

CLONACION DE cDNAs QUE CODIFICAN PARA ANTIGENOS DEL PARASITO *Toxocara canis*

LILY JIMENEZ Y.¹, ANA LEDESMA O.¹, BORIS LEON R.¹, DR. JUAN VENEGAS H. PhD².

CLONATION OF cDNA THAT CODIFY *Toxocara canis* ANTIGENS.

Background. Toxocariasis is a parasite infectious disease provoked by worm larvae from *Toxocara* species. Different nematodes are involved in the pathogenesis of the disease, being *Toxocara canis* the most frequently found. The disease is known as "Larva migrans syndrome" and it may involve any human organ, and in some cases cause a serious condition. This parasite has a worldwide distribution, affecting mainly children. Since it is very difficult to isolate it (direct diagnosis), serologic techniques have been mostly used to detect the presence of the parasite in the organism, being ELISA the one preferred, using excreted and secreted antigens by the parasite larva. Besides being a troublesome technique, it has been widely documented that it has cross reactions with a wide variety of other parasites. Our main goal is to improve these serologic methods, we proposed to start cloning cDNA that codifies *T. canis* recombinant antigens.

Methods. We started to trace a *T. canis* cDNA gene library, using infected patients' serum.

Results - Conclusions. After a very arduous work we have been able to clone 2 cDNA made of 1500 and 900 pair of bases that would codify a recombinant protein still not described.

Key Words: cDNA gene library, recombinant proteins, *Toxocara canis*.

INTRODUCCION

La toxocariasis es una enfermedad causada por un nemátodo del género *Toxocara*. Ataca principalmente a los niños, ya que ellos son los que están más en contacto con perros y gatos, que son los hospederos definitivos del parásito. El cuadro clínico se conoce como "síndrome de larva migrante visceral", caracterizado en estadios tempranos por una alta eosinofilia, fiebre y hepatomegalia; en estadios más avanzados provoca lesión en el globo ocular, en los pulmones (neumonía e insuficiencia respiratoria), erupciones cutáneas, lesiones en el miocardio y en el sistema nervioso central; estos dos últimos pueden provocar la muerte del contagiado.

En Chile la bibliografía que existe acerca del tema es escasa, sin embargo, en una investigación realizada en 1985, que utilizó el test de ELISA como técnica diagnóstica, se documentó que 8,8% de la población presenta seropositividad para la enfermedad (1). En estudios realizados por De Savigny en Gran Bretaña se encontró un 2,6% de seropositividad (2) para la población de dicho país y en otro estudio realizado en la Isla Reunión en el año 1994, se encontró que el 92,8% de la población presentaba seropositividad para la enfermedad (3).

Esto ilustra someramente que la enfermedad está ampliamente distribuida en el orbe. Al observar estas cifras el lector podría observar que la situación en nuestro país con respecto a la enfermedad no es de tanta gravedad, pero en realidad la cifra mencionada anteriormente respecto a Chile, no representa un buen parámetro debido a que no existen otros estudios con los cuales se pueda comparar la prevalencia de la enfermedad en la población chilena.

Las técnicas diagnósticas más ampliamente usadas en todo el mundo, son la de "ensayo de inmuno-absorción conjugado a enzimas" (ELISA), y la inmuno-electrotransferencia (Wester blot), estos detectan presencia de anticuerpos en la sangre del paciente en contra de antígenos excretados-secretados de *T. Canis* (E-S). En la bibliografía revisada se clasifican estos métodos como los mejores desarrollados actualmente para el diagnóstico de la enfermedad, tanto en Chile (4) como en otros lugares del mundo (5), sin embargo otras investigaciones más recientes han demostrado que dichas técnicas presentan reacción cruzada con otros nemátodos, tales como: *Ascaris summ* (6), *Toxocara cati* y *Toxocara vitolorum* (7, 8). Aún más, con parásitos de otros géneros tales como: *Plasmodium yoeli*, *Entamoeba histolytica*,

¹ Estudiante 3º año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ² Programa Biología celular y molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Trichuris vulpis, *Schistosoma mansoni* (9) y *Anisakis simplex* (10).

La reacción cruzada se produce, porque entre las especies mencionadas existen epitopos comunes los cuales son reconocidos por un mismo paratopos, es decir un mismo anticuerpo de modo tal que al aplicar tanto el test de ELISA como el "Western Blot", para diagnosticar toxocariasis, se pueden obtener falsos positivos. Esto plantea la necesidad de desarrollar un método de alta sensibilidad y alta especificidad para el diagnóstico de la patología.

