

## Artículos Originales

### Análisis de secuencias de moléculas de *Taenia solium* procesadas post-transcripcionalmente mediante *trans splicing*

### *Sequences analysis of molecules of Taenia solium post-transcriptionally processed by trans-splicing*

Oswgladys Garrido<sup>1,2</sup>, Teresa Gárate<sup>3</sup> & Elizabeth Ferrer<sup>1,4</sup>

#### RESUMEN

La neurocisticercosis es una enfermedad neurológica causada por la presencia de cisticercos de *Taenia solium* en el sistema nervioso central. La clonación de genes del parásito es importante para la identificación y estudio de moléculas claves en la biología del parásito, en diagnóstico, protección y en las relaciones parásito-hospedador. En *T. solium*, ocurre un mecanismo alternativo en el procesamiento de algunos ARNm, denominado *trans-splicing*, en el cual una pequeña molécula de ARN (*Spliced Leader*, SL) es añadida al extremo 5' de una molécula de pre-ARNm, formando diferentes ARNm maduros que contienen un extremo 5' común. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis de las secuencias de algunas moléculas que utilizan este procesamiento, para conocer mejor este mecanismo en *T. solium*. Para ello, se realizó un cribado mediante PCR de genotecas de expresión de cisticerco de *T. solium* utilizando como cebador directo SL y como reverso ZAP-3' UP, oligonucleótido que hibrida con la secuencia del vector. Se obtuvieron diferentes ADN complementarios (ADNc), que fueron clonados en el plásmido pGEM-T-easy, secuenciados y comparados con las bases de datos (GenBank). Un total de 14 moléculas diferentes fueron obtenidas, las cuales muestran similitud principalmente con proteínas de *T. solium*, *Echinococcus* sp. e *Hymenolepis* sp. Se obtuvieron transcritos completos que codifican una variedad de proteínas que forman parte de la biología propia de organismos vivos, tales como; enzimas, transportadores, proteínas estructurales, entre otras. Aunque no fue posible determinar si existen grupos específicos de ADNc (con funciones comunes), escogidos para llevar a cabo esta modificación post-transcripcional, se pudo observar que el proceso de *trans-splicing* ocurre en una gran variedad de ARN que codifican diferentes proteínas de importancia biológica para *T. solium*.

**Palabras clave:** *T. solium*, secuenciación, *Spliced Leader*, *trans splicing*.

#### SUMMARY

*Neurocysticercosis is a neurological disease caused by the presence of Taenia solium cysticerci in the central nervous system. T. solium uses an alternative mechanism for processing some mRNAs, known as trans-splicing, in which a small RNA molecule (Spliced Leader, SL) is added to the 5' end, of one pre-mRNA molecule, leading to the formation of different mature mRNAs that all contain a common 5' end. The aim of this study was to analyze the sequences of some of the molecules that undergo this type of post-transcriptional processing in order to learn more about this mechanism in T. solium. Expression libraries of T. solium cysticerci were screened using PCR with SL as the forward primer and ZAP 3' UP, an oligonucleotide that hybridizes to the vector sequence, as the reverse primer. Different cDNAs were obtained which were cloned in the pGEM-T-easy plasmid, sequenced and then compared with sequences in databases (GenBank). A total of 14 different molecules showing similarities to T. solium, Echinococcus sp. and Hymenolepis sp. proteins were obtained. Complete transcripts encoding a variety of proteins that are part of the biology of living organisms, such as enzymes, transporters and structural proteins, were also identified. Although we could not determine whether specific cDNA groups (with common functions) are selected to carry out this post-transcriptional modification, we were able to observe that the process of trans-splicing occurs in a variety of RNAs that code for several proteins biologically important for T. solium.*

**Key words:** *T. solium*, sequencing, *Spliced Leader*, *trans splicing*.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

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

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

\*Autor de correspondencia: elizabeth.ferrer@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La teniasis/cisticercosis son enfermedades producidas por los parásitos *Taenia solium* y *T. saginata*; en las cuales el hombre es el hospedador definitivo del estadio adulto y el ganado porcino y bovino son los hospedadores intermediarios del estadio larvario, respectivamente. La teniasis ocurre en el hombre por la presencia del parásito adulto en el intestino y la cisticercosis ocurre como consecuencia de la infección por el estadio larvario de los parásitos (cisticerco) en los hospedadores intermediarios y en el hombre cuando de forma accidental ingiere los huevos de *T. solium* en alimentos y aguas contaminadas (Botero & Restrepo, 2012).

Cuando los cisticercos invaden el Sistema Nervioso Central (SNC) se produce la neurocisticercosis (NCC), un problema de salud pública, no solo en países en vías de desarrollo, sino también en Estados Unidos y en algunos países europeos por migraciones de personas proveniente de áreas endémicas (Bruno *et al.*, 2013; Zammarchi *et al.*, 2013; Cantey *et al.*, 2014; Ferrer & Gárate, 2014; Moyano *et al.*, 2014). En Venezuela se han realizado pocos estudios epidemiológicos, por lo que no se conoce la prevalencia de la enfermedad en el territorio nacional. Por trabajos de varios grupos de investigación se sabe que la cisticercosis se encuentra principalmente en zonas rurales de los Estados Carabobo, Yaracuy, Lara, Cojedes, Mérida, Táchira, Zulia, Sucre y Amazonas (Alarcón de Noya & Colmenares, 2002; Ferrer *et al.*, 2002, 2003, 2005; Guzmán *et al.*, 2004; Meza *et al.*, 2005; Villalobos *et al.*, 2007; Cortez *et al.*, 2010).

