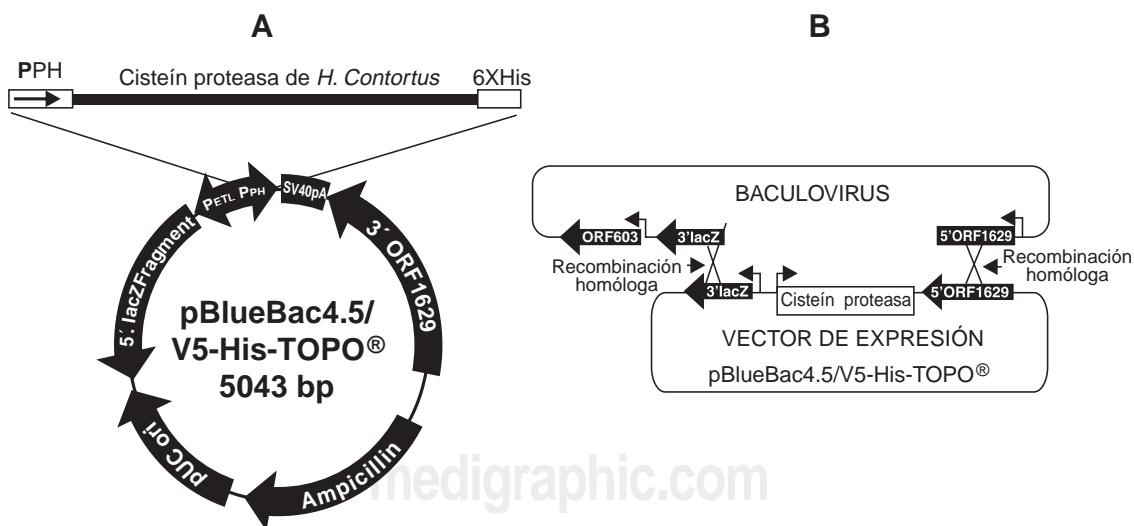


Figura 1. Generación de baculovirus recombinante. **A.** Se utilizó un plásmido o vector de expresión en el que se clonó el gene CP como producto de PCR en fase con el promotor de la polihiedrina (PPH) y también en fase con una etiqueta de histidina (6XHis). El plásmido tiene un origen de replicación en *E. coli* (Puc ori), un gene de resistencia a ampicilina que permite la selección en bacterias (Ampicillin), así como un fragmento del gene β -galactosidasa (5' lac Z Fragment), el vector también contiene secuencias de Baculovirus que junto con el fragmento lac Z permiten la recombinación homóloga con el ADN viral (3' ORF 1629, SV 40 PA.). **B.** Las secuencias de ADN en el Baculovirus son homólogas con aquéllas en el vector de expresión.

Aislamiento de proteasas recombinantes

Los extractos de células transfectadas fueron sometidos a cromatografía de afinidad, de acuerdo al método descrito en el paquete comercial Agarosa-Ni (Invitrogen, EU) cuyo protocolo está disponible en línea (www.invitrogen.com). Las fracciones se aislaron por un gradiente de pH e imidazol y monitoreadas por espectrofotómetro (Unico UV-21, Unico, EU) a 280 nm. Los picos con mayor concentración de proteína se colectaron y sometieron a análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y PAGE-gelatina.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE).

Se utilizó el método descrito previamente,²³ en geles de 100 x 82 x 1.5 mm con 15 pozos de muestras con 75 µg de proteína de extracto por cada pozo. La separación electroforética se condujo a 15 mA durante 90 min. utilizando una cámara para electroforesis Mini-Vertical Unit (Amersham, GE Healthcare EU).

Análisis de actividad enzimática de CP

Se utilizaron geles de SDS-PAGE copolimerizados con gelatina de acuerdo a procedimientos descritos previamente,^{6,7,24,25} brevemente: los geles PAGE se copolimerizaron con gelatina al 0.01% y los extractos separados electroforéticamente se sumergieron en agua-triton X-100 al 2.5% con agitación durante 15 min y 2 lavados posteriores en 50 mM Tris HCl-triton X 100 al 0.2% pH 7.4, 5 mM CaCl₂ y posteriormente se incubaron a 37°C durante 12 horas. Se identificaron las bandas correspondientes a la CP recombinante por la acción enzimática sobre el substrato con tinción de azul de Comassie al 1%.