Dentro del marco presentado, la investigación que se está llevando a cabo en laboratorio, contempla el uso de técnicas de clonamiento del DNA para encontrar un epitopo exclusivo de proteínas recombinantes de *T. canis*, de modo tal de evitar la reacción cruzada al momento de realizar el ensayo serológico. Con este objetivo hemos aislado cuatro clones de cDNA los cuales fueron detectados con un suero de paciente con toxocariasis, por lo tanto el propósito de este trabajo es lograr la purificación de dos de los clones, y el estudio de ellos mediante técnicas de PCR y "Western blot", para posteriormente, evaluar su utilidad como antígenos recombinantes en el diagnóstico serológico de la toxocariasis

Por lo tanto la hipótesis de trabajo es:

"Los antígenos recombinantes de *Toxocara canis* se utilizarán para montar un ensayo serológico (Western blot o ELISA) de mayor especificidad y sensibilidad que la actual técnica de ELISA con antígeno excretado-secretado del parásito".

MATERIAL Y METODO

Entre los años 1997 y 2000, en nuestro laboratorio se han aislado cuatro clones de la genoteca de cDNA Lambda Zap construida a partir de mRNA de larvas de *T. canis*. Esta genoteca fue donada por Cindy Tripp, de Eska Corp., EEUU. Los cDNA fueron insertos en los sitios de restricción EcoRI y Xho I, de tal forma que las proteínas de fusión que sean expresadas por estos vectores tendrán un extremo amino terminal extra de 37 aminoácidos, cuya masa es de 4,5 kDa (11).

Titulación de los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99.

Los clones se encontraban en soluciones no cuantificadas en cuanto tubos plásticos. De dos de estos tubos se tomaron muestras las que fueron denominadas como 01-99 y 02-99. Estas muestras fueron tituladas (12) para posteriormente infectar un cultivo de bacterias *Escherichia coli* cepa XL1-Blue con diluciones seriadas de los fagos. Se incubaron toda la noche a 37° C y luego se cuantificaron las placas de lisis (unidad formadora de placas de lisis (UFL)). Los títulos para las muestras 01-99 y 02-99 fueron 2580 y 2100 fagos/μl, respectivamente.

Purificación de los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99.

La purificación de cada uno de los clones se realizó de acuerdo a protocolos descritos en Sambrook y col., 1989 (12). Esta consistió en infectar bacterias XL1-Blue con un número determinado de fagos de tal forma de obtener entre 300-400 UFL por placa Petri de 100 mm de diámetro. Una vez que se mezclaron las bacterias con los fagos se realizó una incubación de 3 h. a 42° C. Luego se depositó sobre la placa Petri un filtro de nitrocelulosa impregnado con IPTG (isopropil-β-tiogalactosido) y se dejó incubar a 37° C por 4 h., y así también con un segundo filtro por 4 h. Luego los filtros se bloquearon e incubaron con antisuero el que había sido preadsorbido con bacterias XL1-Blue para sacar los anticuerpos de éste que reaccionan contra la bacteria. Después de lavar los filtros se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina, para incubarlos con los reactivos cromogénicos BCIP (5-Br-4-Cl-indolifosfato, Sigma) y NBT (nito blue tetrazolium, Sigma) los que producen una señal violenta en los puntos en los cuales existen proteínas que se unen a anticuerpos del suero. Las señales que coincidían en los filtros son concordantes con una UFL infectada con los fagos, se extrajeron y se conservaron en solución SM.

Estudio mediante la técnica de PCR de los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99.

Con el objetivo de aislar los fagos de genoma de la bacteria, se utilizaron los partidores universales JS1 y JS2 (13), los cuales hibridizan con secuencias aledañas al sitio de inserción EcoRI-Xho del vector Lambda Zap II usado para construir la genoteca. Luego, se realizó la PCR, en las siguientes condiciones de amplificación: Pre-PCR, 5 min. a 97° C y enfriamiento rápido hasta

4° C sin agregar la Taq DNA polimerasa, centrifugación 1 min. 5000xg, más Taq DNA polimerasa; etapa de PCR. 94° C/1 min., 55° C/1 min., 72° C/2 min., 30 ciclos; etapa de post-PCR, 72° C/10 min. y 4° C por tiempo indefinido. Estas temperaturas extremas se utilizan con el objeto de obtener a partir de un DNA bicatenario uno monocatenario, de modo tal que al agregar la Taq polimerasa ésta sea capaz de construir nuevas hebras de DNA bicatenario a partir de las monohebras. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en tampón 0.5X TBE, para ser tipificados.