La cisticercosis es una enfermedad que afecta a 50 millones de personas en el mundo y causa 50.000 muertes anuales. El binomio teniasis/cisticercosis ha sido por mucho tiempo parte de las enfermedades olvidadas, pero se han producido iniciativas importantes para su control y se las considera como enfermedades potencialmente erradicables (Schantz *et al.*, 1993). En este sentido, se ha realizado una propuesta para declarar a la neurocisticercosis como una enfermedad de denuncia obligatoria (Román *et al.*, 2000) y la OMS la añadió a la lista de las principales enfermedades tropicales desatendidas en el 2010 (OMS, 2013).

Para el diagnóstico de la NCC se deben analizar los hallazgos clínicos, inmunológicos y de

neuroimágen, ya que muchas veces la enfermedad puede pasar desapercibida debido a que puede cursar asintomática o con síntomas inespecíficos. Las técnicas de neuroimágenes presentan limitaciones cuando el número de cisticercos es bajo, además, estas técnicas son costosas y de difícil acceso en la mayoría de las áreas donde la cisticercosis es endémica (Del Brutto, 2005). Las pruebas inmunológicas son de gran importancia en el diagnóstico de NCC, pero pueden carecer de adecuada especificidad debido a reactividad cruzada con otras parasitosis (Gottstein *et al.*, 1987). Para mejorar la especificidad de las pruebas inmunológicas, se han utilizado antígenos purificados, los cuales han mostrado buena sensibilidad y especificidad (Tsang *et al.*, 1989; Ng & Ko, 1994), sin embargo, la purificación de éstos requiere gran cantidad de material parasitario, de equipos sofisticados y técnicas laboriosas, por lo que se ha recurrido a la clonación de genes de interés diagnóstico (Ferrer, 2007).

La clonación de genes hace posible la obtención de proteínas recombinantes para su uso en diagnóstico o protección (vacunas) y además para el estudio de moléculas importantes en la biología del parásito. Para la clonación de los genes generalmente se requiere del conocimiento de las secuencias de los mismos, esto ha sido solventado con algunas estrategias de clonación.

Hace años fue descubierto en el extremo 5' de ARNm codificantes de glicoproteínas de superficie de *Trypanosoma brucei* un secuencia de ARN no traducible común, a una la cual se le conoció como *Spliced Leader* (SL) (Sather & Agabian, 1985); esta molécula es insertada en los pre-ARNm mediante un mecanismo conocido como *trans-splicing*, formando diferentes ARNm maduros que contienen un extremo 5' común. Después de este primer reporte, el mecanismo ha sido descrito en una gran diversidad de organismos, entre ellos nemátodos, tremátodos y céstodos (Bitar *et al.*, 2013).

Aunque en el género *Trypanosoma* todos los ARN sufren esta modificación post-transcripcional, en los demás géneros la mayoría de los transcritos no sufren *trans-splicing*, y se desconoce cuáles son las características de las moléculas de ARNm inmaduro que las seleccionan para sufrir esta modificación (Liang *et al.*, 2003).

La caracterización del gen *Spliced Leader* de cisticercos de *T. solium* fue realizada empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores degenerados dirigidos contra secuencias conservadas 5' y 3' del SL de *Echinococcus* y tremátodos y utilizando como molde ADN aislado a partir de cisticerco de *T. solium* (Brehm *et al.*, 2000, 2002).

La estrategia de clonación empleando la secuencia SL conocida y secuencias de un vector ha permitido la clonación de ADN complementarios (ADNc) (secuencias codificantes formadas por transcripción reversa de ARNm del parásito), a partir de genotecas de expresión de cisticercos de *T. solium* (Brehm *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2012).

El propósito del presente trabajo fue secuenciar y caracterizar mediante análisis bioinformáticos 30 ADNc de cisticercos de *T. solium* previamente obtenidos a partir de una genoteca de expresión empleando la PCR utilizando como cebadores el SL y una secuencia del vector, a fin de clonar moléculas que fueron secuenciadas y analizadas, con la finalidad posterior de tratar de determinar su posible utilidad como antígenos, vacunas, blancos terapéuticos o que ayuden a entender mejor la biología del parásito y las relaciones parásito-hospedador. Además, tratar de identificar las características que presentan los ARNm que llevan a cabo el procesamiento de *trans-splicing*. Es un trabajo preliminar donde se demuestra la utilidad del uso de la secuencia del SL en la estrategia de clonación, lo que ha permitido identificar algunas de las moléculas que emplean este mecanismo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Se contaba con 56 clones de ADNc de cisticerco de *T. solium*, previamente obtenidos a partir de una genoteca de expresión empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como cebador directo TSSL-DW2 (5'-GGTCCCTTACCTTGCAATTTTGT-3'), específico de la secuencia SL de *T. solium* diseñado previamente por Brehm *et al.* (2002) y como cebador reverso ZAP-3'UP (5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'), específico del vector Uni-λZAP<sup>®</sup> XR (Fig. 1) e incorporados en el vector de mantenimiento pGEM<sup>®</sup>-T easy (Garrido *et al.*, 2012).

