



HAL
open science

Caracterizacion de las proteinas de los estadios postoncosferales de *Taenia solium* reconocidas por anticuerpos de pacientes con neurocisticercosis

Nancy Chile Andrade

► **To cite this version:**

Nancy Chile Andrade. Caracterizacion de las proteinas de los estadios postoncosferales de *Taenia solium* reconocidas por anticuerpos de pacientes con neurocisticercosis. Human health and pathology. Université de Limoges; Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2022. Español. NNT: 2022LIMO0042 . tel-03842881

HAL Id: tel-03842881

<https://theses.hal.science/tel-03842881>

Submitted on 7 Nov 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“CARACTERIZACIÓN DE LAS
PROTEÍNAS DE LOS ESTADIOS
POSTONCOSFERALES DE *Taenia solium*
RECONOCIDAS POR ANTICUERPOS DE
PACIENTES CON
NEUROCYSTICERCOSIS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA VIDA

NANCY CHILE ANDRADE

LIMA - PERÚ

2022

ASESOR-PERÚ

Manuela Verástegui Pimentel, PhD

ASESOR-FRANCIA

Farid Boumédiène, PhD

JURADO DE TESIS

DR. XXXXXXXXXXXXX

PRESIDENTE

MG. XXXXXXXXXXXXXXX

VOCAL

DRA. XXXXXXXXXXXXXXXXXXX

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

A mis padres que son mi motivación para seguir adelante y lograr mis metas.

A mi esposo, por su amor y apoyo incondicional.

A Naru por ser como es.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la luz que guía mi camino.

A mi asesora de tesis por parte de Perú, Dra. Manuela Verástegui Pimentel, por su apoyo en la realización y culminación de esta investigación en el laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas; a mis co -asesores Dr. Robert Gilman y Dr. Héctor H. García por sus comentarios y revisiones del manuscrito.

A mi asesor de tesis por parte de Francia, Dr. Farid Boumédiène por su asesoramiento y orientación que fueron indispensable para realizar este trabajo; a mi co - asesor Dr. Jaime Luna por sus valiosos comentarios y revisiones del manuscrito.

A la Dra. Rosa Victoria Pando Robles por permitirme realizar el entrenamiento en la técnica de electroforesis bidimensional en su laboratorio (CISEI-INSP)

A mis compañeros del laboratorio: Edson Bernal, Jessy Condori, Lizbeth Fustamante, Carolina Manyari, Belsy Valeriano y Judith Cauna por su valiosa contribución en cada momento de esta investigación. Y a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido en esta investigación.

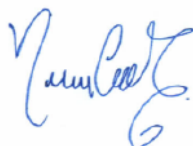
Al laboratorio de Patho-antígenos, y al laboratorio de Bioinformática y Biología molecular del LID-UPCH por brindarme facilidades para el uso de equipos.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Beca de la escuela doctoral Franco Peruana en ciencias de la vida, otorgado por el
FONDECYT-CONCYTEC ahora PROCIENCIA (Contrato de subvención N°
250-2015 -FONDECYT-CONCYTEC).

Improving Diagnostic and Management Tools for Neurocysticercosis (Peru-JHU
TMRC Program)-U19AI129909.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	19	NOVIEMBRE	2021
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	CHILE ANDRADE NANCY		
PROGRAMA DE POSGRADO	DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VIDA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2016		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS ESTADIOS POSTONCOSFERALES DE <i>Taenia solium</i> RECONOCIDAS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON NEUROCYSTICERCOSIS”		
MODALIDAD (marcar)	Tesis	<input checked="" type="checkbox"/>	Sustentación temática
Declaración del Autor			
La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	982035091		
E-mail	nancy.chile.a@upch.pe		



Firma del egresado
DNI 41910464

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ANTECEDENTES	3
1.2.	MARCO TEÓRICO	6
1.2.1.	<i>Taenia solium</i>	6
1.2.1.1.	Ciclo de vida	6
1.2.1.2.	Forma pre - adulta de <i>T. solium</i>	9
1.2.1.3.	Forma adulta de <i>T. solium</i>	9
1.2.1.4.	Huevo de <i>T. solium</i>	10
1.2.1.5.	Oncósfera de <i>T. solium</i>	11
1.2.1.6.	Estadios o formas postoncosferales de <i>T. solium</i>	13
1.2.1.7.	Cisticerco de <i>T. solium</i>	16
1.2.2.	EPIDEMIOLOGÍA	17
1.2.3.	NEUROCISTICERCOSIS	19
1.2.3.1.	Neurocisticercosis parenquimatosa	19
1.2.3.2.	Neurocisticercosis extraparenquimal	20
1.2.4.	RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN NEUROCISTICERCOSIS.....	22
1.2.5.	DIAGNOSTICO DE LA NEUROCISTICERCOSIS	23
1.2.5.1.	Neuroimagen	23
1.2.5.2.	Inmunodiagnóstico.....	23
1.2.6.	MODELO ANIMAL DE NEUROCISTICERCOSIS	25
1.2.7.	PROTEINAS DE <i>T. solium</i>	26
1.2.7.1.	Proteínas de oncosferas	26
1.2.7.2.	Proteínas de postoncosfera	27
1.2.7.3.	Proteínas de cisticerco	27
1.2.8.	TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	28
1.2.8.1.	SDS-PAGE y LC-MS/MS.....	29
1.2.8.2.	Electroforesis bidimensional y MALDI-TOF/TOF.....	34
1.2.9.	OBTENCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN <i>Escherichia coli</i> ..	38
1.2.10.	PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJOS	43
1.3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46

1.4.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	49
II.	OBJETIVOS	50
III.	METODOLOGIA.....	51
3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	51
3.2.	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS	52
3.2.1.	PRIMER ESTUDIO: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL WESTERN BLOT PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO DE LA NCC	52
3.2.1.1.	Estrategia de búsqueda de artículos.....	52
3.2.1.2.	Selección de artículos.....	52
3.2.1.3.	Definiciones	53
3.2.1.4.	Extracción de datos y evaluación de la calidad	54
3.2.1.5.	Análisis estadístico.....	55
3.2.2.	SEGUNDO ESTUDIO: CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTADIOS POSTONCOSFERALES RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON NCC.	57
3.2.2.1.	Detección de bandas antigénicas de los estadios postoncosferales de <i>T. solium</i> reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC	58
3.2.2.2.	Evaluación de la utilidad de las proteínas de los estadios postoncosferales en el diagnóstico inmunológico de la NCC	67
3.2.2.3.	Modelo animal de NCC para evaluar la respuesta inmune humoral contra las proteínas de postoncosferas	69
3.2.2.4.	Identificación de proteínas de los estadios postoncosferales reconocidos por anticuerpos de pacientes con NCC	72
3.2.2.5.	Localización de las proteínas de los estadios postoncosferales reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC.....	77
3.2.2.6.	Análisis de datos	92
3.2.3.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	93
IV.	RESULTADOS	94
4.1.	PRIMER ESTUDIO: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL WESTERN BLOT PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO DE LA NCC.....	94
4.1.1.	Búsqueda de artículos.....	94
4.1.2.	Cobertura geográfica.....	94
4.1.3.	Características de los artículos	96
4.1.4.	Metaanálisis.....	96
4.2.	SEGUNDO ESTUDIO: CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS ESTADIOS POSTONCOSFERALES RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON NCC	101
4.2.1.	Detección de proteínas de los estadios postoncosferales reconocidos por anticuerpos de pacientes con NCC	101

4.2.1.1.	Proteínas antigénicas de estadios postoncosferales	101
4.2.1.2.	Proteínas de postoncosfera reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC.....	105
4.2.2.	Evaluación de la utilidad de las proteínas de los estadios postoncosferales en el diagnóstico inmunológico de la NCC	107
4.2.3.	Respuesta inmune humoral contra las proteínas de postoncosferas	109
4.2.4.	Identificación de proteínas de postoncosfera reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC, por espectrometría de masas	111
4.2.4.1.	Proteínas identificadas por SDS-PAGE y LC-MS/MS	111
4.2.4.2.	Proteínas identificadas por electroforesis en 2D y MALDI-TOF/TOF	115
4.2.4.3.	Análisis de las proteínas identificadas.....	117
4.2.5.	Localización de las proteínas de postoncosfera identificadas por espectrometría de masas	125
4.2.5.1.	Obtención de proteínas recombinantes de postoncosferas	125
4.2.5.2.	Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes de postoncosferas de <i>T. solium</i>	131
4.2.5.3.	Localización de proteínas de postoncosferas de <i>T. solium</i>	132
V.	DISCUSIÓN.....	137
5.1.	Primer estudio: Metaanálisis	137
5.2.	Segundo estudio: Caracterización de las proteínas de los estadios postoncosferales	141
5.2.1.	Proteínas antigénicas de estadios postoncosferales reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC	141
5.2.2.	Utilidad de las proteínas antigénicas de postoncosferas para el diagnóstico de la NCC	142
5.2.3.	Respuesta humoral contra las proteínas de postoncosferas	143
5.2.4.	Identificación de las proteínas de postoncosfera por espectrometría de masas	144
5.2.5.	Localización de proteínas identificadas por espectrometría de masas en postoncosferas de <i>T. solium</i>	148
5.2.6.	Limitaciones del estudio.....	150
VI.	CONCLUSIONES	151
VII.	RECOMENDACIONES.....	153
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154
IX.	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Ciclo de vida <i>T. solium</i>	7
Figura I-2. Diagrama de las diferentes etapas de desarrollo de <i>T. solium</i>	8
Figura I-3. Forma adulta de <i>T. solium</i>	10
Figura I-4. Huevos y oncosferas de <i>T. solium</i>	10
Figura I-5. Proceso de activación de la oncosfera de <i>T. solium</i>	11
Figura I-6. Oncósfera de <i>T. solium</i> adherido a monocapa de células CHO-K1.....	12
Figura I-7. Formas postoncosferales de <i>T. solium</i> obtenidas <i>in vitro</i>	15
Figura I-8. Oncosfera comparada con postoncosferas de <i>T. solium</i>	15
Figura I-9. Cisticerco de <i>T. solium</i>	16
Figura I-10. Mapa mostrando áreas donde la cisticercosis es endémica.	17
Figura I-11. Mapa del Perú mostrando las principales áreas endémicas para teniasis/cisticercosis por <i>T. solium</i>	18
Figura I-12. Neurocisticercosis parenquimatosa.	20
Figura I-13. Neurocisticercosis extraparenquimal.....	21
Figura I-14. Inmunoelctrotransferencia-blot con glicoproteínas purificadas con Lentil Lectin. ...	24
Figura I-15. Diagrama esquemático de la electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30
Figura I-16. Pasos para el LC-MS/MS.	31
Figura I-17. Esquema general de un sistema de espectrometría de masa en tándem.	33
Figura I-18. Pasos de la electroforesis bidimensional.	35
Figura I-19. Pasos para el MALDI-TOF/TOF.	36
Figura I-20. Principio del MALDI-TOF y del MALDI-TOF/TOF.	37
Figura I-21. Componentes de un vector de expresión.	40
Figura III-1. Mapa del vector pGEX-6P-1.	82
Figura IV-1. Diagrama de flujo de la búsqueda de artículos.	95
Figura IV-2. Forest plot que muestra la sensibilidad y especificidad del western blot en cada estudio.....	97
Figura IV-3. Curva HSROC para el western blot en el diagnóstico de la NCC.	98
Figura IV-4. Morfología de los estadios postoncosferales de <i>T. solium</i>	102
Figura IV-5. Proteínas antigénicas de postoncosferas de <i>T. solium</i> observadas por Western blot.	103
Figura IV-6. Comparación de las proteínas de oncosfera, postoncosfera y cisticerco de <i>T. solium</i> por Western blot.	104
Figura IV-7. Western blot de proteínas de <i>T. solium</i> incubadas con un pool de sueros de personas con y sin NCC.....	106
Figura IV-8. Comparación del patrón de bandas observados en el Western blot usando proteínas solubles totales de estadios postoncosferales de 30 días [PO-WB] y glicoproteínas purificadas de cisticercos [LLGP-EITB].	107
Figura IV-9. Infección de ratas con oncosferas activadas de <i>T. solium</i>	110
Figura IV-10. Proteínas identificadas en la banda de 46 y 48 kDa mediante LC-MS/MS y análisis proteómico usando la base de datos de <i>T. solium</i>	112
Figura IV-11. Proteínas identificadas en la banda de 46 y 48 kDa mediante LC-MS/MS y análisis proteómico usando la base de datos de <i>E. granulosus</i>	114
Figura IV-12. Electroforesis en 2D y western blot de las proteínas de postoncosferas de <i>T. solium</i>	115
Figura IV-13. Alineamiento de anexinas de <i>T. solium</i> con la secuencia TsM_000515500 que codifica para una proteína similar a anexina.....	122