Sueros ovinos

Durante diez semanas se colectaron semanalmente el suero de 15 ovinos experimentalmente infestados cada uno con mil larvas L₃ de *H. contortus* y el de 10 animales controles sanos durante el mismo período de tiempo, los sueros fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Inmunolectrotransferencia

Se transfirieron extractos de las células Sf9 previamente separados por PAGE, a membranas de PVDF (Immobilon, Millipore, EU) los cuales se procesaron

acorde a procedimiento previamente descrito²⁶ usando un anticuerpo comercial de conejo anti etiqueta de histidina y una mezcla de sueros de los ovinos experimentalmente infestados con *H. contortus*, el revelado cromogénico se hizo mediante segundos anticuerpos anti IgG de conejo y anti IgG de ovino conjugados con fosfatasa alcalina (Santa Cruz, EU), así como substratos enzimáticos cromogénicos Nitro Blue Tetrazolium (NBT) y Bromo Chlоро Indolyl Phosphate (BCIP) (www.resorg.com).²⁶

ELISA

Se utilizó una fracción de CP recombinante purificada por cromatografía de afinidad en una solución de 5 µg/mL en NaHCO₃ 0.1 M pH. 8 para cubrir microplacas de polipropileno maxisorp (www.nunc.de) acorde a los procedimientos descritos previamente^{12,13,27,28} con las siguientes modificaciones: se usaron los sueros ovinos diluidos 1:5,000 en solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (SSAF), un conjugado anti IgG ovino-HRP diluido 1:5,000 en SSAF y la reacción cromogénica se hizo con 1mM de 2,2'-azino-di-(3 ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (ABTS) (www.resorg.com), en solución de citratos fosfatos 70 mM pH 4.2, 0.001% de H₂O₂. Las determinaciones de densidad óptica se hicieron en un espectrofotómetro Unico UV 21 y a partir de éstas se obtuvieron las medias y las medidas de dispersión (desviación estándar) de cinco repeticiones, las cuales fueron graficadas.

RESULTADOS

Se obtuvo un producto PCR de 1,100 pares de bases (pb) que correspondió con la masa esperada en la secuencia del gene CP (*Figura 2A*). La identidad de este gene fue corroborada posteriormente mediante la secuenciación comercial del plásmido en el que se clonó el producto de PCR (datos no mostrados). Los cultivos Sf9 transfectados con el virus recombinante expresaron el marcador LacZ indicativo de la actividad del virus recombinante, confiriendo una coloración azul a las células transfectadas (*Figura 2B*), este marcador al mismo tiempo permitió determinar el título de la solución viral ubicándolo en 10⁷ ufp. Los extractos de las células transfectadas produjeron una proteasa semejante a la identificada en extractos de *H. contortus* verificándose tanto por PAGE (*Figura 3*) como por PAGE-gelatina (*Figura 4 B*), misma que está ausente en las células Sf9 no transfectadas (*Figura 3*); al mismo tiempo se comprobó por PCR la presencia del virus recombinante y de la secuencia

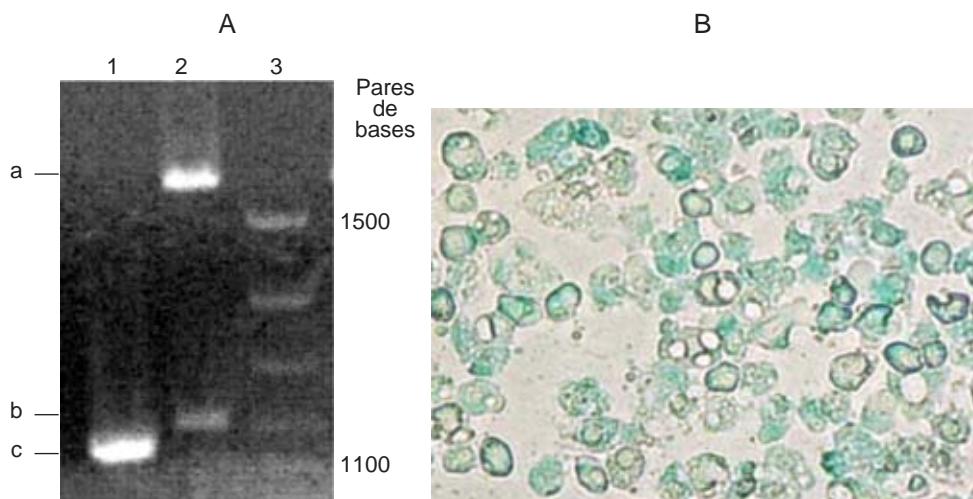


Figura 2. Aislamiento de ADN y transfección de células de insecto. **A.** Producto de PCR del gene de cisteín proteasa de *H. contortus* carril 1, producto de PCR clonado en el vector Carril 2. Digestión del vector de expresión (a) contenido el gene CP clonado (b) comparados con el producto de PCR original (c). **B.** Cultivo de células de insecto Sf9 transfectadas con el virus recombinante. El vector de expresión porta un marcador Lac Z que confiere color azul verdoso a las células de insecto en presencia X-gal.