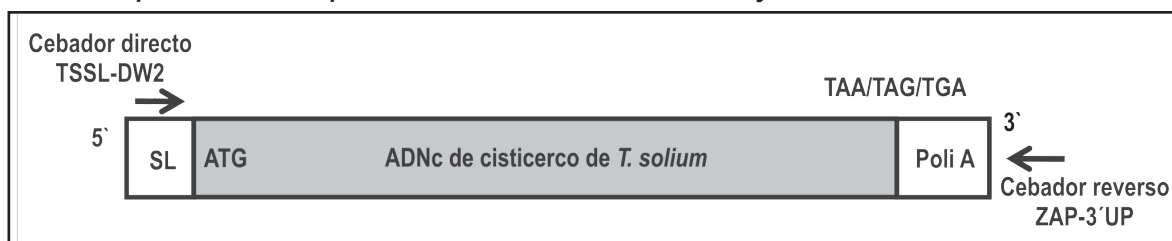
### Extracción y purificación del ADN plasmídico

El ADN plasmídico de cada uno de los clones fueron extraídos de las células de mantenimiento que los albergaba *E. coli* XL1-Blue MRF', mediante la ruptura de las células por lisis alcalina y la purificación de los mismos se llevó a cabo empleando las técnicas de fenol-cloroformo y precipitación salina (Sambrook & Russel, 2001).

### Secuenciación

La secuenciación de los insertos clonados en el vector pGEM<sup>®</sup>-T -easy se realizó mediante el método enzimático (Sanger *et al.*, 1977), a partir de ADN plasmídico extraído y purificado, utilizando los cebadores universales correspondiente al vector SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3') y T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y siguiendo el protocolo de reacción *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (ABI-3130XL, Applied Biosystems). La secuenciación propiamente

**Fig. 1. Estrategia de clonación de los ADNc de cisticerco de *T. solium*. La región en gris representa el marco abierto de lectura, las regiones en blanco representan la región no traducibles 5' y 3'. El par de cebadores para obtener los productos de PCR fueron TSSL-DW2 y ZAP-3' UP.**



dicha se llevó a cabo en la unidad de genómica del Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

*Análisis bioinformático de las secuencias*

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en los bancos de datos; GenBank/ algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), EMBL/ algoritmo FASTA (Pearson & Lipman, 1988) y Swiss-Prot (Boeckmann *et al.*, 2003). Para la búsqueda del marco abierto de lectura se utilizó el programa GENSCAN (Burge & Karlin, 1998). La alineación múltiple de secuencias se llevó a cabo utilizando el programa ClustalW del EMBL (Thompson *et al.*, 1994) y la edición de los mismos con el programa BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999). La traducción a secuencia de aminoácidos se realizó con el programa EditSeq del paquete DNASTar de Lasergene®.

RESULTADOS

*Análisis de las secuencias*

De los 56 clones con los que se contaba, se lograron secuenciar 33, de los cuales, 3 fueron secuencias de β galactosidasa de la región lacZ del

vector pGEM®-T easy, por lo que no fueron tomadas en cuenta para efecto de este estudio. Al resto de las secuencias de ADNc obtenidas (30) se les realizó alineamiento múltiple de secuencias, encontrándose 14 moléculas distintas, ya que algunas moléculas estaban repetidas (varios clones idénticos que formaron grupos de la misma secuencia). El primer grupo formado por 6 clones idénticos, el segundo por 5, el tercero por 3, del 4 al octavo estaban formados por dos clones idénticos, y las siguientes moléculas correspondían a clones únicos (Tabla I). En cuanto al número de nucleótidos de las secuencias clonadas, se obtuvieron moléculas entre 309 y 938 nucleótidos (nt), con marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) entre 201 y 636 nt, que codifican proteínas entre 66 y 211 aminoácidos (aa) (Tabla I).

De los grupos se obtuvieron las secuencias consenso, las cuales se analizaron al igual que las secuencias individuales. Se pudo observar que las secuencias de 9 moléculas se encuentran completas desde la región SL hasta la señal de poliadenilación, en las cuales se pudo determinar la ubicación del marco abierto de lectura y la secuencia aminoacídica deducida. En 4 moléculas las secuencias se encontraban incompletas en algunos de los extremos 5' o 3' e incluso ambos (en dos de ellas faltó la

**Tabla I. Clones aislados de las genotecas de expresión de metacestodos de *T. solium* mediante PCR-Spliced Leader.**

Nº	Código de los clones (secuencias)	Nº de nt	Marco abierto de lectura (nt)	Nº de aa
1	1MF3a, 3MF3a, 4MF3a, 5MF3a, 6MF3c, 36MF3c	529	288	95
2	22MF3c, 41MF3c, 43MF3c, 47MF3c, 9MF3c	523	270	89
3	50MF3c, 53MF3c, 10MF3c	436	201	66
4	5HF1b, 8HF2b	831	210	69
5	15HF2b, 57HF2c	877	636	211
6	2MF2d, 4MF2d	311	*	*
7	29MF1b, 7MF2d	617	342	113
8	2MF3a, 22MF1b	605	330	109
9	30MF1b	728	*	*
10	20MF3c	560	315	104
11	37MF3c	372	219	72
12	23MF1b	356	243	80
13	12MF3c	938	*	*
14	3HF1b	309	*	*

nt= nucleótidos; aa= aminoácidos; \* = secuencia incompleta.

parte media de la secuencia por lo que no se pudo determinar el ORF), en otro caso, aunque la secuencia se encontraba completa desde la región SL hasta la secuencia poliA no se encontró ORF (Tabla I). Sin embargo, se encontró una característica común en todas las secuencias consensos y únicas y es que en todos los casos la secuencia del SL se encuentra inmediatamente antes de un codón ATG (SL-ATG), aunque no siempre este funcionase como ATG de inicio.