Figura IV-14. Modelo tridimensional de la secuencia TsM_000511100 de <i>T. solium</i> similar a anexina.....	123
Figura IV-15. Clonación en células DH5 α de la secuencia que codifica para el precursor de proteína de unión a calcio (CBP).....	127
Figura IV-16. SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de las células BI21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1+CBP.....	128
Figura IV-17. SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de células BI21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1 + CBP.....	129
Figura IV-18. SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de células BI21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1 + ANB2.....	130
Figura IV-19. SDS PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de células BI21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1 + NEF.....	130
Figura IV-20. Western blot de proteínas recombinantes incubadas con suero de conejo anti-postoncosfera.....	131
Figura IV-21. Localización de enolasa en postoncosfera de <i>T. solium</i>	134
Figura IV-22. Localización del precursor de proteína de unión a calcio en postoncosfera de <i>T. solium</i>	135
Figura IV-23. Localización de anexina B2 en postoncosferas y cisticerco de <i>T. solium</i>	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III-1. Reactivos y concentraciones usada para la PCR convencional.....	79
Tabla III-2. Condiciones para la PCR convencional.....	79
Tabla III-3. Reactivos y concentraciones usada para la PCR con la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad.....	81
Tabla III-4. Condiciones para la PCR con la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad.....	81
Tabla III-5. Concentración de reactivos usados para la digestión del vector y los productos de amplificación de la PCR.....	83
Tabla III-6. Concentración de reactivos usados para la ligación del vector con el producto de amplificación de la PCR.....	84
Tabla III-7. Reactivos y concentraciones usadas para la PCR colonia.....	85
Tabla III-8. Reactivos y condiciones para la digestión del plásmido conteniendo el producto de amplificación de la PCR.....	86
Tabla IV-1. Sensibilidad y especificidad del western blot de acuerdo con los resultados de neuroimagen.....	100
Tabla IV-2. Resultados del Western blot de proteínas de postoncosferas de <i>T. solium</i> incubadas con sueros individuales de personas con y sin NCC.....	108
Tabla IV-3. Proteínas identificadas en las proteínas solubles totales de postoncosferas de 30 días de cultivo mediante MALDI-TOF/TOF y análisis proteómico. Esta lista incluye la mejor coincidencia para cada muestra.....	116
Tabla IV-4. Proteínas identificadas en la banda de 46-48 kDa de las proteínas de postoncosfera.....	118
Tabla IV-5. Proteínas identificadas en la banda de 46 - 48 kDa de las proteínas de postoncosferas, usando la base de datos de <i>E. granulosus</i>	121
Tabla IV-6. Información de proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF.....	124
Tabla IV-7. Cebadores y condiciones de ciclamiento para el RT- PCR. Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción están subrayados.....	126

RESUMEN

Taenia solium es un cestodo que causa neurocisticercosis (NCC), una enfermedad que afecta el sistema nervioso central, y es considerado como la principal causa de epilepsia adquirida en el mundo. El estadio de postoncosfera es una etapa temprana del cisticerco de *T. solium* (causante de la NCC); y el estudio de sus proteínas es importante para identificar antígenos para el inmunodiagnóstico, así como, para comprender la relación huésped-parásito. En esta investigación se realizó 2 estudios, el primero consistió en una revisión sistemática y metaanálisis de la sensibilidad y especificidad del western blot para el inmunodiagnóstico de la NCC; mientras que el segundo estudio consistió en la caracterización de las proteínas de postoncosfera reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC. En el primer estudio, el metaanálisis estimó que el western blot tiene una sensibilidad del 78.9% [IC95%:71.8% - 83.6%] y una especificidad del 97.6% [IC95%;95.7%-98.7%] para el diagnóstico de la NCC, sin embargo, estos datos varían dependiendo del tipo de antígeno, el tipo de estudio, el número y estado del cisticerco en el cerebro. En el segundo estudio se detectó bandas proteicas (23, 46 y 48 kDa) de postoncosfera que son reconocidas por el 98% y 100% de pacientes con NCC parenquimatosa y subaracnoidea respectivamente; por espectrometría de masas se identificó las proteínas presentes en las bandas de postoncosfera que podrían ser evaluadas como candidatos para el inmunodiagnóstico y en el estudio de la modulación de la respuesta inmune y establecimiento de la postoncosfera en el hospedero.

PALABRAS CLAVES: ESPECTROMETRÍA DE MASAS, NEUROCISTICERCOSIS, POSTONCOSFERA, PROTEÍNAS WESTERN BLOT.

ABSTRACT

Taenia solium is a cestode that causes neurocysticercosis (NCC), a disease that affects the central nervous system, and is considered the leading cause of acquired epilepsy in the world. Postoncospherical forms are early *T. solium* cysticercus stages (which causes NCC) and the study of its proteins is important to identify targets for the immunodiagnosis and to understand the host-parasite relationship. In this research 2 studies were carried out, the first consisted of a systematic review and meta-analysis of the sensitivity and specificity of the western blot for the immunodiagnosis of NCC; while the second study consisted of the characterization of the postoncosphere proteins recognized by antibodies of NCC patients. In the first study, the meta-analysis estimated that western blot has a sensitivity of 78.9% [95%CI: 71.8%-83.6%] and a specificity of 97.6% [95% CI: 95.7%-98.7%] for the immunodiagnosis of NCC, however, these data vary depending on the antigen type, the study type, and the number and state of the cysticercus in the brain. In the second study, antigenic protein bands (23, 46 and 48 kDa) of postoncosphere were recognized by 98% and 100% of patients with parenchymal and subarachnoid NCC respectively; mass spectrometry identified the proteins present in the postoncosphere bands that could be evaluated as candidates for diagnosis and for the study of the modulation of the immune response and establishment of the postoncosphere in the host.

KEYWORDS:

MASS SPECTROMETRY, NEUROCYSTICERCOSIS, POSTONCOSPHERE, PROTEINS, WESTERN BLOT.

I. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) causado por el estadio larval denominado cisticerco de *Taenia solium*, ocasionando síntomas neurológicos como convulsiones y epilepsia (1,2). En zonas endémicas aproximadamente el 30% de los casos de epilepsia es causado por este parásito, pudiendo incrementar hasta en un 70 % en comunidades de alto riesgo (3). La OPS/OMS reporta que en América Latina y el Caribe se estima que 14.9 millones de personas padecen NCC (4).

El diagnóstico de la NCC se basa en los estudios de neuroimagen que aportan información de la localización, número y estado del parásito; y es apoyado por pruebas serológicas, datos clínicos y epidemiológicos (5,6). El western blot o electroinmunotransferencia-blot (EITB) que usa glicoproteínas purificadas con Lentil Lectin (LLGP), es una de las pruebas serológicas consideradas como el estándar de oro para el diagnóstico inmunológico de la NCC debido a su alta sensibilidad y especificidad (7), sin embargo, se ha reportado que esta sensibilidad disminuye cuando los pacientes presentan un cisticerco o cisticercos calcificados en el cerebro (8).

El LLGP-EITB es utilizada en la actualidad para el inmunodiagnóstico de la NCC; y se han publicado varios estudios epidemiológicos en las cuales usaron esta prueba junto con la neuroimagen obteniendo resultados de sensibilidad bajos o que varían en cada estudio, poniendo en duda su validez para el inmunodiagnóstico de la NCC, por tal motivo, en la primera parte de esta investigación se ha propuesto

realizar una revisión sistemática y metaanálisis de la sensibilidad y especificidad del western blot para el inmunodiagnóstico de la NCC.

Así mismo, existe la necesidad de encontrar nuevos antígenos que puedan mejorar la capacidad de diagnóstico del western blot, siendo los antígenos de la postoncosfera de *T. solium* una alternativa para ser evaluados como candidatos para el inmunodiagnóstico de NCC, debido a que se ha reportado que sus proteínas son reconocidas por un pool de sueros de pacientes con NCC (9), además al ser reconocidos por la respuesta inmune del hospedero podrían cumplir un rol en la interacción hospedero-parásito.

Motivo por el cual, el objetivo de la segunda parte de esta investigación fue la caracterización de las proteínas de los estadios postoncosferales de *T. solium* que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC, con la finalidad de identificar antígenos candidatos para el diagnóstico inmunológico de la NCC y antígenos que participen en la interacción hospedero- parásito.

1.1. ANTECEDENTES

Las proteínas de *T. solium* que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC han sido estudiados en los diferentes estadios de desarrollo del parásito.

En oncosferas:

En el estadio de oncosfera, Molinari y colaboradores en 1993, demostraron que las oncosferas de *T. solium* son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC, estas proteínas tienen pesos moleculares de 22, 64 kDa y 70 kDa. Los resultados de este grupo sugieren que el suero de pacientes con cisticercosis puede destruir a las oncosferas *in vitro* y puede ser usado para identificar antígenos protectores (10).

Otro estudio realizado en el 2003 por Verastegui y colaboradores mostraron que las proteínas (de 22.5 kDa y 31.3 kDa) de las oncosferas activadas de *T. solium* son reconocidas por el 20 % de personas con NCC activa, sugiriendo que estos anticuerpos contra oncosfera persisten en estos pacientes probablemente porque se infectaron con una mayor carga parasitaria, o porque es una infección reciente (11).