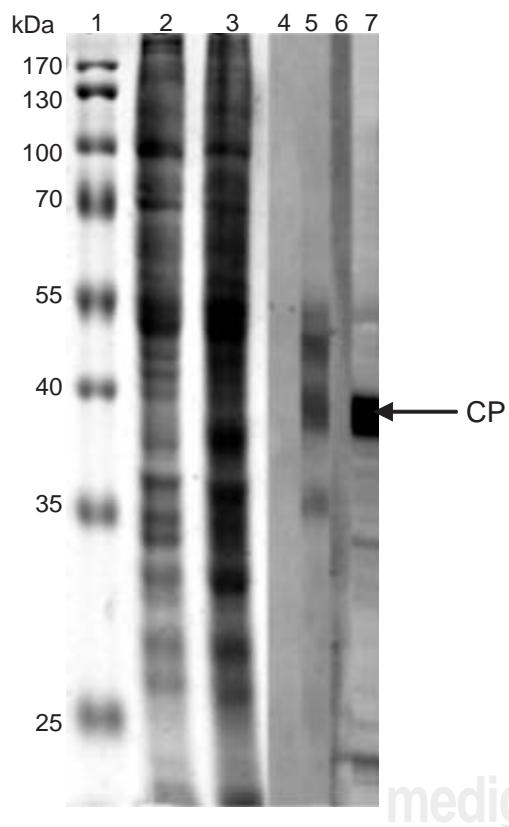


Figura 3. Expresión de cisteín proteasa recombinante en cultivos de células Sf9. Marcadores de peso molecular carril 1, extractos celulares sanos carril 2 y transfectados con virus recombinante carril 3, transferencias en membranas PVDF revelados con anticuerpo control negativo carril 4, anticuerpo anti-etieta de histidina carril 5, mezcla de sueros de ovinos sanos carril 6, mezcla de sueros de ovinos con Hemoncosis carril 7.

CP de *H. contortus* en las células Sf9 productoras de la proteasa recombinante. La CP recombinante también es una proteína híbrida de fusión que expresa un sitio de afinidad a litio de 6 residuos de histidina, misma que se utilizó para purificar la CP recombinante en agarosa-Li (*Figura 4*) lo que permitió obtener la CP en estado puro con la actividad biológica correspondiente a una cisteín proteasa (*Figura 4B*). Los anticuerpos anti 6Xhis y mezcla de sueros de ovinos con hemoncosis identificaron una proteína de 37 kDa en los extractos de células transfectadas con el virus recombinante pero no en las células sanas (*Figura 3*) correspondiendo con la masa teórica esperada. Los sueros de ovinos con hemoncosis fueron diferenciados de aquéllos sanos por medio de ELISA y la estadística básica practicada a estos datos muestran una diferencia mayor a dos desviaciones estándar, también se pudo observar una cinética de anticuerpos anti CP en incremento proporcional al tiempo de desarrollo de la hemoncosis en los ovinos (*Figura 5*). Los análisis de producción de CP recombinante en el cultivo de células de insecto, fueron estimados por densitometría a partir de las imágenes de los PAGE, se estimó un rendimiento de 400 mg de proteína recombinante por litro de medio de cultivo (400 mg L^{-1}).

DISCUSIÓN

La estrategia de aislamiento del ADN del gene CP de *H. contortus*, implicó el diseño de oligonucleótidos que produjeron un ADN en fase con las secuencias virales del vector de expresión (*Figura 1 A*), para lo