Al realizar la comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos (GenBank/EMBL/Swiss-Prot), la mayoría de las secuencias fueron similares a ADNc codificantes de proteínas de parásitos de los géneros *Taenia*, *Echinococcus*,

*Hymenolepis* y *Schistosoma*, un solo clon no presentó similitud alguna con moléculas ya descritas. Se identificaron transcritos completos que codifican proteínas típicas del metabolismo de organismos vivos, tales como; factores de transcripción, proteína activadora de GTPasas, proteínas de unión a ATPasa de membrana, enzimas nucleósidos trifosfato kinasa, proteínas del sistema ubiquitina, y proteínas ribosomales (Tabla II).

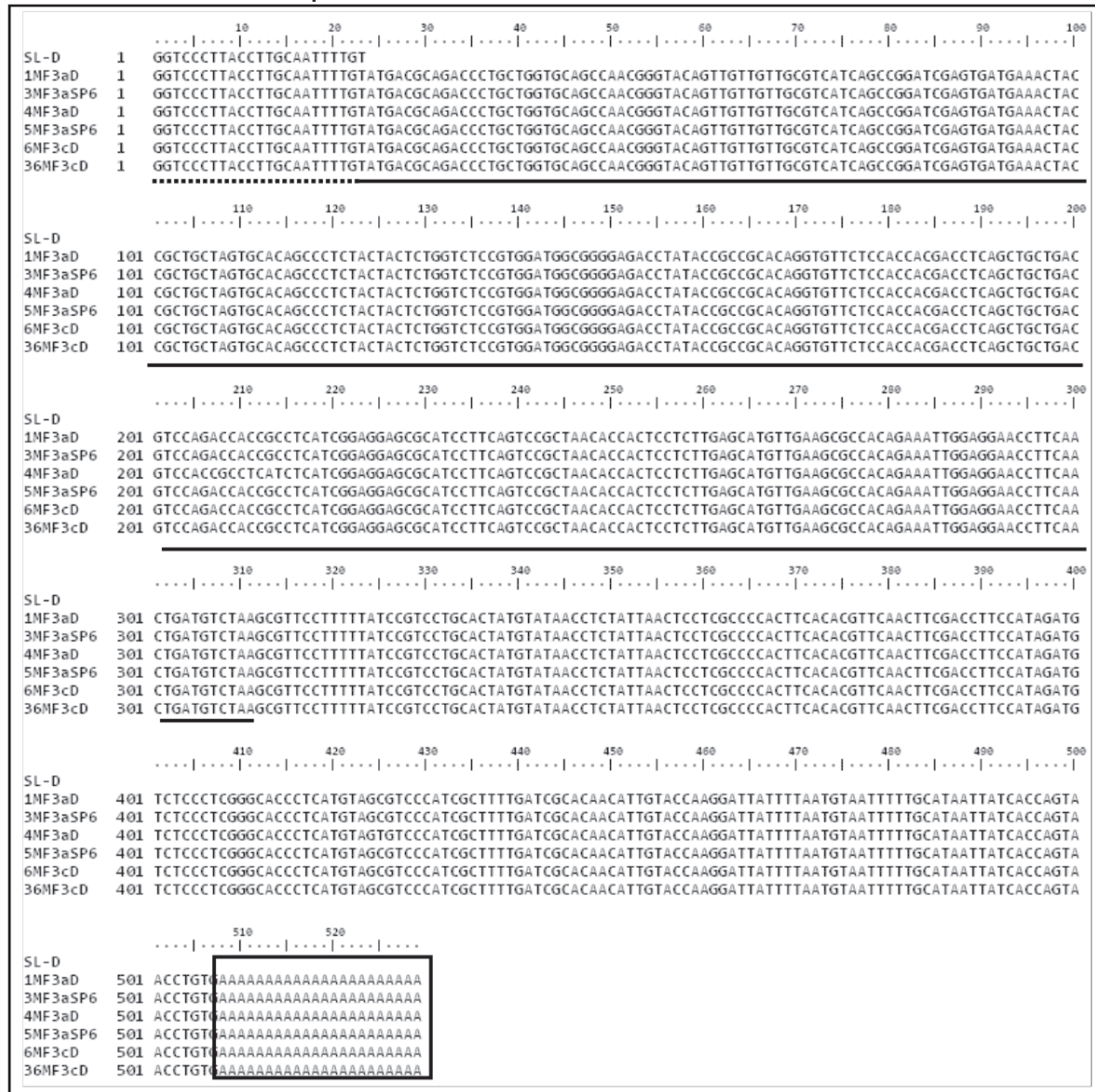
En la Fig. 2, se observa el alineamiento múltiple de secuencias de uno de los grupos más grandes formados (6 clones) que presentó similitud con un factor de transcripción nuclear y está compuesto por 529 nucleótidos (nt), el marco abierto de lectura está conformado por 288 nt y se observa