En el 2009, un estudio realizado por Mayta y colaboradores reportó que el 85 % de personas con cisticercosis y 35% de personas sin cisticercosis reconocen proteínas recombinantes (42 kDa y Tso31) de oncosferas de *T. solium* concluyendo que estas proteínas tienen un bajo rendimiento para el diagnóstico de la cisticercosis humana (12).

En cisticerco:

En el estadio de cisticerco, en 1985 Grogl y colaboradores mostraron 37 polipéptidos de cisticerco de *T. solium* que son reconocidas por anticuerpos de personas con NCC, seis de estos polipéptidos son reconocidos tanto por anticuerpos de personas con y sin NCC; siendo 31 antígenos específicos del cisticerco de los cuales el 65% son glicoproteínas. Según los autores, los polipéptidos de 64 kDa, 53 kDa y 32-30 kDa son probablemente los mejores antígenos para desarrollar una prueba inmunológica para el diagnóstico serológico de la NCC (13).

Tsang y colaboradores en 1989, purificaron 7 glicoproteínas (13 kDa, 14 kDa, 18 kDa, 21 kDa, 24 kDa, 42-39 kDa y 50 kDa) que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC (Meningeal, parenquimal e intraventricular); estas glicoproteínas fueron evaluadas en el western blot como antígenos para el diagnóstico de la cisticercosis, obteniendo 98% de sensibilidad y 100% de especificidad, a esta prueba se le denomina como LLGP-EITB (7).

Wilson y colaboradores en 1991, evaluaron la prueba de LLGP-EITB en pacientes con NCC, sus resultados mostraron que el 94% de pacientes que tienen 2 o más lesiones (cisticercos) en el cerebro fueron positivos a esta prueba, mientras que, solo el 28% de pacientes que tienen 1 lesión (cisticerco) en el cerebro fueron positivos a esta prueba. Así mismo, encontraron que pacientes que tienen cisticercos calcificados en el cerebro son menos probables de ser positivos a esta prueba (8).

El LLGP-EITB es utilizada hasta la actualidad para el inmunodiagnóstico de la NCC, y ha sido ampliamente utilizado también para estudios epidemiológicos, demostrando una sensibilidad que varía en cada estudio; por ejemplo en un estudio

realizado en Colombia por Palacio y colaboradores en 1998, la sensibilidad del LLGP-EITB fue de 51% (14). Así mismo, en un estudio realizado en Perú por Moyano y colaboradores en el 2016, la sensibilidad del LLGP-EITB fue del 60% (15). Otros estudios optaron por utilizar el EITB con glicoproteínas obtenidas en sus propios laboratorios, por ejemplo, en un estudio realizado en India por Rajshekhar y colaboradores en el 2006, la sensibilidad del LLGP-EITB fue del 26% (16). Incluso se han reportado estudios en donde utilizan kits comerciales basados en el LLGP, como por ejemplo el estudio de Goodman y colaboradores realizado en 1999 en Ecuador, donde obtienen una sensibilidad del LLGP-EITB que varía de 41% a 86% dependiendo de las lesiones que presenta la persona con NCC. Debido a la baja sensibilidad del LLGP-EITB observada en varios estudios, otras investigaciones se han enfocado en la identificación de otros antígenos de cisticerco, o la obtención de proteínas recombinantes para evaluarlos como candidatos para mejorar la sensibilidad el EITB para el inmunodiagnóstico de la NCC.

En postoncosferas:

Las formas postoncosferales en etapas tempranas de desarrollo *in vitro* expresan proteínas antigénicas que están presentes en oncosferas, mientras que las postoncosferas en etapas más avanzadas de desarrollo, expresan proteínas presentes en cisticerco (17). Así mismo, se ha reportado que las postoncosferas pueden ser reconocidas por un pool de suero de pacientes con NCC (9), pero aún no se ha evaluado su rol en el inmunodiagnóstico, ni se ha realizado la identificación y caracterización de estas proteínas.

1.2. MARCO TEÓRICO

1.2.1. *Taenia solium*

Es un cestodo zoonótico cuya forma adulta se desarrolla en el intestino del hombre (hospedero definitivo), y cuya forma larvaria (cisticerco) se desarrolla en el tejido del cerdo o accidentalmente en el hombre (hospederos intermediarios) (18).

1.2.1.1. Ciclo de vida

T. solium causa dos enfermedades: teniasis en el ser humano y cisticercosis en el cerdo. El ser humano también puede desarrollar la cisticercosis. El ciclo empieza cuando el cerdo ingiere huevos de *T. solium*; cada huevo libera una forma larvaria con 6 ganchos, denominado embrión hexacanto u oncósfera, la cual atraviesa la barrera intestinal y se dirige hacia el tejido muscular en donde se establece y desarrolla hasta cisticerco, causando la cisticercosis en el cerdo. El ciclo continúa cuando una persona ingiere la carne de cerdo con cisticercos; el cisticerco llega y se adhiere al intestino a través de su escólex y desarrolla hasta la forma adulta, ocasionando la teniasis. Una persona con teniasis elimina huevos y proglótides grávidas en las heces contaminando el agua, suelo o la vegetación, pudiendo ser ingerido por un cerdo para continuar así con el ciclo de vida del parásito (figura I-1).

El ser humano puede actuar como hospedero intermediario accidental al ingerir huevos de *T. solium*, los huevos liberan a la oncósfera que penetra la pared

intestinal y migra por la circulación hacia diferentes tejidos, de preferencia al tejido subcutáneo, ojo, o cerebro en donde se establece y desarrolla hasta cisticerco, causando cisticercosis en la persona. Cuando el cisticerco desarrolla en el SNC, la enfermedad se denomina NCC (19).

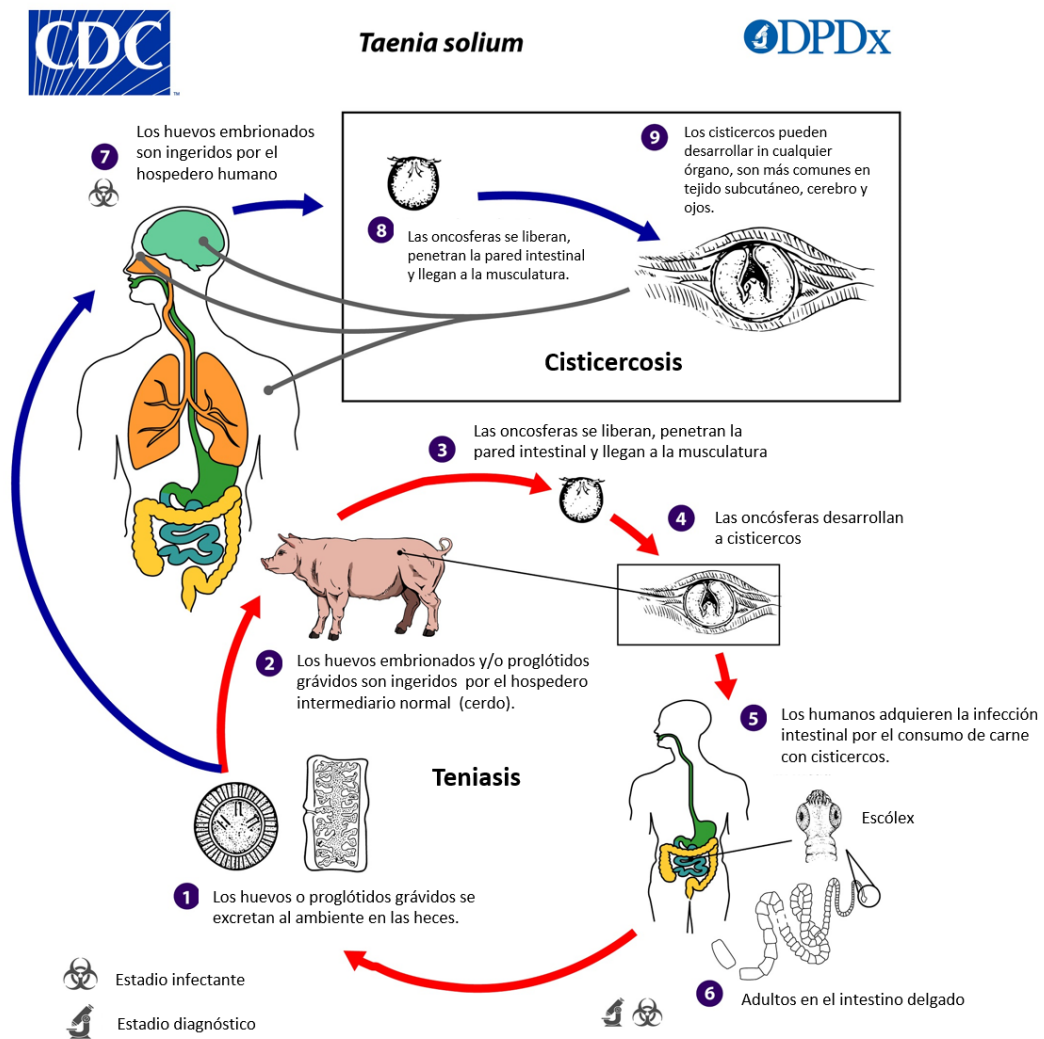


Figura I-1. Ciclo de vida *T. solium*.

[Fuente: Imagen tomada de CDC-DPDx, contenido de la imagen traducido al español].

En el ciclo de vida de *T. solium* se distinguen 6 etapas de desarrollo del parásito: la forma pre adulta, la forma adulta, el huevo, la oncósfera, las formas postoncosferales y el cisticerco (Figura I-2) (18).

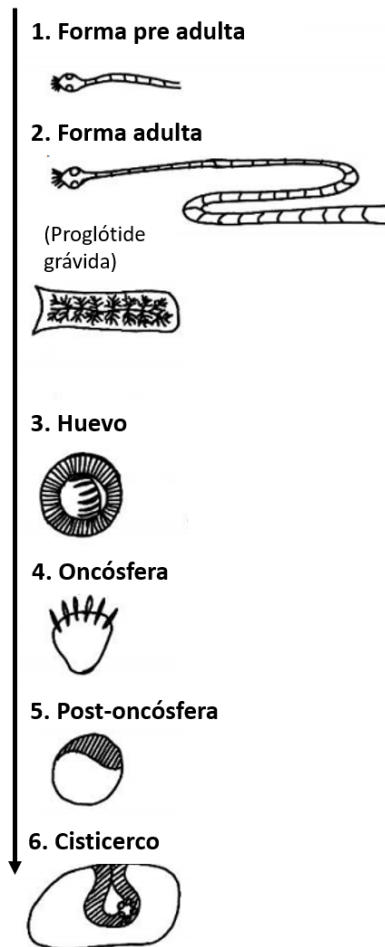


Figura I-2. Diagrama de las diferentes etapas de desarrollo de *T. solium*.