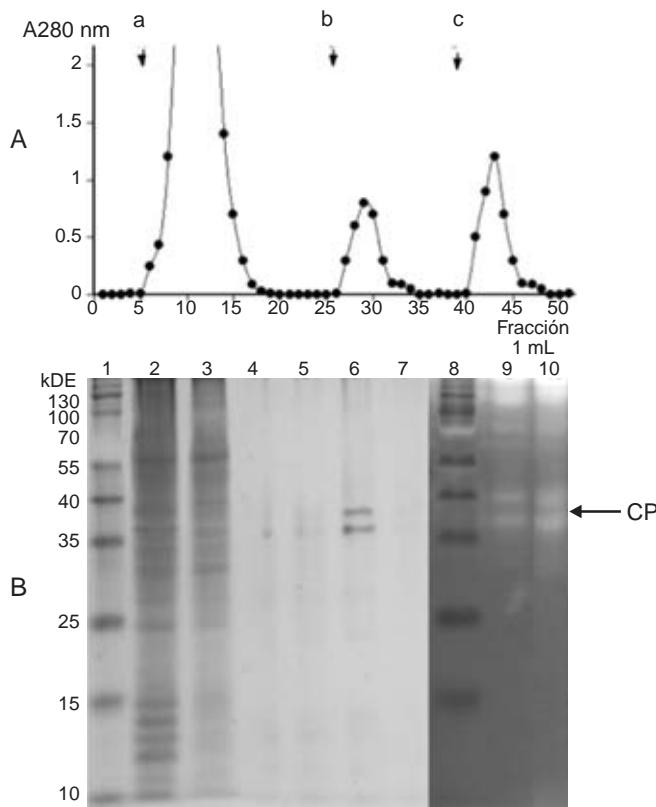


Figura 4. Purificación de CP recombinante. **A.** Cromatografía de afinidad en agarosa-Li, aplicación de extracto de células a, elución con 50 y 250 mM de Imidazol b y c. **B.** PAGE carriles 1-7 y PAGE-gelatina carriles 8-10 de las muestras purificadas por cromatografía de afinidad. Marcadores de peso molecular en carriles 1 y 8, extractos celulares antes y después de su paso por la columna carriles 2 y 3, lavados con 25 y 50 mM de Imidazol carriles 4 y 5, CP pura eluida con 250 mM de imidazol en carril 6, lavado astringente con 500 mM de imidazol en carril 7. Actividad de proteasa en un gel PAGE-gelatina carriles 9 y 10. La flecha señala la posición relativa de la CP recombinante, la actividad enzimática se observa como bandas claras sobre un fondo oscuro.

cual se tuvo mucho cuidado en hacer coincidir el codón de inicio de la secuencia CP y evitar el codón de término, ya que esto permitiría la funcionalidad del promotor viral de la polhiedrina y la traducción de la etiqueta de histidina necesaria para purificar la proteína recombinante;²¹ pese a la complejidad de la tarea fue posible aislar la secuencia a partir de cADN de los nematodos y clonarla en el vector de expresión, así como secuenciar y verificar la correcta construcción del vector. La recombinación homóloga permite conjuntar el vector de expresión con ADN desnudo del Baculovirus y mediante la formación de liposo-

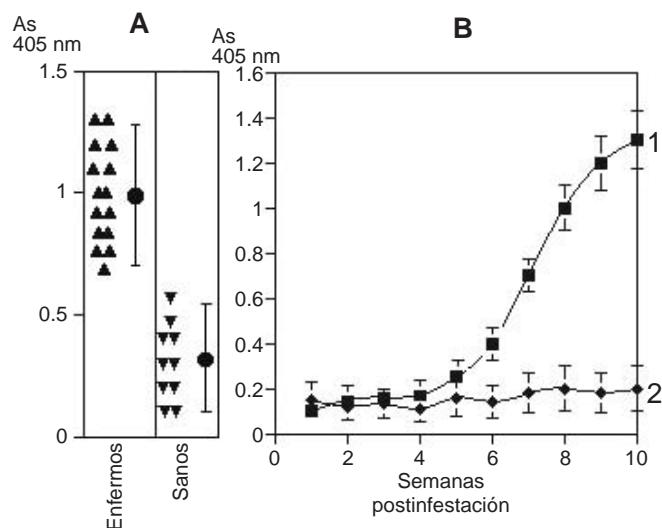


Figura 5. Distribución de anticuerpos anti CP recombinante en ovinos infestados con *H. contortus*. **A.** valores de absorción a 405 nm de los sueros ovinos enfermos con hemoncosis ensayados por ELISA, comparados con los sueros de los ovinos controles sanos representados como triángulos sólidos en ambos grupos, las medias de los valores, así como sus desviaciones estándar se representan como círculos sólidos y líneas. **B.** Cinética de anticuerpos anti-CP recombinante durante la evolución de la hemoncosis experimental 1, comparada con los valores de los ovinos sanos (2), el eje Y representa el tiempo post-infestación en semanas, los cuadros sólidos representan las medias y las desviaciones estándar se indican con líneas.