**Tabla II. Similitud de las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos.**

N°	Proteína similar (N° de acceso) (Porcentaje de similitud)
1	Factor de transcripción nuclear y de <i>E. granulosus</i> (CDS19297.1) (85%) y de <i>H. microstoma</i> (CDS28392.1) (50%).
2	Proteína hipotética, función desconocida de <i>T. solium</i> (CAD21531.1) (100%). Familia de proteína CD034 YQF4, sin caracterizar de <i>E. granulosus</i> (CDS16843.1) (86%).
3	Proteína hipotética asociada a ATPasa de membrana de <i>T. solium</i> (CAD21533.1) (98%). Proteína asociada a GTPasa de membrana (dynamina) de <i>E. multilocularis</i> (CDI96500.1) (92%), Intersectina-1 de <i>E. granulosus</i> (EUB57437.1) (93%).
4	Proteína Rho activadora de GTPasa de <i>E. granulosus</i> (CDS19130.1) (99%), de <i>H. microstoma</i> (CDS27177.1) (90%) y de <i>S. mansoni</i> (CCD82623.1) (55%).
5	Proteína ribosomal l24 de <i>E. granulosus</i> (EUB62073.1) (94%), de <i>H. Microstoma</i> (CDS28262.1) (80%) y de <i>S. mansoni</i> (CCD74992.1) (57%).
6	Proteína de unión a Apolipoproteína AI de <i>E. granulosus</i> (CDS24247.1) (94%). y de <i>E. multilocularis</i> (CAX16804.1) (85%).
7	Hipotética nucleosido trifosfato kinasa de <i>T. solium</i> (CAD21552.1) (97%), de <i>E. multilocularis</i> (CDJ06377.1) (82%), de <i>H. microstoma</i> (CDS29218.1) (67%) y de <i>S. mansoni</i> (CCD59864.1) (57%).
8	Proteína hipotética, función desconocida de <i>T. solium</i> (CAD21546.1) (96%), y de <i>E. granulosus</i> (EUB56521.1) (67%).
9	Hidrolasa (monooxigenasa) de <i>E. multilocularis</i> (CDJ01643.1) (89%), de <i>H. microstoma</i> (CDS31349.1) (75%) y de <i>S. mansoni</i> (CBI71140.1) (49%).
10	Proteína hipotética, función desconocida de <i>T. solium</i> (CAD21553.1) (97%). Subunidad inhibidora de fosfatasa 1 de <i>E. granulosus</i> (EUB60723.1) (70%) y de <i>E. multilocularis</i> (CDJ01990.1) (68%).
11	Citocromo C-oxidasa, subunidad 6B de <i>E. granulosus</i> (EUB56199.1) (97%) y Citocromo C-oxidasa, subunidad Vib de <i>S. japonicum</i> (CAX75822.1) (59%).
12	Proteína biosíntesis ubiquinona de <i>E. granulosus</i> (CDC19343) (90%), de <i>H. microstomas</i> (CDS31943.1) (85%) y de <i>S. haematobium</i> (KGB39497.1) (58%).
13	Proteína tipo matriz de dedo de zinc de <i>E. granulosus</i> (EUB59605.1) (49%), proteína hipotética de <i>E. granulosus</i> (CDS15220.1) (49%).
14	No se encontró similitud

aa= número de aminoácidos; \*= secuencia incompleta.

**Fig. 2. Alineamiento Múltiple de Secuencias de ADNc del grupo #1. Subrayado en línea punteada se encuentra la secuencia TSSL-DW2, subrayado en línea continua se indica el marco abierto de lectura y dentro del cuadro la cola de poliA.**



la presencia en el extremo 5' de la secuencia del cebador SL de 23 nt, y la región de poliadenilación en el extremo 3'.

**DISCUSIÓN**

El mecanismo *Trans-splicing* ocurre en pocos *phyla* de células eucariotas, entre los que se encuentran *euglenozoa*, *nematoda*, *platyhelminthes*, *chordata*, *rotifera*, *dinoflagellata* y *cnidaria* (Bitar

*et al.*, 2013). En el *phylum nematoda* ya ha sido descrito que ocurre este mecanismo principalmente en los géneros *Caenorhabditis*, *Ascaris* (Bektesh & Hirsh, 1988; Nilsen *et al.*, 1989) y *Toxocara* (Gems *et al.*, 1995), mientras que en los *platyhelminthes* se ha descrito principalmente en los géneros *Echinococcus*, *Taenia* (Brehm *et al.*, 2000, 2002) y *Schistosoma* (Rajkovic *et al.*, 1990; Mourão *et al.*, 2013). La presencia del SL en una molécula de ARNm se ha asociado a una mayor estabilidad del mensajero, pues

el SL, lo provee de la caperuza 5' de trimetilguanosina (TMG) (Piecyk *et al.*, 2012); se ha asociado también al procesamiento de grandes ARNm policitrónicos en varios ARNm individuales (Blumenthal, 1995) y a la regulación de la traducción en algunos organismos (Zeng *et al.*, 1990).