[Fuente: Imagen modificada, tomada de Singh, 2002 (18)].

1.2.1.2. Forma pre - adulta de *T. solium*

Es la etapa en donde el cisticerco ha tenido una invasión exitosa en el hospedero definitivo y empieza a madurar a la forma adulta en el intestino. La ingestión de carne de cerdo con cisticerco es un prerrequisito para esta etapa, el cisticerco llega al intestino del hospedero definitivo, evagina, se adhiere al intestino a través de los ganchos del escólex y pierde su capa vesiculosa. El gusano adulto empieza a crecer a partir del escólex del cisticerco y toma aproximadamente 2 meses para desarrollar en un gusano adulto maduro capaz de producir huevos.

1.2.1.3. Forma adulta de *T. solium*

Es una etapa reproductiva capaz de producir miles de huevos. La forma adulta tiene un escólex, un cuello alargado y un estróbilo (figura I-3). El escólex tiene cuatro ventosas y un rostelo armado con 22-23 ganchos; el estróbilo está formado por 700-1000 proglótides. Las proglótides cercanas al cuello son denominadas proglótides inmaduras que se caracterizan por ser pequeñas, cortas e inmaduramente reproductivas; luego le siguen las proglótides maduras que son rectangulares y tienen órganos sexuales desarrollados; en la parte final del estróbilo están las proglótides grávidas, que son alargadas y cada una tiene un útero cargado de huevos. Cada proglótide contiene aproximadamente 40 000 huevos, y la mayoría son liberados a través de un poro ubicado en la proglótide. La forma adulta puede liberar diariamente hasta 300 000 huevos. Las proglótides grávidas también se pueden desprender del estróbilo en grupos o individualmente y pasan a través de las heces en menos de una semana (18).

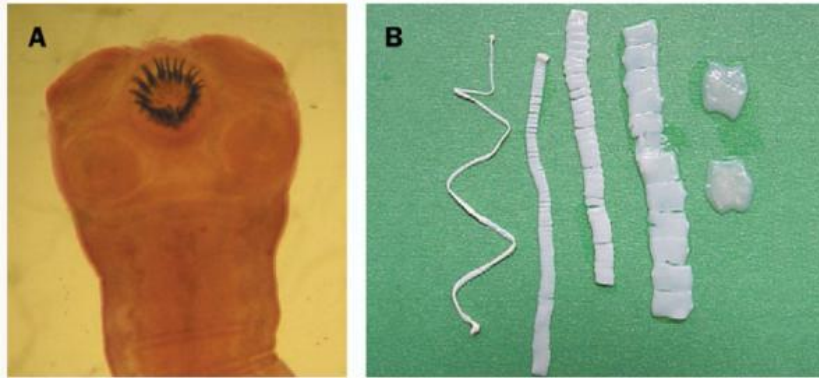


Figura I-3. Forma adulta de *T. solium*.

A) escólex, B) estróbilo mostrando proglótides inmaduras, maduras y grávidas

[Fuente: García et al., 2003 (20)].

1.2.1.4. Huevo de *T. solium*

El huevo es el estadio infeccioso de *T. solium*, y puede ser ingerido por el hospedero intermediario. El huevo mide de 31 a 43 micras de diámetro, tiene una cubierta gruesa y estriada denominada embrióforo, en el interior contiene una oncosfera armada con 6 ganchos (figura I-4). El embrióforo protege a la oncosfera frente a condiciones ambientales desfavorables, pero dentro del hospedero es fácilmente digerido liberando a la oncosfera a nivel del intestino.

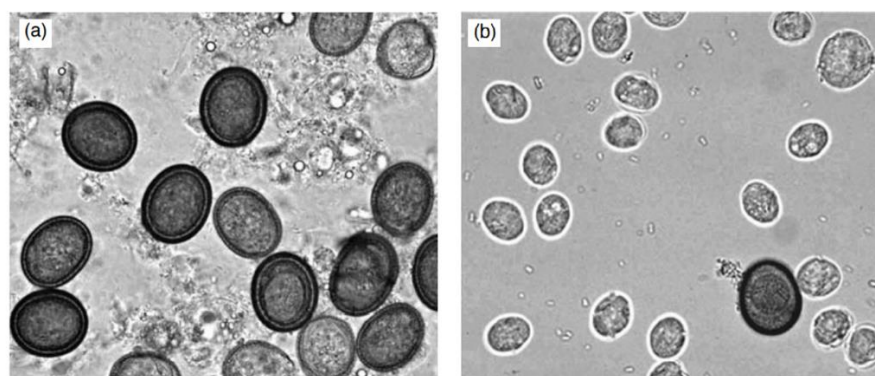


Figura I-4. Huevos y oncosferas de *T. solium*.

A) Huevos, B) oncosferas liberadas del huevo [Fuente: Singh, 2002 (18)].

1.2.1.5. Oncósfera de *T. solium*

Es la forma larvaria o embrión con seis ganchos, que migra desde el intestino a los tejidos internos u órganos dentro del hospedero intermediario. La oncosfera está protegida por una membrana oncosferal que le da la forma elipsoidal característica, tienen un tamaño de 22.4 a 25.6 micras de longitud por 18.4 a 21.6 micras de ancho (21). La oncosfera está compuesto por varias células, las cuales forman parte del sistema muscular, excretor y nervioso; además de los 6 ganchos, presenta un par de glándulas de penetración importantes para la migración (18). Cuando la oncosfera está cubierta por su membrana oncosferal, ésta se encuentra en un estado inactivo (sin movimiento) y es denominada “oncosfera no activada”; y cuando la oncosfera se libera de esta membrana, pasa a un estado activo y es denominada como “oncosfera activada”. La activación de la oncosfera se da gracias a la acción de los componentes de los jugos intestinales, e inicia dentro de su membrana oncosferal. El proceso de activación consiste en el movimiento activo de los ganchos y el cuerpo de la oncosfera logrando romper la membrana oncosferal para posteriormente liberarse de esta (figura I-5).



Figura I-5. Proceso de activación de la oncosfera de *T. solium*.

A) Se observa una oncosfera rodeada por su membrana oncosferal. B) Con el tiempo la membrana oncosferal se desprende. C) Al final, la oncosfera se libera de su membrana oncosferal [Fuente: Mendlovic et al., 2014 (22)].

Las oncosferas activadas se caracteriza por presentar un movimiento tipo ameboide por contracción y expansión (21), y son capaces de adherirse a las células a través de microvellosidades presentes en su superficie (figura I-6) (23), para luego atravesar la mucosa intestinal probablemente por la liberación de enzimas (24), que podrían estar presentes dentro de las vesículas que libera durante la adherencia (figura I-6). Las oncósferas demoran dos horas para atravesar la mucosa intestinal y vía vasos sanguíneos o linfáticos se dirige hacia diferentes órganos del hospedero (18).

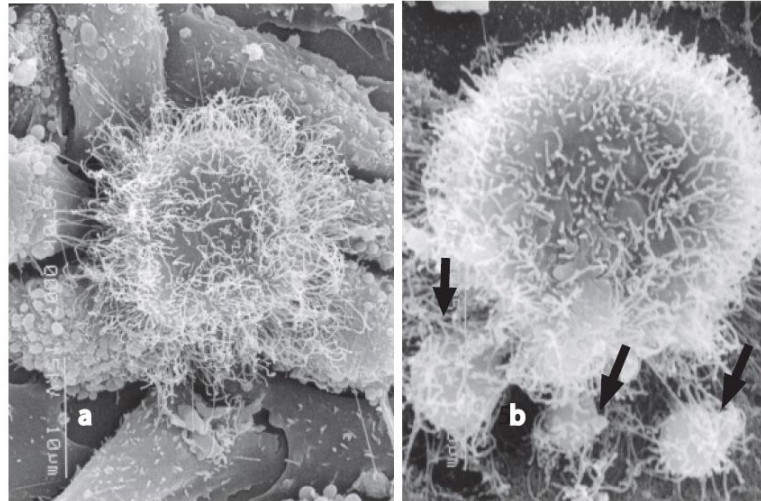


Figura I-6. Oncósfera de *T. solium* adherido a monocapa de células CHO-K1.
a) Oncosfera adherida a la superficie de las células a través de microvellosidades elongadas. b) Vesículas secretorias (flecha) de la oncósfera [Fuente: Verástegui et al., 2007 (23)].

1.2.1.6. Estadios o formas postoncosferales de *T. solium*

Es una etapa intermedia entre una oncósfera en el tejido y un cisticerco completamente desarrollado. También son denominados formas jóvenes del cisticerco o formas de transición.

Postoncosferas en el hospedero intermediario (cerdo)

Yoshino en 1933, estudio el desarrollo de las formas postoncosferales en el cerdo. Las postoncosferas se observan en los órganos internos o el musculo del cerdo entre las 24 y 72 horas de infección, y adoptan formas ovales o esféricas y no presentan ganchos. El tamaño de las postoncosferas a las 24 a 48 horas después de la infección es de 24 a 42 micras de largo por 21 a 36 micras de ancho; y entre las 48 y 72 horas, las postoncosferas miden entre 30 a 58 micras de longitud por 27 a 54 micras de ancho. Entre los 6 a 12 días después de la infección, macroscópicamente las postoncosferas son como manchas transparentes e incoloras, lo cual dificulta su identificación en el tejido; mientras que microscópicamente, tienen forma esférica, oval o cilíndrica.

A los 6 días, las postoncosferas de menor tamaño son generalmente sólidas, mientras que las de mayor tamaño tienen forma quística y llegan a medir entre 320 a 443 micras de longitud por 256 a 375 micras de ancho. Tienen una membrana externa delgada y células pleomórficas con procesos protoplásmicos; estas células están distribuidas irregularmente y se localizan principalmente hacía la parte externa; y esporádicamente en la parte central con formas estrelladas mixomatosas.

A los 12 días, las postoncosferas son más grandes y tienen forma quística con líquido en el interior. La pared del quiste es más delgada que las postoncosferas jóvenes; está compuesto de una membrana cuticular y una capa subcuticular; a través de la pared del quiste cerca de un polo, se puede ver una mancha que podría ser el origen del escólex, en esta región se observa una gran cantidad de células.

Entre 20 y 30 días, se observa el escólex rudimentario, que tiene forma de un brote vacío que está usualmente dirigida hacia el interior de la cavidad vesicular. Entre los 40 y 50 días, el escólex está casi completamente desarrollado con 4 ventosas y un rostelo provisto de ganchos (25).

Postoncosferas obtenidas in vitro

Las postoncosferas también pueden ser obtenidos *in vitro* al cultivar oncosferas activadas en monocapa de células. Presentan una morfología similar a las postoncosferas que se encuentran en el hospedero intermediario, por ejemplo: no presentan ganchos, adoptan diferentes formas (esféricas, ovales o cilíndricas), el tamaño incrementa a medida que pasa el tiempo en el cultivo, forman una protuberancia en uno de los extremos, y cuando la postoncosfera alcanza un mayor tamaño (1900 μm) adopta una forma esférica con células que se concentran en la parte central (figura I-7), que podría ser el inicio de la formación del escólex del futuro cisticerco (17). Otra de las características de las postoncosferas es que a nivel del tegumento no presentan microvellosidades elongadas como las oncosferas activadas, en lugar de esto, presentan microtriquias (Figura I-8).