Análisis mediante “Western blot” de bacterias lisogénicas infectadas con los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99.

Se obtuvieron bacterias lisogénicas infectadas con cada clon.

- ♦ Obtención de muestras de fago Lambda Zap 01-99 y 02-99 con un elevado título.

Para obtener bacterias lisogénicas fue necesario tener muestras de fago con un elevado título. Para ello se siguió un protocolo descrito previamente (12).

- ♦ Obtención de bacterias lisogénicas infectadas con los clones lambda Zap 01-99 y 02-99.

El método se realizó de acuerdo a Sambrook y col., 1989 (12), así del clon 01-99, seis colonias crecieron sólo a 30° C, y por lo tanto serían bacterias lisogénicas, en cambio del clon 02-99 sólo dos bacterias crecieron sólo a 30° C.

- ♦ Análisis mediante “Western blot” de proteínas recombinantes expresadas por bacterias lisogénicas.

Las bacterias lisogénicas se cultivaron en medio LB con Ampicilina y Tetraciclina, por 13 horas en agitación, se repitió el procedimiento hasta lograr un crecimiento exponencial (alrededor de 3 h o $DO_{600} = 0,45$). Los cultivos se incubaron por 15 min. a 44° C y se agregó IPTG a una concentración final de 10 mM. Luego se incubaron por 2 h a 37° C, se centrifugaron 5 min. a 6000xg a temperatura ambiente, y las células sedimentadas se lisaron con el tampón de carga de la electroforesis en condiciones denaturantes para proteínas, y por calentamiento a 100° C por 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 1000xg por 5 min. y el sobrenadante se recuperó para ser analizado por “Western blot”.

- ♦ Técnica de “Western blot” utilizada para el análisis de las proteínas recombinantes de los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99.

La técnica utilizada se realizó de acuerdo a protocolos descritos en la literatura (14) utilizando una electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y transferencia a filtros de nitrocelulosa mediante un sistema semi-seco (Bio-Rad). El bloqueo se realizó con leche descremada y los antisueros fueron pre-adsorbidos previamente con bacterias XL1-Blue. El revelado se realizó incubando con un segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado a fosfatasa alcalina, el cual se incubó con los reactivos cromogénicos NBT (sigma) y BCIP (sigma).

Otro método utilizado para obtener las proteínas E-S fue una técnica no publicada, ésta consistió en lograr la expresión de proteínas en cultivos de bacterias infectadas con fagos sin discriminar en qué ciclo estuviesen (lítico o lisogénico). Éste se hizo mediante la aplicación de IPTG sobre las placas de cultivo de bacterias, luego de 10 a 12 h. se tomó el sobrenadante y se realizó con él un “Western blot”.

La purificación de las muestras 01-99 y 02-99 se realizó tres veces, hasta asegurar la pureza de los clones, para proceder a analizar cada clon con la técnica de PCR utilizado para ello dos partidores, aledaños al sitio e inserción de los cDNA en el vector Lambda Zap II. Estos fueron los partidores JS1 y JS2, ya descritos.

RESULTADOS

Los resultados del PCR de los clones 01-99 y 02-99 se muestran en la figura 1. Se observa que el clon 01-99 tiene un tamaño aproximado de 1500 pd y el clon 02-99 de 900 pd. El obtener una única banda confirma que ambos clones están puros, de lo contrario se habrían observado varios productos de amplificación, situación que no ocurrió.

Se realizaron 2 intentos para obtener bacterias lisogénicas. En el segundo intento se obtuvieron en total 12 colonias del clon 01-99, de ella sólo 6 fueron lisogénicas pues crecieron únicamente a 30° C, en cambio las otras 6 crecieron tanto a 30° C como a 42° C. En el caso del clon 02-99 se obtuvieron en total 9 colonias de las cuales solo 2 fueron lisogénicas. Sin embargo, hay que esperar los resultados del “Western blot” para ver si estas bacterias expresan o no la proteína recombinante.



Figura 1. Análisis de los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99 mediante la técnica de PCR.