Este rasgo ha sido utilizado en diferentes investigaciones con el objetivo de buscar, a partir de ARN por transcripción reversa a ADNc, o de genotecas de ADNc, nuevas moléculas que sean de interés en estos organismos que llevan a cabo este mecanismo post-transcripcional (Gems *et al.*, 1996; Brehm *et al.*, 2002; Fernández & Maizel, 2009, Mourão *et al.*, 2013; Pettitt *et al.*, 2014). En este estudio se obtuvieron un conjunto de secuencias de clones de ADNc codificantes de proteínas de cisticercos de *T. solium* empleando la misma estrategia.

Al comparar las secuencias obtenidas de todos los clones con las depositadas en la base de datos GenBank, se obtuvieron elevados porcentajes de similitud (del 96 al 100%) con proteínas del propio parásito *T. solium* y de parásitos de géneros cercanos, siendo el género *Echinococcus* con el que se obtuvo el mayor porcentaje de similitud, seguido de *Hymenolepis*, ambos céstodos y *Schistosoma* (tremátode), lo cual era de esperarse debido a la cercanía evolutiva de estos géneros con *Taenia*, ya que todos pertenecen al *phylum Platyhelminthes*.

No se observaron patrones comunes en las funciones biológicas de las posibles proteínas codificadas por estos transcritos, las cuales estarían involucradas en procesos celulares tan diferentes como transcripción (1, 13), señalización celular (3 y 4), traducción (5), transporte de lípidos (6), metabolismo de nucleótidos (7), cadena de transporte de electrones (12) y enzimas que actúan en diversos procesos (9, 11). Sin embargo, tal como Brehm *et al.* (2002) demostraron en su trabajo, existe hasta cierto punto patrones comunes entre los transcritos de estos miembros de familias cercanas y es que todas las moléculas encontradas están involucradas en procesos imprescindibles para la supervivencia del parásito (genes *house-keeping*).

Es de resaltar que no se encontraron moléculas posiblemente implicadas en las relaciones inmunológicas parásito-hospedador, tales como posibles antígenos o moléculas involucradas en

mecanismos de evasión de respuesta inmune, quizás los 3 casos de las proteínas hipotéticas de función desconocida (2, 8, 10) y la que no presentó similitud con ninguna otra (14) pudiesen ser proteínas muy específicas de *Taenia* involucradas en estas relaciones.

De los 30 clones secuenciados, 20% (6) codifican un factor de transcripción nuclear y 10% (3) una proteína asociada a ATPasa de membrana, lo que pudiera sugerir que los ARNm que predominantemente llevan a cabo este mecanismo post-transcripcional sean factores de transcripción y proteínas del sistema ATPasa o quizás los genes codificantes de estos transcritos son abundante en el genoma del cisticerco de *T. solium*. De igual manera se estima que solo el 25% de los ARNm de *E. granulosus* llevan a cabo *trans-splicing* (Fernández *et al.*, 2002), dato que pudiera ser similar en *Taenia* debido a la cercanía de ambos géneros.

Todas las secuencias obtenidas presentaron una característica en común y es que luego de la secuencia SL inmediatamente continuaba un codón ATG (SL-ATG), aunque no siempre este funcionase como ATG de inicio, hallazgo común con los resultados obtenidos por Brehm *et al.* (2002), quienes clonaron ADNc de cisticercos de *T. solium* empleando una PCR con cebador directo TSSL-DW2 y obtuvieron 35 clones, los cuales presentaron la secuencia SL inmediatamente antes del ATG, lo que confirma que los ADNc clonados derivan del empalme del SL y no ocurrió una unión inespecífica del cebador durante la fase hibridación en la PCR. Sin embargo, en nuestro caso SL-ATG fue el punto de partida de la traducción del 55,5% (5/9) de los grupos formados, en el resto de los grupos el ATG de inicio se encontraba entre 5 a 59 nt después de la secuencia SL, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Fernández *et al.* (2002) durante un estudio en el que realizaron la amplificación de transcritos de *E. granulosus* por PCR utilizando un cebador SL de *E. multilocularis* y en donde obtuvieron que el 43% de los transcritos tenían como punto de inicio de la traducción el codón SL-ATG, mientras que en *E. granulosus* el 50% de los transcritos obtenidos por Brehm *et al.* (2000) muestran el SL-ATG como codón de inicio. Igualmente, Zheng *et al.* (2008) obtuvieron diferentes tamaños de la secuencia 5' UTR después del SL cuando realizaron transcripción reversa sobre ARN de cisticerco de *T. solium* empleando como cebador la secuencia SL del parásito. Todo esto

demuestra que esta secuencia, SL-ATG, aunque es un rasgo conservado en familias de proteínas de miembros homólogos (Brehm *et al.*, 2000) y un potencial punto de partida de la traducción no en todo los casos la traducción se inicia desde allí.

De los clones secuenciados 2 codifican proteínas de unión a Apolipoproteína A-I, proteína que funciona como cofactor para la enzima Lecitina Colesterol Acil transferasa (LCAT) que se encarga de esterificar el colesterol libre que adquiere la *High-density lipoprotein* (HDL), este hallazgo tiene relación con la biología del parásito ya que los céstodos son incapaces de sintetizar de *novi* lípidos como el colesterol y los ácidos grasos, y deben adquirirlos del hospedador durante la infección ya sea para que formen parte estructural de las membranas o como generadores de energía por  $\beta$ -oxidación peroxisómica, por lo que el sistema de transporte de los lípidos debe estar bien desarrollado (Bernthaler *et al.*, 2009).