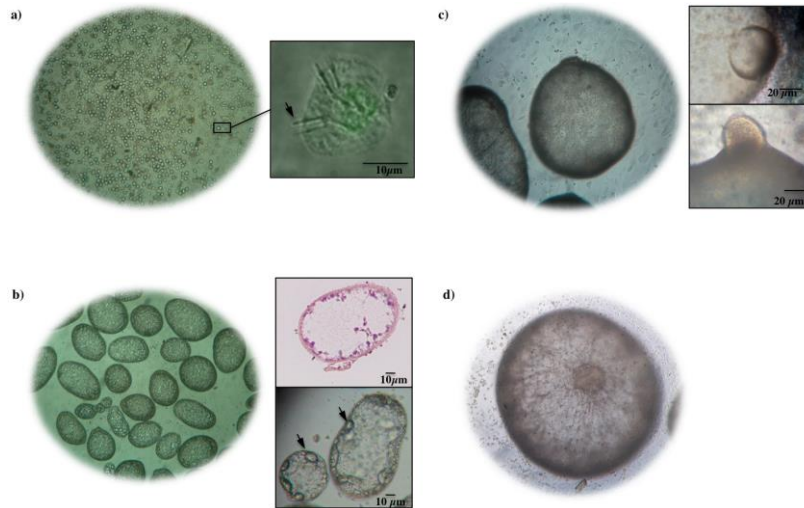


Figura I-7. Formas postoncosferales de *T. solium* obtenidas *in vitro*.

a) Cultivo de oncosferas activadas en monocapa de células. Postoncosferas a los 15 días (b), 30 días (c) y 60 días de cultivo (d) [Fuente: Chile et al., 2016(17)].

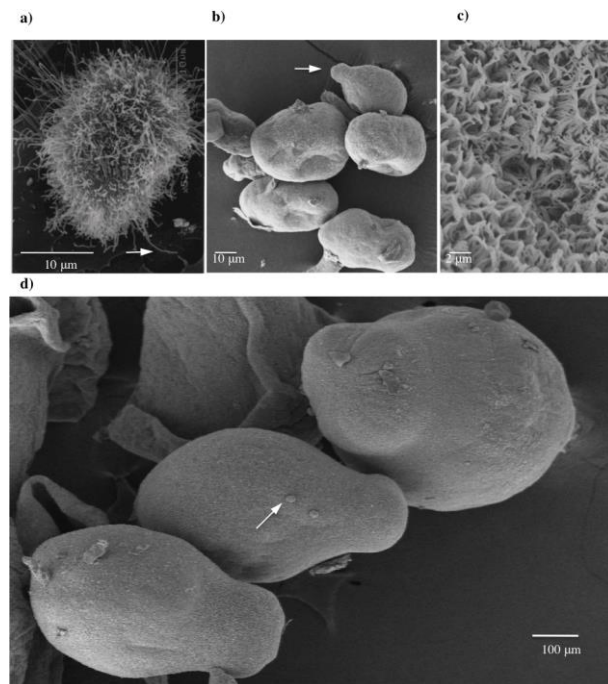


Figura I-8. Oncosfera comparada con postoncosferas de *T. solium*.

a) Oncosfera activada mostrando las microvellosidades elongadas; b) y d) Postoncosferas de 15 días y 30 días de cultivo; c) Tegumento de las postoncosferas mostrando las microtriquias [Fuente: Chile et al., 2016 (17)].

1.2.1.7. Cisticerco de *T. solium*

Denominado como *Cysticercus cellulosae*, es una forma vesiculosa o quística que se desarrolla en los tejidos del hospedero intermediario. Los cisticercos también denominados quistes, completan su desarrollo entre los 60 y 70 días después de la infección (18). Estas vesículas son redondas u ovoides con un tamaño que oscila entre 5 a 15 mm de largo, presenta una pared o membrana delgada que rodea una cavidad llena de líquido. En uno de los extremos de la vesícula, la membrana se encuentra plegada hacia adentro (invaginación), dando origen a un cuello que en su extremo interior presenta un escólex con 4 ventosas y una doble corona de ganchos (figura I-9). En cortes histológicos de tejido con cisticerco, se observa la pared delgada del cisticerco y una porción parenquimatosa que contiene el escólex invaginado rodeado por un canal espiral contorneado. En el escólex se puede observar los ganchos y las ventosas (19).

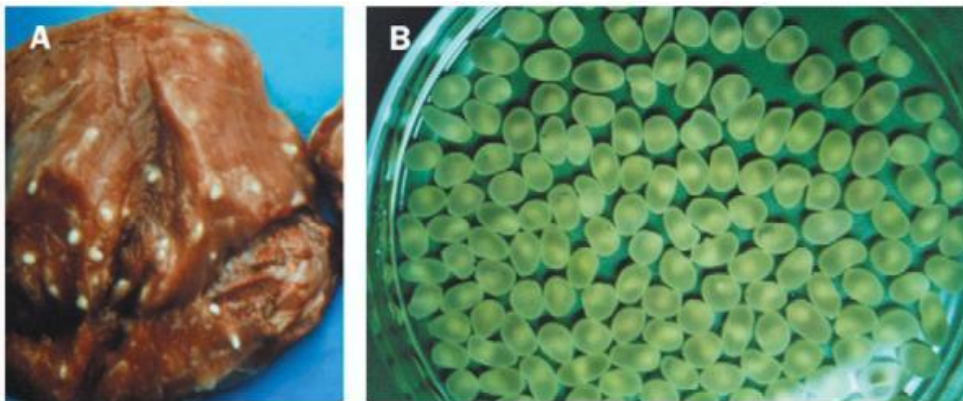


Figura I-9. Cisticerco de *T. solium*.

A) en musculo de cerdo. B) Removido del musculo de cerdo y colocado en una placa Petri, la estructura blanca dentro de cada cisticerco corresponde al escólex [Fuente: Garcia et al., 2003 (20)].

1.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

El complejo teniasis/cisticercosis por *T. solium* es endémica en regiones de Latinoamérica, África y Asia. (figura I-10), y se ha estimado que la seroprevalencia de cisticercosis humana basada en la detección de anticuerpos contra *T. solium* es del 13 %, 17% y 15.6% respectivamente, mientras que la prevalencia de teniasis se estima que está en el rango de 0 a 17.25% (26).

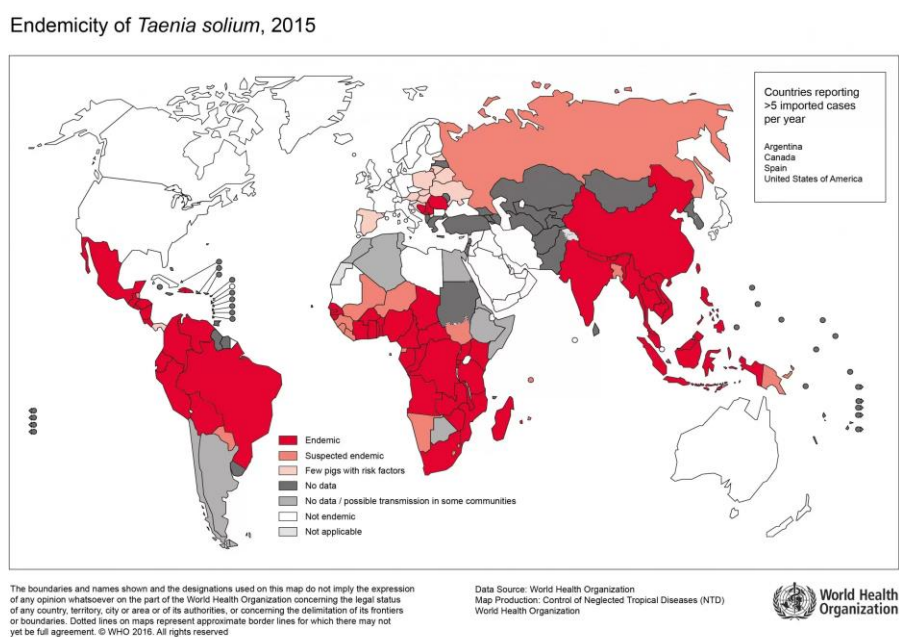


Figura I-10. Mapa mostrando áreas donde la cisticercosis es endémica.

En cuanto a la NCC, la organización mundial de la salud estima que 50 millones de personas a nivel mundial tienen NCC, y esto causa al menos 50 000 muertes anualmente. Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen las convulsiones, la hipertensión intracraneal y déficit neurológico. En países en vías de desarrollo, aproximadamente el 30 % de los casos de epilepsia de inicio tardío está asociado a la NCC (27).

En el Perú, se estima que las zonas endémicas para NCC son: toda la sierra, la costa norte y la selva alta (Figura I-11). Siendo la seroprevalencia de cisticercosis entre 10 y 20 % basado en la detección de anticuerpos; mientras que la prevalencia de la teniasis es entre 0.5 a 1% (28), pudiendo llegar hasta 1.5 % en el norte del Perú (29).



Figura I-11. Mapa del Perú mostrando las principales áreas endémicas para teniasis/cisticercosis por *T. solium*.

[Fuente: García et al, 2010 (28)]

1.2.3. NEUROCISTICERCOSIS

Es una enfermedad del SNC causada por el cisticerco de *T. solium*, y se adquiere por la ingestión accidental de huevos del parásito. Las manifestaciones clínicas difieren según la ubicación del cisticerco en el SNC, el parásito se puede ubicar dentro (NCC parenquimatosa) o fuera (NCC extraparenquimal) del parénquima cerebral.

1.2.3.1. Neurocisticercosis parenquimatosa

Los pacientes con NCC parenquimatosa usualmente presentan convulsiones y dolor de cabeza crónico. Está asociado con la tercera parte de los casos totales de epilepsia en regiones endémicas, y como tal representa la causa más importante de epilepsia adquirida en todo el mundo (1). En el parénquima (figura I-12), los cisticercos raramente crecen más allá de los 2 cm, pasan de un estado de reposo viable a un estado de resolución completa o calcificación; este proceso involucra inflamación focal, seguida de la degeneración del cisticerco y finalmente la calcificación. La degeneración del cisticerco implica inflamación perilesional y se asocia frecuentemente con la aparición o exacerbación de síntomas neurológicos.

Existen casos de pacientes con una pequeña lesión quística en el parénquima, que puede ser viable o en degeneración; estos casos son comunes en el subcontinente indio, y afecta a individuos jóvenes, tiene un pronóstico benigno. Existen también casos raros, en donde los pacientes con NCC parenquimatosa pueden presentar cientos de pequeños cisticercos degenerados; a esta particular y severa presentación se le denomina “encefalitis cisticercosa” donde la inflamación intensa pone al paciente en riesgo de muerte (1).