- A) Distintas cantidades de cada uno de los clones: carriles (2-5), 0, 1, 5 y 10 μ l de muestra del clon 01-99. Carriles (6-9), 0, 1, 5 y 10 μ l del clon 02-99. Carril 1, marcador "ladder" de 100 en 100 nucleótidos.
- B) Análisis de los mismos clones usando varios controles negativos: Carril 2 y 6 sin DNA del fago; carril 3 y 7, sólo partidor JS1; carril 4 y 8, sólo partidor JS2; carril 5 y 9, con ambos partidores. Carril 5 y 9 con DNA del clon 01-99 y clon 02-99, respectivamente. Carril 1 se utilizó el mismo marcador descrito en parte A. Todas las condiciones experimentales de la técnica de PCR se realizaron tal como fue descrita en Material y Método.

Los resultados obtenidos en el "Western Blot" se muestran en la figura 2a; en ella se observa el análisis de distintas colonias procedentes del clon 01-99 y del clon 02-99, incubadas con el antisero de un paciente con toxocariasis. En la figura 2b, se muestra el estudio de las colonias incubadas con un suero seronegativo para toxocariasis (control). En ambos filtros se observan múltiples bandas pero en el primer filtro se destacan dos, una de aproximadamente 57 kDa y otra de 17 kDa. En el segundo filtro hay una banda de 55 kDa, más débil que la banda de 57 kDa del primero.

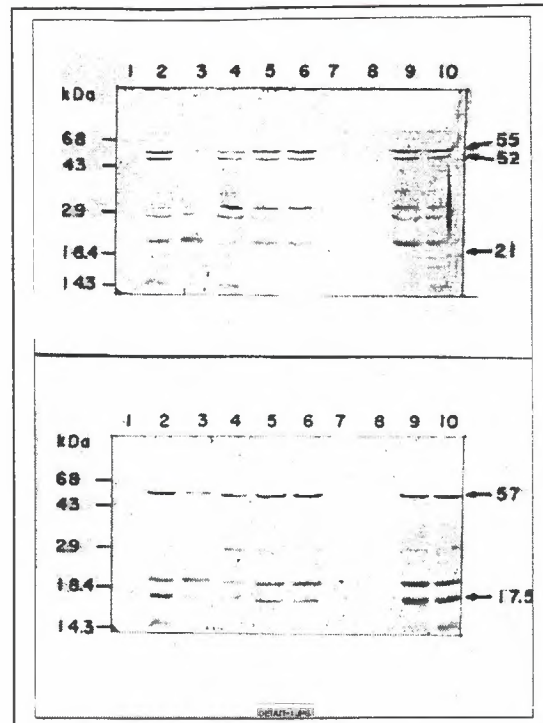


Figura 2. Análisis bacterias lisogénicas infectadas con los clones Lambda Zap 01-99 y 02-99 mediante "Western blot".

- A) "Western blot" incubado con un suero de paciente con toxocariasis. Los carriles 2-10 corresponden a distintas colonias que fueron aisladas durante la obtención de las bacterias lisogénicas y fueron denominadas como: 1.4, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10, 2.4, 2.5 y 2.6. Del carril 2-7 corresponden al clon 01-99, del carril 8-10 corresponden al clon 02-99. Las colonias 1.8 y 2.6 crecieron tanto a 30° C como a 42° C. Esto indica que no son lisogénicas. Todos los procedimientos se realizaron tal como fue descrito en Material y Método.
- B) El mismo análisis anterior pero utilizando un suero de un paciente seronegativo para toxocariasis de acuerdo al ensayo de ELISA convencional con antígenos excretados-secretados por larvas del parásito.

También se observó que en ambos filtros no aparecieron bandas en los carriles 6,7 y 8. Esto ocurrió por el crecimiento demasiado lento de esas colonias, de tal forma que durante las tres horas del cultivo exponencial la proliferación bacteriana fue mínima.

En el filtro tratado con suero de paciente contagiado con toxocariasis observamos, además, que las 2 bandas mencionadas presentan igual migración electroforética, en cada uno de los 9 carriles.

En cuanto a la técnica no documentada, usando bacterias no-lisogénicas infectadas por los fagos, no se puede detectar ninguna banda mediante la técnica de "Western blot". Esto se debió, probablemente a que la cantidad de proteína recombinante codificada por los fagos es demasiado pequeña para ser detectada mediante "Western blot".

DISCUSION

Primero definimos que las bacterias eran resistentes a Tetraciclina, lo cual nos da seguridad que la cepa con que estamos trabajando, es XL1-Blue, y también observamos resistencia a Ampicilina, lo que indica que las bacterias XL1-Blue efectivamente están infectadas con los fagos, pues ésta es la única forma en que dichas bacterias sean resistentes a Ampicilina, ya que es el fago Lambda Zap el que porta el gen que confiere resistencia a dicha droga.