mas introducir ambos componentes en células Sf9 donde dado que comparten segmentos de ADN idénticos u homólogos recombinan para formar un virus recombinante por homología de secuencias, de donde deriva el nombre de la técnica, el proceso resultó ser eficiente y actualmente nos permite la obtención de otros virus recombinantes con secuencias diferentes a la CP (datos no mostrados). Los cultivos de células de insecto Sf9 tienen un período de duplicación de sólo 18 horas, lo que las hace muy productivas en presencia del virus recombinante, ya que en 48 horas post-transfección se tiene el 100% de las células en arresto viral, lo cual significa que la maquinaria metabólica de todas las células está produciendo CP recombinante con gran eficiencia.²¹ La CP recombinante se co-expresó como proteína de fusión con una etiqueta de seis residuos de histidina que forman un sitio de afinidad al litio, esto facilitó en gran medida la identificación de la CP recombinante ya que por un lado permitió el uso de un anticuerpo políclonal comercial anti-etiqueta de histidina (Hisprobe;

www.scbt.com), útil en la identificación de la proteína recombinante en extractos celulares mediante inmunoelectrotransferencias (*Figura 3*), y por otro lado constituyó la herramienta ideal para purificar la CP recombinante, ya que existen disponibles comercialmente matrices de cromatografía de agarosa-Li que permiten aislar proteínas de fusión conteniendo etiqueta de histidina con gran eficiencia (*Figura 4*). La CP recombinante purificada fue reconocida por los sueros de ovinos con hemoncosis (*Figuras 3 y 5*) lo cual significa que es reconocida de la misma manera que la CP natural de los nematodos, esto demostró su valor diagnóstico, ya que los sueros ovinos con hemoncosis experimental, mostraron valores de absorción claramente distinguibles de los animales sanos con un margen mayor a dos desviaciones estándar, lo que hace accesorio un análisis estadístico más detallado (*Figura 5*), dichos valores mostraron un incremento directamente proporcional al tiempo del desarrollo de la hemoncosis, lo que demuestra el potencial de uso de la CP recombinante obtenida en ensayos inmunodiagnósticos. Probablemente el logro más destacable de este trabajo, ha sido la obtención de una proteasa de *H. contortus* con actividad enzimática (*Figura 4 B*) lo cual no sólo constituye un antígeno diagnóstico e inmunógeno vacunal confiable con amplios antecedentes en la literatura,^{15,16,18,29,30} sino que también permite un detallado análisis de esta proteína tan importante en la fisiología de los nematodos parásitos permitiendo un abastecimiento ilimitado de CP recombinante que permita en ensayo *in vitro* de diferentes inhibidores químicos de la enzima, ya que éstos podrían ser el ingrediente activo de futuros compuestos antihelmínticos.^{2,3,8} El sistema de expresión de genes heterólogos en Baculovirus es sin duda extremadamente complejo y costoso de implementar, sin embargo, una vez superados los obstáculos es sumamente eficiente, productivo y no igualado por ningún otro sistema eucarionte de expresión de genes heterólogos en cuanto a la calidad, medida en función de la actividad enzimática de la proteína y el reconocimiento de la antigenicidad por los sueros de ovinos con hemoncosis, ni por la cantidad de las proteínas recombinantes generadas que en este caso fue extraordinariamente productivo (400 mg L⁻¹).^{21,22} La cisteína proteasa de *H. contortus* generada en este trabajo actualmente se destina para varios protocolos experimentales que evalúan la inmunoprotección e inmunodiagnóstico de la hemoncosis de rumiantes de diferentes especies usando la enzima como antígeno diagnóstico-vacunal.