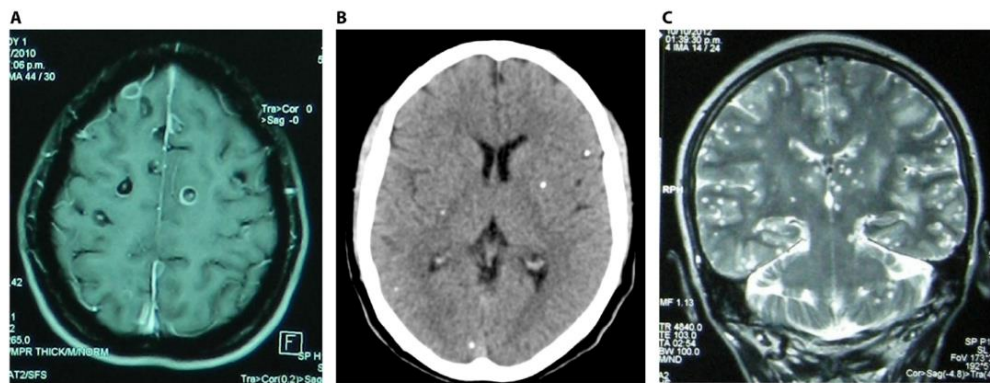


Figura I-12. Neurocisticercosis parenquimatosa.

A) cisticercos viables y degenerados; B) lesiones calcificadas; C) encefalitis cisticercosa [Fuente: García et al. 2020 (1)].

1.2.3.2. Neurocisticercosis extraparenquimal

La presencia de cisticercos fuera del parénquima (figura I-13) es un factor importante de morbilidad y mortalidad; la mayoría de los casos se localizan en los ventrículos o en el espacio subaracnoideo. Los cisticercos tienden a crecer y diseminarse a los espacios circundantes, causando manifestaciones clínicas relacionadas con efectos de masa y tienen un peor pronóstico (1).

- **Intraventriculares:** los cisticercos ubicados particularmente en el tercer y cuarto ventrículo pueden causar hidrocefalia o pueden causar síntomas debido a la compresión directa del tronco encefálico. Los cisticercos también se pueden localizar en los ventrículos laterales, y pueden migrar de un ventrículo a otro. El grado de inflamación presente, puede ser importante al momento de la extirpación quirúrgica del cisticerco, ya que los cisticercos con inflamación circundante pueden ser adherentes y difíciles de extirpar.

- **Subaracnoideos:** Las localizaciones más frecuentes de los cisticercos son: las cisuras de Silvio, las cisternas basales y los espacios interhemisféricos. En estas zonas, particularmente en las cisuras de Silvio, las lesiones tienden a formar grandes agregados (cisticercos "gigantes" o grupos de cisticercos). Las lesiones en los espacios subaracnoideos basales o en las áreas interhemisféricas también tienden a extenderse a los espacios circundantes. Una de las características de los cisticercos encontrados en estas zonas, es la naturaleza proliferativa de su membrana, con áreas de crecimiento exuberante y la ausencia del escólex, que se asocia con niveles elevados de antígenos parasitarios circulantes, fuerte respuesta inmune por anticuerpos y respuesta inflamatoria. Los efectos de masa y la respuesta inflamatoria crónica con fibrosis resultante, con frecuencia conducen a hidrocefalia y la presentación común de hipertensión intracraneal. La inflamación también puede provocar vasculitis y eventos isquémicos asociados.

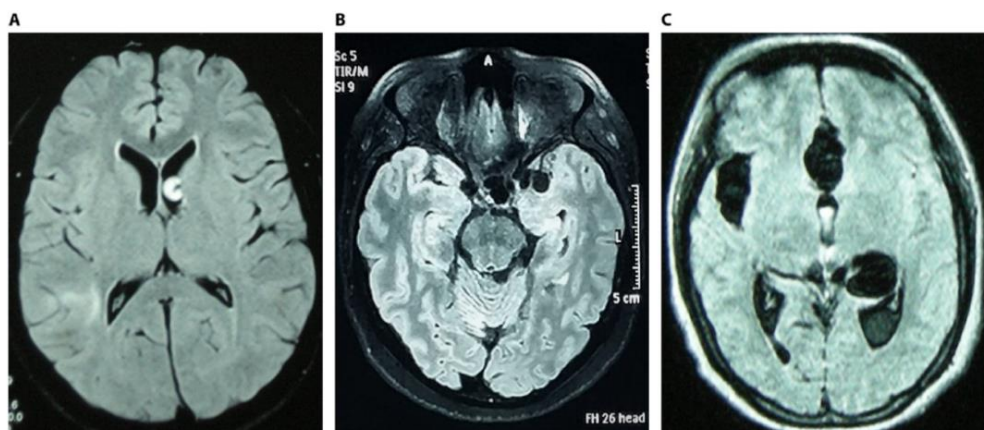


Figura I-13. Neurocisticercosis extraparenquimal.

A) Cisticercos intraventricular; B) Cisticercosis subaracnoidea basal; C) Cisticercosis en la cisura de Silvio e interhemisférica [Fuente: Garcia et al. 2020 (1)].

1.2.4. RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN NEUROCISTICERCOSIS

La evidencia del rol de los anticuerpos en la NCC ha sido demostrada por la identificación de cuerpos de Russell (inclusiones de anticuerpos) dentro de las células plasmáticas cercanas a la lesión cerebral. Durante el curso clínico de la NCC se producen varias clases de anticuerpos, siendo la más destacada la inmunoglobulina (Ig) G en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) (30).

En la infección extraparenquimal, los pacientes sintomáticos que tienen cisticercos en los espacios subaracnoideos presentan un incremento de IgG, IgM e IgE comparado con paciente asintomáticos. También se ha reportado que algunas personas sin NCC de zonas altamente endémicas tienen niveles altos de IgG e IgE comparado con personas que habitan en zonas de baja endemicidad, demostrando que la respuesta de anticuerpos está relacionado con la intensidad de exposición al parásito, y que algunas personas de zonas endémicas están expuestas a *T. solium*, pero no desarrollan la enfermedad por tener una respuesta inmune fuerte que podría prevenir el establecimiento del parásito (30).

Otros estudios sugieren que la presencia de anticuerpos está influenciada por la etapa de desarrollo del parásito. Por lo tanto, la carga parasitaria y las presentaciones radiológicas de los pacientes contribuye a la respuesta humoral en la NCC; y está asociada con la exposición y la intensidad de la infección, así como, con la etapa de desarrollo del parásito y la respuesta inmune celular inducida (30).

1.2.5. DIAGNOSTICO DE LA NEUROCISTICERCOSIS

Se realiza principalmente por neuroimagen complementado con la serología que es usado como herramienta confirmatoria de acuerdo con el tipo de NCC (31).

1.2.5.1. Neuroimagen

Se utiliza la tomografía axial computarizada (TAC) y/o la imagen por resonancia magnética. En la TAC se puede detectar formas activas, en degeneración e inactivas del cisticerco; también es útil en NCC extraparenquimal (subaracnoidea, quistes intraventriculares) y en encefalitis cisticercósica. La imagen por resonancia magnética es más sensible que la TAC para detectar NCC parenquimal y extraparenquimal, su sensibilidad disminuye en la detección de lesiones calcificadas (1,31).

La neuroimagen es de mayor utilidad que la serología debido a que provee datos del número, tamaño, localización y etapa de las lesiones, así como la inflamación perilesional (1).

1.2.5.2. Inmunodiagnóstico

En algunos casos el diagnóstico por neuroimagen no es conclusivo, en estos casos el inmunodiagnóstico puede cumplir un rol importante en confirmar el diagnóstico (1). El western blot que usa 7 glicoproteínas purificadas de cisticerco de *T. solium* denominado como LLGP-EITB es la técnica usada para el inmunodiagnóstico (figura I-14). Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos contra las glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* en suero o LCR. El

reconocimiento de cualquiera de las 7 glicoproteínas de diagnóstico por los anticuerpos de los pacientes indica un resultado positivo.

En cuanto a la sensibilidad de esta prueba, se ha reportado que es alta (98%) en pacientes que tienen más de un cisticerco en el cerebro (7); mientras que en pacientes que tienen 1 cisticerco o cisticercos o lesiones calcificadas, la sensibilidad disminuye (8). La especificidad de esta prueba es del 100 % (7).

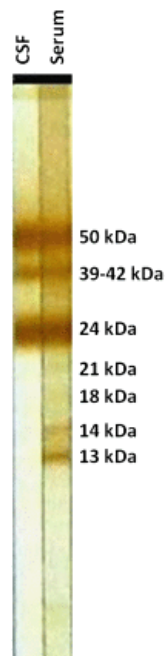


Figura I-14. Inmunoelectrotransferencia-blot con glicoproteínas purificadas con Lentil Lectin.

Se muestra el peso molecular de las 7 bandas de diagnóstico y la diferencia entre los niveles de anticuerpos en suero (*Serum*) y líquido cefalorraquídeo (*CSF*) del mismo paciente [Fuente: Rodríguez et al., 2012 (32)].

1.2.6. MODELO ANIMAL DE NEUROCISTICERCOSIS

Los modelos animales contribuyen al entendimiento de la inmunopatología de la enfermedad, de la interacción del parásito con su hospedero y de otros factores envueltos con la adquisición/progresión de la enfermedad. El modelo porcino, infectado natural o experimentalmente, representa un modelo ideal para el estudio de la NCC debido a que la progresión de la enfermedad es similar a lo que sucede en humanos, sin embargo, el manejo experimental de animales de gran tamaño tiene ciertos desafíos y limitaciones. Por ese motivo, los modelos en ratón o rata son los más utilizados debido a su fácil manejo y también por la disponibilidad comercial de reactivos (33).

Modelo de rata para el estudio de la neurocisticercosis

Este modelo utiliza oncosferas activadas de *T. solium* para infectar intracranialmente ratas. Se ha reportado un alto porcentaje de éxito de infección (83%) cuando las ratas son infectadas a los 10 días de edad, esto se evidencia por el desarrollo de cisticercos en el cerebro a los 4 meses post infección (34). El modelo muestra una distribución diversa de cisticercos en el SNC y la inmunopatología es similar a lo que se observa en humanos (35); una gran ventaja sobre otros modelos de roedores es el uso de *T. solium* responsable de la enfermedad humana (33,35). Así mismo, en este modelo se ha detectado antígenos del parásito y anticuerpos contra el parásito en el plasma de ratas que desarrollan NCC, similar a lo que ocurre en su hospedero natural (34), lo cual hace posible su utilidad para evaluar la respuesta inmune humoral desde el inicio de la infección hasta el desarrollo de la NCC.