Es importante destacar la baja eficiencia de infección de los fagos para obtener bacterias lisogénicas, pues un primer intento se utilizaron hasta 200 000 fagos por 1×10^6 de bacterias, y no se obtuvo ninguna colonia resistente a Tetraciclina y Ampicilina.

En el segundo intento fue necesario aumentar el título de los stocks de tal forma que se pudieran usar hasta 200×10^6 fagos para infectar la misma cantidad de bacterias señaladas. Aún así, con un clon, solo se obtuvieron 12 colonias (clon 01-99) y con el otro 9. Probablemente la baja eficiencia para obtener bacterias lisogénicas se debe a la baja frecuencia en que los fagos se insertan en el DNA genómico de la bacteria hospedera. Es muy probable que este fenómeno dependa tanto del tipo de fago como de la bacteria involucrada, por lo tanto existan bacterias más adecuadas para aumentar la eficiencia de inserción de dichos fagos.

Los resultados con "Western blot" nos indican que tanto el clon 01-99 como el 02-99 estarían expresando la misma proteína recombinante, la de 57 o la de 17 kDa, que al restarles el segmento de 4.5 kDa codificado por el gen LacZ' (11), sería de 51.5 y 11.5 kDa. Esto es muy interesante considerando que el estudio de PCR indicó que el clon 01-99 y el clon 02-99 correspondían a insertos de aproximadamente 1500 y 900 pb. Para que ambos insertos expresaran proteínas de fusión del mismo tamaño, tendría que ocurrir que ambos tuvieran un codón de termino (Stop) a la misma distancia del

extremo 5', donde se comienza a traducir la proteína de fusión. Esto indicaría, especialmente para el inserto 01-99 que quedaría un largo segmento 3' río abajo del codón de termino sin traducir. Esto no sería extraño, ya que acerca de algunos parásitos se ha descrito en la literatura, la existencia de mRNA con largos segmentos no codificantes, tan 5' como 3' respecto al segmento traducido (11).

Con los resultados que tenemos hasta el momento no podemos distinguir cual de las dos proteínas, la de 51.5 o la de 11.5 kDa, es efectivamente la recombinante. Para discriminar entre las dos se podrían realizar controles negativos usando bacterias lisogénicas con fagos sin insertos o realizando experimentos de inducción con IPTG, aquella proteína que es selectivamente inducida por IPTG debería ser proteína recombinante.

Otro análisis, podría ser, utilizando anticuerpos en contra del extremo amino terminal de la proteína de fusión (segmento N-terminal de la β -galactosidasa) mediante técnicas de "Western blot", la banda que reaccionara con dicho anticuerpo sería la proteína de fusión recombinante.

Cabe destacar que las proteínas recombinantes informadas en la literatura no coinciden con las masa moleculares descritas en nuestro trabajo, lo que podría sugerir que estamos en presencia de una nueva proteína recombinante (15-18). Para definir esto intentamos secuenciar los insertos que portan dichos clones mediante técnicas de PCR, pero en la purificación de los productos de PCR de cada clon no obtuvimos una cantidad suficiente para secuenciarlas. Una vez establecido claramente cuál es la proteína recombinante se podría realizar estudios mediante "Western blot" con distintos sueros de pacientes, afectados por toxocariasis como por otras parasitosis, esto nos permitiría saber con relativa facilidad si nuestra proteína recombinante puede ser útil para el diagnóstico serológico de la toxocariasis. De este modo el siguiente paso sería purificar dicha proteína recombinante y probarla en ensayos de ELISA.

RESUMEN

Antecedentes. La toxocariasis es una enfermedad parasitaria provocada por larvas del gusano del género *Toxocara*. En la patología de esta enfermedad pueden estar involucradas distintas especies de nemátodos, siendo el gusano del

perro, *Toxocara canis*, uno de los principales. La patología causada por estos gusanos se conoce como el "síndrome de la larva migrante visceral", el cual puede afectar a distintos órganos del ser humano llegando a provocar, en algunos casos, complicaciones graves. Esta infección es de distribución mundial y afecta principalmente a la edad pediátrica. La detección del parásito por método directo es compleja, por lo que se usa serología, siendo, actualmente la técnica de elección un ELISA realizado con antígenos excretados-secretados por las larvas de parásito. Además de ser una técnica muy engorrosa está ampliamente documentado que presenta reacciones cruzadas con una gran variedad de otros parásitos. Con el objetivo de mejorar estas técnicas serológicas, en este trabajo nos propusimos comenzar el clonamiento de cDNAs que codifiquen para antígenos recombinantes para *T. canis*.