Aunque algunas investigaciones han demostrado que todas las moléculas de *Spliced Leader* presentan similitud estructural y funcional (Bitar, 2013) y ya es conocido el mecanismo complejo por el cual se lleva a cabo el *trans-splicing* (Lasda & Blumenthal, 2011), aún se desconoce las características estructurales y funcionales que presentan los ARNm que llevan a cabo este mecanismo. Sin embargo, como se demostró en este estudio los ARNm que contiene SL codifican proteínas de funciones muy variadas y es posible que exista patrones conservados entre las secuencias de los transcritos que llevan a cabo *trans-splicing* de *Taenia solium* y las de los otros parásitos platelmintos cercanos.

Es evidente que se requieren diversos estudios en los diferentes *phyla* para poder comprender mejor estos mecanismos tan importantes para la supervivencia del parásito. Este es un trabajo preliminar donde se demuestra el éxito de la estrategia de clonación empleada y se logró identificar algunas de las moléculas que emplean este mecanismo. Estudios posteriores necesarios en esta línea de investigación estarían orientados a tratar de determinar las posibles funciones de estas moléculas en la biología del parásito y las relaciones parásito-hospedador.

### Conflicto de intereses

Los autores manifiestan que no hubo conflicto de intereses con persona o institución alguna en ninguna de las etapas de ejecución de este trabajo.

### AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Servicio de Genómica del Instituto de Salud Carlos III, Madrid-España, por su colaboración con las reacciones de secuenciación que se realizaron en este estudio.

### REFERENCIAS

- Alarcón de Noya B. & Colmenares C. (2002). Las Limitaciones del diagnóstico de la Cisticercosis humana en Venezuela. *Vitae academia biomédica digital* <http://caibco.ucv.ve/caibco/CAIBCO/Vitae/VitaeOnce/Articulos/MedicinaTropical/ArchivosHTML/introduccion.htm>.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Bektesh S. L. & Hirsh D. I. (1988). *Caenorhabditis elegans* mRNAs acquire a *Spliced Leader* through a *trans-splicing* mechanism. *Nucleic Acids Res.* **1**: 5692.
- Bernthaler P., Epping K., Schmitz G., Deplazes P. & Brehm K. (2009). Molecular characterization of EmABP, an apolipoprotein A-I binding protein secreted by *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Infect. Immun.* **77**: 5564-5571.
- Bitar M., Boroni M., Macedo A., Machado C. & Franco G. (2013). The *Spliced Leader trans-splicing* mechanism in different organisms: molecular details and possible biological roles. *Front. Genet.* **4**: e199, 1-14.
- Blumenthal T. (1995) *Trans-splicing* and polycistronic transcription in *Caenorhabditis elegans*. *Trends. Genet.* **4**: 132-136.
- Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R., Blatter M.C., Estreicher A., Gasteiger E., *et al.* (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its



- supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res.* **31**: 365-370.
- Botero D. & Restrepo M. (2012). *Parasitosis Humana*; 5a edición. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Bogotá, Colombia.
- Brehm K., Jensen K. & Frosch M. (2000). mRNA *trans-splicing* in the human parasitic cestodes *Echinococcus multilocularis*. *J. Boil. Chem.* **275**: 38311-38318.
- Brehm K., Hubert K., Sciutto E., Gárate T. & Frosch M. (2002). Characterization of a *Spliced Leader* gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **122**: 105-110.
- Bruno E., Bartoloni A., Zammarchi L., Strohmeyer M., Bartalesi F., Bustos J. A., et al. (2013). Epilepsy and neurocysticercosis in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**: e2480, 1-11.
- Burge C. & Karlin S. (1998). Finding the genes in genomic DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 346-354.
- Cantey P. T., Coyle C. M., Sorvillo F. J., Wilkins P. P., Starr M. C. & Nash T. E. (2014). Neglected parasitic infections in the United States: cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **90**: 805-809.
- Cortez M. M., Boggio G., Guerra M. L., Rodriguez de Gavidea M., Rojas G., Ferrer E., et al. (2010). Evidence that active transmission of porcine cysticercosis occurs in Venezuela. *Trop. Anim. Health Prod.* **42**: 531-537.
- Del Brutto O. H. (2005). Neurocysticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología.* **20**: 412-418.
- Fernandez C., Gregory W. F., Loke P. & Maizels R. M. (2002). Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* **122**: 171-180.
- Fernandez C. & Maizels R. (2009). Generating EST Libraries: Trans-Spliced cDNAs. *Methods. Mol. Biol.* **533**: 125-151.
- Ferrer E. (2007). Teniasis/cisticercosis: del diagnóstico convencional al diagnóstico molecular. *Salus.* **11**: 57-61.
- Ferrer E. & Gárate T. (2014). Taeniosis and Cysticercosis, pp. 201-227. En: *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Eds. Bruschi F, 1° ed., Senior Editor Biomedicine/Life Sciences Springer Wien, New York, USA.
- Ferrer E., Cortéz M. M., Pérez H., De La Rosa M., De Noya A B., Dávila I. et al. (2002). Serological evidence for recent exposure to *Taenia solium* in Venezuelan Amerindians. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 170-174.
- Ferrer E., Cabrera Z., Rojas G., Lares M., Vera A., Alarcón de Noya B., et al. (2003). Evidence for high seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in individuals from three rural communities in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**: 522-526.
- Ferrer E., Cortéz M. M., Cabrera Z., Rojas G., Dávila I., Alarcón de Noya B., et al. (2005). Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**: 568-576.
- Garrido O., Requena D., Flores C., Garate T. & Ferrer E. (2012). Clonación de genes por *Spliced Leader* a partir de genotecas de expresión de cisticercos de *Taenia solium*. *Salus.* **16**: 13-21.
- Gems D., Ferguson C. J., Robertson B. D., Nieves R., Page A. P., Blaxter M. L., et al. (1995). An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **270**: 18517-18522.
- Gems D. & Maizels R.M. (1996). An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 1665-1670.
- Gottstein B., Zini D. & Schantz P. M. (1987). Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium*

- cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop. Med. Parasitol.* **38**: 299-303.
- Guzmán M., Guillarte D. V. & Urdaneta H. (2004). Seroprevalencia de la teniasis y cisticercosis en escolares de la localidad El Peñón, estado Sucre, Venezuela. *Kasmera.* **32**: 108-116.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Lasda E. & Blumenthal T. (2011). *Trans-splicing*. Wiley interdiscip. *Rev. RNA.* **2**: 417-434.
- Liang X., Haritan A., Uliel S. & Michaeli S. (2003). Trans and cis splicing in Trypanosomatids: mechanism, factors and regulation. *Eukaryot. Cell.* **2**: 830-840
- Meza N. W., Rossi N. E., Galeazzi T. N., Sanchez N. M., Colmenares F. I., Medina O. D., et al. (2005). Cysticercosis in chronic psychiatric inpatients from a venezuelan community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 504-509.
- Mourão M. de M., Bitar M., Lobo F. P., Peconick A. P., Grynberg P., Prosdocimi F., et al. (2013). A directed approach for the identification of transcripts harbouring the *Spliced Leader* sequence and the effect of *trans-splicing* knockdown in *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **108**: 707-717.
- Moyano L. M., Saito M., Montano S. M., Gonzalez G., Olaya S., Ayvar V., et al. (2014). Neurocysticercosis as a cause of epilepsy and seizures in two community-based studies in a cisticercosis-endemic region in Peru. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **8**: e2692, 1-8.
- Ng T. F. & Ko R. C. (1994). Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. *Trans .R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 421-422.
- Nilsen T. W., Shambaugh J., Denker J., Chubb G., Faser C., Putnam L., et al. (1989). Characterization and expression of a *Spliced Leader* RNA in the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides* var suum. *Mol. Cell Biol.* **9**: 3543-3547.
- Organización Mundial de la Salud (2013). *Teniasis/ Cisticercosis*, nota descriptiva N°376 Documento en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/> (consultado: Noviembre, 2014).
- Pearson W. R. & Lipman D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 2444-2448.
- Pettitt J., Philippe L., Sarkar D., Johnston C., Gothe H. J., Massie D., et al. (2014). Operons are a conserved feature of nematode genomes. *Genetics.* **197**: 1201-1211.
- Piecyk K., Davis R. & Jankowska M. (2012). 5-terminal chemical capping of *Spliced Leader* RNAs. *Tetrahedron. Lett.* **53**: 4843-4847.
- Rajkovic A., Davis R. E., Simonsen J. N. & Rottman F. M. (1990). A *Spliced Leader* is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 8879-8883.
- Román G., Sotelo J., Del Brutto O., Flisser A., Dumas M, Wadia N., et al. (2000). A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull. World Health Org.* **78**: 399-406.
- Sambrook J. & Russel D. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3a Edición. Ed. Cold Spring Harbor. New York, U.S.A.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Sather S. & Agabian N. (1985). A5`*Spliced Leader* is added in trans to both  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 5695-5699
- Schantz P., Cruz M., Sarti E. & Pawlowski Z. (1993). Potential eradicability of Taeniasis and cysticercosis. *Bull. World Health Org.* **27**: 397-403.
- Thompson J. D., Higgins D. G. & Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity

- of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Tsang V. C., Brand J. A. & Boyer A. E. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* **159**: 50-59.
- Villalobos R., Cheng R., Diaz O., Estevez J., Beauchamp S., Cava J., et al. (2007). Seroprevalencia y factores de riesgo de cisticercosis en trabajadores de granjas porcinas y criadores de cerdos artesanales del municipio Mara, estado Zulia, Venezuela. *Kasmera.* **35**: 26-37.
- Zammarchi L., Strohmeyer M., Bartalesi F., Bruno E., Muñoz J., Buonfrate D., et al. (2013). Epidemiology and management of cysticercosis and *Taenia solium* Taeniasis in Europe, systematic review 1990-2011. *PLoS. One.* **8**: e69537, 1-12.
- Zeng W., Alarcon C. & Donelson J. (1990). Many transcribed regions of the *Onchocerca volvulus* genome contain the *Spliced Leader* sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2765-2773.
- Zheng Y., Cai X., Luo X., Hu Z. & Jing Z. (2008). Characterization of a new gene (SLC10) with a *Spliced Leader* from *Taenia solium*. *Vet. J.* **175**: 96-101.

Recibido el 23/10/2014  
Aceptado el 04/05/2015