1.2.7. PROTEINAS DE *T. solium*

Según el análisis bioinformático del genoma, *T. solium* tiene 12902 proteínas, de las cuales 838 son de tipo excretorio/secretorio (E/S). Varias de estas proteínas son antígenos de diagnóstico, proteínas secretorias ricas en cisteína, antígenos de oncosfera, entre otros. La mayoría de las proteínas E/S tienen como función molecular la unión y actividad catalítica; así mismo participan en diferentes procesos biológicos (36).

1.2.7.1. Proteínas de oncosferas

En las oncosferas activada se ha identificado 65 proteínas por espectrometría de masas, estas proteínas participan en procesos como la adhesión celular, plegamiento de proteínas, proteólisis, detoxificación, entre otros. Muchas de las proteínas identificadas cumplen un rol en la interacción con el hospedero, otras actúan como moduladoras de la respuesta inmune (por ejemplo: el precursor del antígeno 5, tropomiosina A y B, paramiosina, fructuosa difosfato aldolasa, beta enolasa, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, glutatión S transferasa (GST), superóxido dismutasa (SOD) y la proteína de choque térmico 70 (HSP70), y algunas han sido reportados como potenciales candidatas a vacunas (como: tropomiosina A y B, Tso122a, cadena ligera de dineína, proteína similar a Sm20 de unión a calcio, paramiosina, fructuosa difosfato aldolasa, GST, SOD, 14-3-3z y la HSP70) (37). Otras proteínas reportadas en oncosferas son: la Tso31 (que es similar a un receptor extracelular) (38), la TSOL16, TSOL18, TSOL45-1A (39), una proteína de 42kDa (con un dominio similar a troponina) (12), y las proteínas de 22.5 y 31.3 KDa que son específicos de oncosferas de *T. solium* (11).

1.2.7.2. Proteínas de postoncosfera

Aún no se han identificado las proteínas de las postoncosferas, pero se ha demostrado que estas formas de transición comparten bandas proteicas con el estadio de oncósfera y cisticerco (17).

1.2.7.3. Proteínas de cisticerco

En los cisticercos se ha identificado proteínas a partir del E/S, el fluido vesicular y el extracto salino vesicular. En el E/S se reportó 76 proteínas identificadas por espectrometría de masas, de estas proteínas 17 corresponden a proteínas del hospedero (cerdo), y 27 son proteínas de *T. solium* descritas en la literatura como: los antígenos de diagnóstico (GP50, T24, y la familia de proteínas de 8 kDa) que son parte de las siete bandas de diagnóstico del LLGP-EITB, paramiosina, proteína 14-3-3, actina, P27, HSP y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa. Otras proteínas identificadas participan en el sistema antioxidante y son considerados como blancos terapéuticos y candidatos a vacunas. También se identificaron cisteínas proteasas que ayudan al parasito a evadir la respuesta inmune del hospedero (40).

En el fluido vesicular se han identificado 7 antígenos específicos para cisticercosis porcina (tropomiosina 2, tubulina alfa 1 y beta, anexina B1, HSP, proteína 14-3-3 y una cinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico) (41). En el extracto salino vesicular se ha reportado 68 proteínas, algunas de estas son usadas como antígenos para el inmunodiagnóstico de la NCC y /o en el desarrollo de vacunas recombinantes o sintéticas contra cisticercosis humana (42).

1.2.8. TÉCNICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Entre las técnicas más utilizadas para la identificación de proteínas esta la espectrometría de masas, definida como una técnica analítica que identifica y cuantifica moléculas por análisis de la relación masa/carga (m/z) de los iones de la molécula (43). El principio consiste en la separación de las moléculas por ionización con electrones de alta energía que rompen una molécula en fragmentos (las proteínas son usualmente ionizados vía protonación debido a su grupo amino que acepta iones de H^+). El patrón de fragmentación y los valores de m/z proveen información acerca del peso molecular y la estructura química de la proteína (44).

La separación e identificación se realiza en un espectrómetro de masas que básicamente consiste en: 1) un dispositivo para la entrada de la muestra, 2) una fuente de ionización molecular y transferencia de los iones de las moléculas de la muestra hacia una fase gaseosa, 3) un analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su m/z , 4) un detector que monitorea los iones separados, 4) y un sistema informático para la obtención y análisis de datos (45). El espectrómetro de masas analiza cualquier molécula biológica susceptible a ionización gracias a 2 técnicas de ionización: la ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI) (46); y la ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) (47).

Previo a la espectrometría de masas, se aplican otros métodos para reducir la complejidad de la muestra e incrementar la identificación de proteínas menos abundantes (48). A continuación, se explican 2 alternativas que combinan técnicas para la identificación de proteínas.

1.2.8.1. SDS-PAGE y LC-MS/MS

Para la identificación de proteínas primero se realiza la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) conteniendo el detergente dodecilsulfato sódico (SDS), a esta técnica se le conoce como SDS-PAGE; luego se realiza un análisis mediante cromatografía líquida (LC) el cual está acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) para su identificación (48).

A. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Este método llegó a ser popular para al menos dos propósitos: la determinación del peso molecular y la evaluación de la pureza de las proteínas. Sin embargo, en la actualidad, esta técnica es usada para muchas aplicaciones como la comparación de la composición de proteínas de diferentes muestras, para el Western blot acoplado a la inmunodetección, y como un segundo paso en la técnica de electroforesis bidimensional (48).

Esta técnica separa las proteínas en base a su habilidad para migrar en un campo eléctrico, en función al tamaño de la cadena polipeptídica de la proteína. Para lograr esto, se requiere que la proteína se encuentre en una forma lineal es decir como una cadena polipeptídica, además la cadena polipeptídica deberá tener una carga negativa para que pueda migrar hacia el polo positivo del campo eléctrico; ambos requisitos se logran por la adición del detergente SDS.

Para que las proteínas se separen en base a su tamaño es necesario colocarlo en un gel de poliacrilamida. El gel de poliacrilamida es preparado entre dos placas de vidrio, primero se prepara el gel donde se separarán las proteínas (conocido como

el *resolving gel*); y luego se prepara el gel conocido como *stacking gel*, en donde se colocará un peine durante la polimerización para la formación de pozos que servirán para colocar la muestra. Después de la polimerización el peine es retirado, y el gel es colocado en una cámara conteniendo buffer, seguidamente se coloca la muestra en los pozos, y luego se conecta a la corriente para su separación. Al finalizar la corrida, el gel es coloreado para visualizar las proteínas (figura I-15) (44).

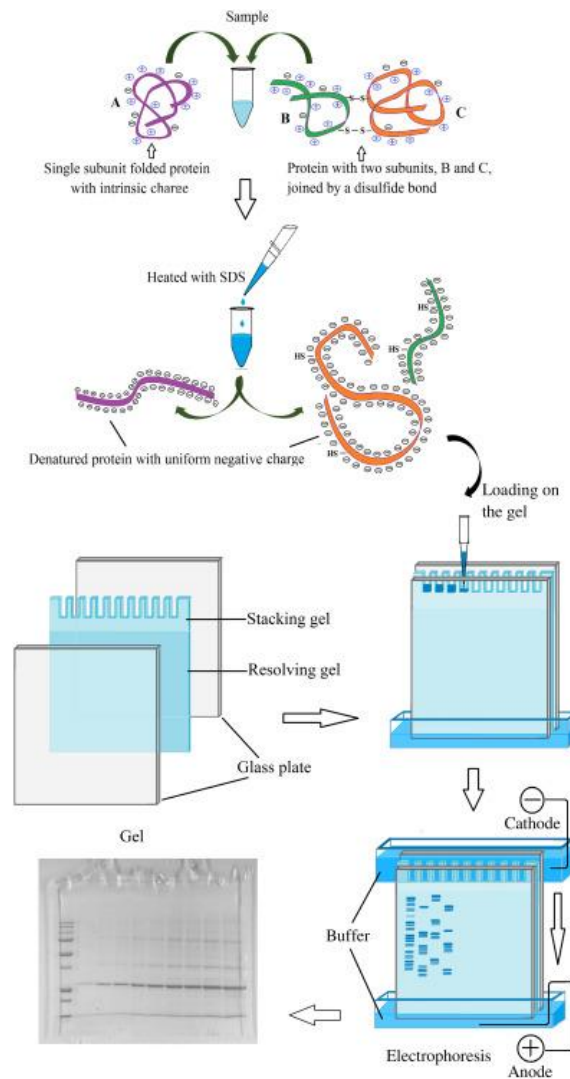


Figura I-15. Diagrama esquemático de la electroforesis en geles de poliacrilamida.

[Fuente: Büyükköroğlu et al., 2018 (44)].

B. Cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem

Esta técnica combina la separación y análisis de las muestras por cromatografía líquida y espectrometría de masas respectivamente. Una vez que las proteínas se separan por SDS-PAGE, se procede a cortar las bandas de interés. Luego las proteínas presentes en las bandas pasan por un paso de reducción/alquilación y digestión proteolítica obteniendo al final péptidos, los cuales pasan por un siguiente paso de separación por cromatografía líquida (denominada como nano-HPLC) seguido de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (figura I-16).

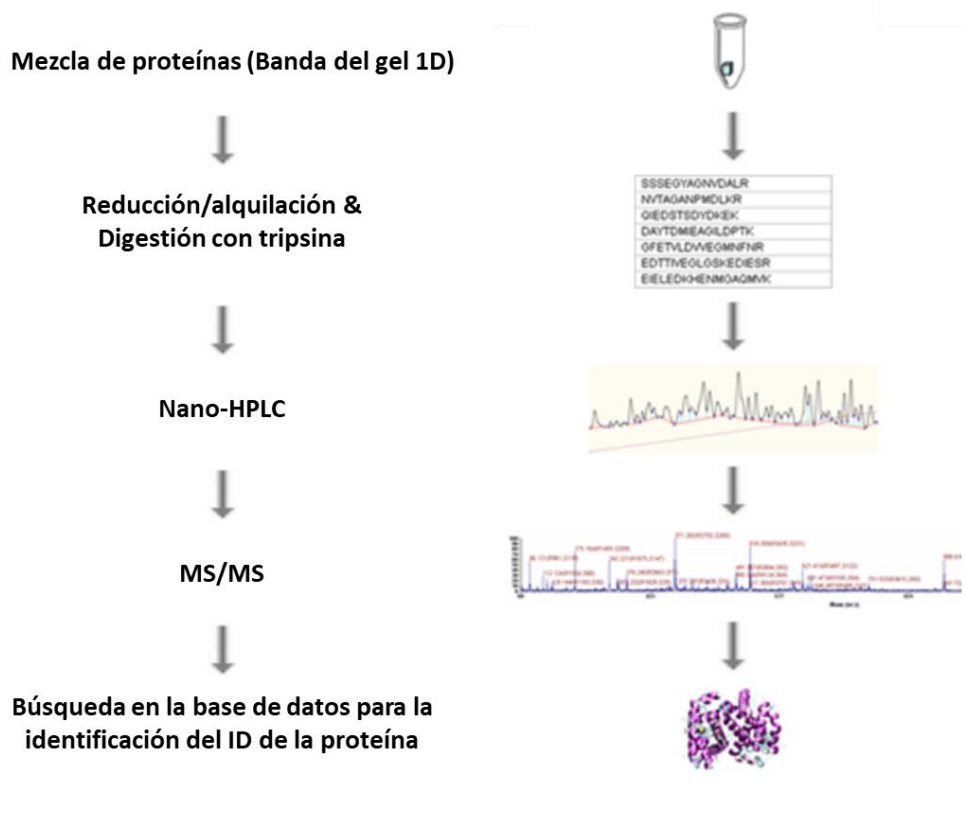


Figura I-16. Pasos para el LC-MS/MS.
[Adaptado de *Applied Biomics* (49)]

- **Cromatografía líquida**

Es un método físico de separación en la cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases: una de ellas es estacionaria (fase estacionaria) y la otra se mueve en una dirección definitiva (fase móvil). El proceso cromatográfico ocurre como resultado de pasos repetidos de sorción/desorción durante el movimiento de los analitos a través de la fase estacionaria. La separación es debido a la diferencia en los coeficientes de distribución de los analitos individuales en la muestra (50).