Métodos. Para lograr esto, se procedió a rastrear una genoteca de cDNAs de *T. canis* con sueros de pacientes infectados por el parásito.

Resultados-Conclusiones. Después de un gran trabajo se logró clonar dos cDNAs, cuyos insertos son aproximadamente de 1500 y 900 pb., que codifican para una proteína recombinante todavía no caracterizada.

Palabras claves: Genoteca de cDNA, proteína recombinante, toxocariasis, Western blot.

BIBLIOGRAFÍA

1. HERSKOVIC P, ASTORGA B. Toxocariasis humana en Chile. Rev Med Chile 1985; 113: 18-21.
2. DE SAVIGNY D, VOLLER A, WOODRUFF Y. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. Journal of Clinical Pathology 1979; 32: 284-288.
3. MAGNAVAL J, MICHAULT A, CALON N, CHARLET J. Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 531-533.
4. HERSKOVIC P, LEIVA S, ASTORGA B, MARZOUKA E, CEPEDA V. Toxocariasis humana en Chile. Evaluación del diagnóstico serológico mediante ELISA. Parasitol al Día 1986; 10: 76-80.
5. JACQUIER P, GOTTSTEIN B, STINGELIN Y, ECKERT J. Immunodiagnosis of toxocariasis in humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. J Clin Microbiology 1991; 29: 1831-1835.
6. NUNES C, TUNDISI R, GARCÍA J, HEINEMANN M, OGASSAWARA S, RICHTZENHAIN J. Cross-reaction between *Toxocara Canis* and *Ascaris summa* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. Rev Inst Med Trop S. Paulo 1997; 39: 253-256.
7. KENNEDY M, MAIZELS R, MEGHJI M, YOUNG L, QURESHI F, SMITH H. Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol 1987; 9: 407-420.
8. PAGE A, RICHARDS T, LEWIS J, OMAR H, MAIZELS R. Comparison of isolates and species of *Toxocara* and *Toxocaris* by biosynthetic labelling of somatic and ES protein from infective larvae. Parasitology 1991; 3: 451-464.
9. KONOSHI E. Monoclonal antibodies multireactive with parasite antigens produced by hybridomas generated from naive mice. Parasitology 1997; 115: 387-393.
10. IGLESIAS R, LEIRO J, UBEIRA F, SANTAMARIA M, NAVARRETE I, SAN MARTIN M. Antigens cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. Parasitol Res 1996; 82: 378-381.
11. FREYER B, ESCHENBACHER K, MEHLHORN H, RUEGER W. Isolation and characterization of cDNA clones encoding a 32-kDa dense-granule antigen of *Sarcocystis muris* (apicomplexa). Parasitol Res 1998; 84: 583-589.
12. SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T. Molecular cloning a laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
13. LAGERKVIST A, STEWART J, LAGERSTROM-FERMER M, LANDEGREN U. Manifold sequencing: Efficient processing of large sets of sequencing reactions. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 2245-2249.
14. HARLOW E, LANE D. Antibodies: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
15. GEMS D, FERGUSON C, ROBERTSON B, NIEVES R, PAGE A, BLAXTER M, ET AL. An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to

- phosphatidylethanolamine-binding proteins. J Biol Chem 1995; 270: 18517-18522.
16. LOUKAS A, SELZER P, MAIZAELS R. Characterization of Tc-cp1-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. Mol Biochem Parasitol 1998; 92: 275-289.
 17. YAHIRO S, CAIN G, BUTLER J. Identification characterization and expression of a *Toxocara canis* nematode polyprotein allergen TBA-1. Parasite Immunol 1998; 20: 351-357.
 18. LOUKAS A, HUNT P, MAIZELS R. Cloning and expression of an aquaporin-like gene from a parasitic nematode. Mol Biochem Parasitol 1999; 99: 287-293.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Isabel Noemí, Directora del Laboratorio de Parasitología del Hospital Calvo Mackenna, por su valiosa colaboración al proveernos de sueros de pacientes con toxocariasis.

Correspondencia:

Lily Jiménez Y.

shascona@hotmail.com