AGRADECIMIENTO

Al fondo SAGARPA-CONACYT por el financiamiento otorgado, No. de proyecto 2004-C01-61B-4. Al Dr. Pedro Mendoza de Gives, a la Dra. Eugenia López Arellano y al M. en C. Enrique Liébano Hernández por su valiosa ayuda y consejo durante la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Falcone FH, Tetteh KK, Hunt P, Blaxter ML, Loukas A, Maizels RM. The new subfamily of cathepsin-Z-like protease genes includes Tc-cpz-1, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective stage larvae. *Exp Parasitol.* 2000; 94: 201-7.
2. Shompole S, Jasmer DP. Cathepsin-like cystein proteases confer intestinal cystein protease activity in *Haemonchus contortus*. *J Biol Chem.* 2001; 276: 2928-34.
3. Jasmer DP, McGuire TC. Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. *Infect Immun.* 1991; 59: 4412-7.
4. Skuce PJ, Redmond DL, Liddell S, Stewart EM, Newlands GF, Smith WD, et al. Molecular cloning and characterization of gut-derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitology.* 1999; 119: 405-12.
5. Lustigman S, McKerrow JH, Shah K, Lui J, Huima T, Hough M, et al. Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J Biol Chem.* 1996; 271: 30181-9.
6. Brady CP, Dowd AJ, Brindley PJ, Ryan T, Day SR, Dalton JP. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin. *Infect Immun.* 1999; 67: 368-74.
7. Brady CP, Dowd AJ, Tort J, Roche L, Condon B, O'Neill SM, et al. The cathepsin L-like proteinases of liver fluke and blood fluke parasites of the trematode genera *Fasciola* and *Schistosoma*. *Biochem Soc Trans.* 1999; 27: 740-5.
8. Law RH, Smooker PM, Irving JA, Piedrafita D, Ponting R, Kennedy NJ, et al. Cloning and expression of the major secreted cathepsin B-like protein from juvenile *Fasciola hepatica* and analysis of immunogenicity following liver fluke infection. *Infect Immun.* 2003; 71: 6921-32.
9. Yun DH, Chung JY, Chung YB, Bahk YY, Kang SY, Kong Y, et al. Structural and immunological characteristics of a 28-kilodalton cruzipain-like cysteine protease of *Paragonimus westermani* expressed in the definitive host stage. *Clin Diag Lab Immunol.* 2000; 7: 932-9.
10. Hashmi S, Britton C, Liu J, Giuliano DB, Oksov Y, Lustigman S. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3477-86.
11. Poot J, Kooyman FN, Dop PY, Schallig HD, Eysker M, Cornelissen AW. Free in PMC. Use of cloned excretory/secretory low-molecular-weight proteins of *Cooperia oncophora* in a serological assay. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1728-33.
12. De Andrade Lima Coelho R, De Carvalho LB Jr, Perez EP, Araki K, Takeuchi T. Prevalence of toxocariasis in northeastern Brazil based on serology using recombinant *Toxocara canis* antigen. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 103-7.

13. Zhao QP, Moon SU, Lee HW, Na BK, Cho SY, Kong Y, et al. Evaluation of *Clonorchis sinensis* recombinant 7-kilodalton antigen for serodiagnosis of clonorchiasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; 11: 814-7.
14. Schallig HD, Hornok S, Cornelissen JB. Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet Parasitol.* 1995; 57: 329-38.
15. Yatsuda AP, Krijgsveld J, Cornelissen AW, Heck AJ, de Vries E. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune recognition. *J Biol Chem.* 2003; 278: 16941-51.
16. Knox DP, Smith WD. Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. *Vet Parasitol.* 2001; 100: 21-32.
17. Vervelde L, Van Leeuwen MA, Kruidenier M, Kooyman FN, Huntley JF, Van Die I, et al. Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 2002; 24: 189-201.
18. Munn EA. Rational design of nematode vaccines: hidden antigens. *Int J Parasitol.* 1997; 27: 359-66.
19. Knox DP. Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology.* 2000; 120 (Suppl): 43-61.
20. Sambrook, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
21. Summers MD, Smith GE. *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures.* Texas: Texas Agricultural Experimental Station; 1987.
22. Luckow V. *Protein production and processing from Baculovirus expression vectors.* En: Schuller M, editor. *Baculovirus expression systems.* New York: Wiley-Liss; 1995. p. 51-90.
23. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-5.
24. Metayer S, Dacheux F, Dacheux JL, Gatti JL. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol Reprod.* 2002; 66: 1219-29.
25. Manchenko GP. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels.* Part III, Section 3. 2nd ed. London: CRC Press; 2003. p. 412.
26. Towbin T, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 4350-4.
27. Nde PN, Pogonka T, Bradley JE, Titanji VP, Lucius R. Specific serodiagnosis of onchocerciasis with recombinant hybrid proteins. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66: 566-71.
28. Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, et al. Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1082-8.
29. Haslam SM, Coles GC, Munn EA, Smith TS, Smith HF, Morris HR, et al. *Haemonchus contortus* glycoproteins contain N-linked oligosaccharides with novel highly fucosylated core structures. *J Biol Chem.* 1996; 271: 30561-70.
30. Haslam SM, Coles GC, Reason AJ, Morris HR, Dell A. The novel core fucosylation of *Haemonchus contortus* N-glycans is stage specific. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 93: 143-7.