Un sistema cromatográfico consiste en 4 componentes: un dispositivo para introducir la muestra, una fase móvil, una fase estacionaria y un detector. La muestra se inyecta por medio del puerto o dispositivo de inyección en el flujo de la fase móvil entregado por la bomba de alta presión y luego es transportado a través de la columna (fase estacionaria) donde tiene lugar la separación. La separación es monitoreada con un detector de flujo. La columna es el corazón del sistema de cromatografía líquida, y cuando va acoplado a un espectrómetro de masas, se usan columnas pequeñas de 30 a 50 mm que son empaquetados con material de 3-5 μm , a estas columnas se les denomina como nano-LC que están diseñadas de tubos de sílice fundida de 0.05-0.5 mm de diámetro interno (50).

El detector mide un parámetro físico del efluente de la columna o de los componentes del efluente de la columna y transforma esto a una señal eléctrica. Un detector puede ser un dispositivo sensible a la concentración (el cual da una señal que está en función de la concentración de un analito en el efluente) o un dispositivo sensible al flujo de masa (donde la señal es proporcional al flujo de masa del analito) (50).

- Espectrometría de masa en tándem

En la MS/MS se obtiene espectros de masa de iones de fragmentos peptídicos a partir de un ion precursor peptídico particular. Estos fragmentos son producidos en múltiples reacciones de colisión de baja energía. Para la identificación de las proteínas, el espectro de iones de fragmentos de baja energía observados se empareja con uno que se predice para un péptido de la misma masa precursora que se encuentra en una base de datos (51).

Un equipo de MS/MS está constituido de 6 componentes: el sistema de introducción de muestras, la fuente de ionización, primer analizador de masas (MS1), cámara o celda de colisión, segundo analizador de masas (MS2), y un detector (figura I-17) (45). Se requieren 2 analizadores de masas, uno para seleccionar el ion precursor de interés de otros iones generados en la fuente de ionización, y el otro para analizar los iones producto después de la colisión (50).

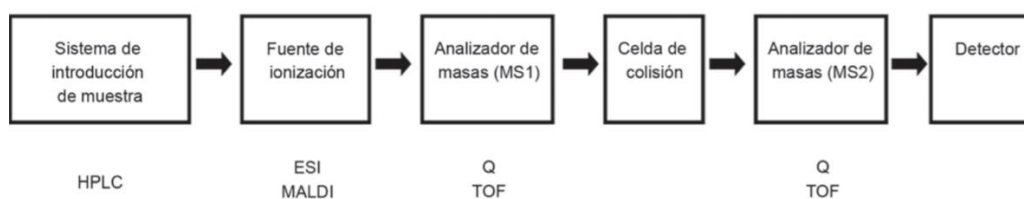


Figura I-17. Esquema general de un sistema de espectrometría de masa en tándem.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia, ESI: ionización por electroespray, MALDI: ionización mediante desorción por láser asistida por matriz, Q: Cuadrupolo, TOF: tiempo de vuelo [fuente: adaptado de Fernández-Lainez, et al., 2009(45)].

1.2.8.2. Electroforesis bidimensional y MALDI-TOF/TOF

A. Electroforesis bidimensional

Es una de las técnicas más empleadas para la separación de proteínas previo al análisis por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF. Las proteínas se separan en 2 pasos: en el primer paso (primera dimensión) se realiza el isoelectroenfoque en un gradiente continuo de pH, que separa las proteínas en base a su punto isoelectroenfoque (pI); seguidamente, en el segundo paso (segunda dimensión) se realiza la SDS-PAGE para separar las proteínas en función a su masa o peso molecular.

Primera dimensión: Isoelectroenfoque. Las proteínas se separan en base a sus puntos isoelectroenfoque. El punto isoelectroenfoque (pI) se define como el pH en el cual la proteína tiene una carga neta de 0. La carga neta de una proteína es la suma de las cargas positivas y negativas en las cadenas laterales de los aminoácidos, y este valor cambia de acuerdo con el pH. Una proteína tiene carga neta de 0 cuando el número de cargas positivas se iguala al número de cargas negativas. En el isoelectroenfoque, cuando se aplica la muestra en el gradiente de pH, las proteínas que están por debajo de su pI estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el electrodo cargado negativamente (cátodo) mientras que las proteínas que estén por encima de su pI estarán cargadas negativamente y migrarán hacia el electrodo cargado positivamente (ánodo); y se detendrán cuando alcancen la región del gradiente de pH donde sus cargas netas sean de 0 (figura I-18) (44).

Segunda dimensión: En este paso las proteínas son separadas de acuerdo con su masa molecular. Las proteínas separadas en la primera dimensión son cargadas negativamente con SDS, luego son colocados en forma horizontal en el

gel SDS-PAGE (figura I-18) (44). Para visualizar las proteínas separadas se puede usar Azul de Coomassie (si la cantidad de proteínas es de 10 ng), coloración plata o un marcaje fluorescente (si la cantidad de proteínas sea de 0.5 ng). En el gel se observarán manchas denominadas “spots”, cada spot corresponde a proteínas que tienen el mismo peso molecular y el mismo punto isoeléctrico.

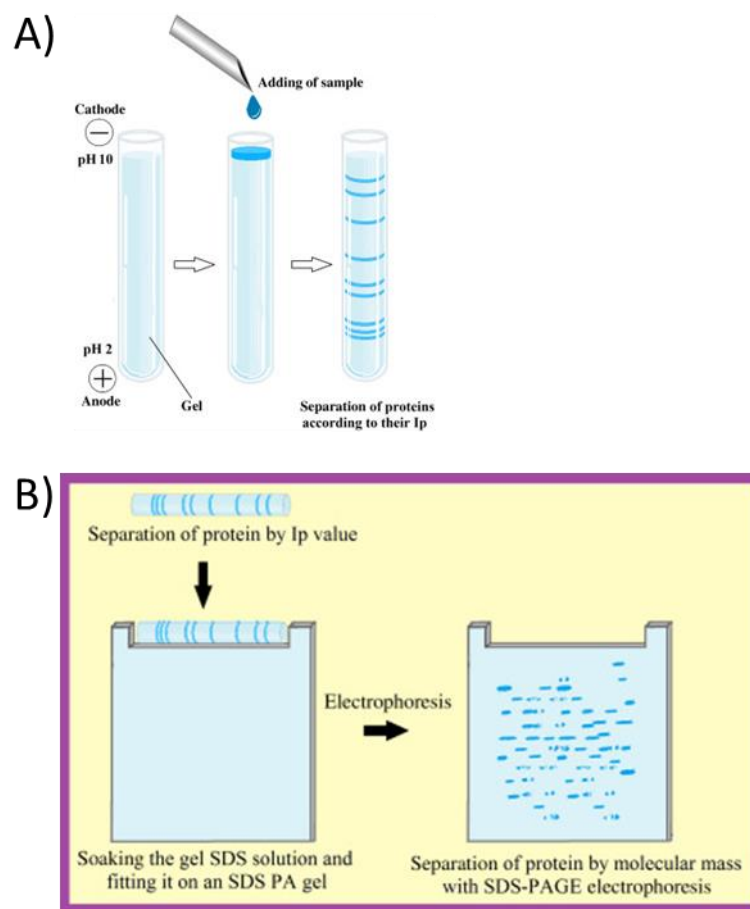


Figura I-18. Pasos de la electroforesis bidimensional.

A) primera dimensión, B) segunda dimensión [Fuente: Büyükköroğlu et al., 2018 (44)].

B. MALDI-TOF/TOF

A partir de los geles teñido, los *spots* pasan por procesos de escisión, desteñido, extracción de proteínas, digestión y análisis de los péptidos por espectrometría de masa (figura I-19).

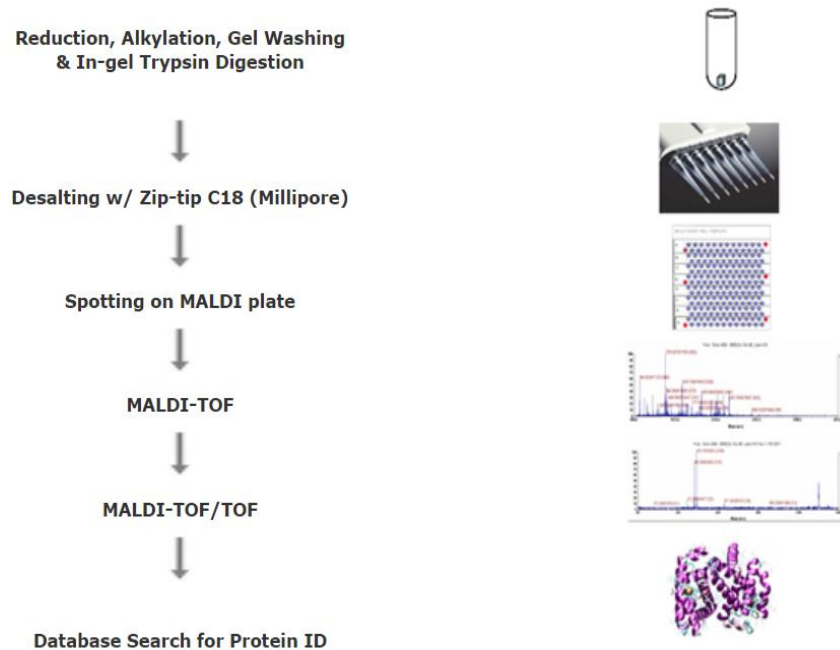


Figura I-19. Pasos para el MALDI-TOF/TOF.

[Fuente: Applied Biomics (49)]

MALDI-TOF. En esta técnica se combinan 2 tecnologías el MALDI como fuente de ionización y el tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF) como analizador de masas. En el MALDI, el analito se mezcla con una matriz en presencia de un disolvente orgánico y se deposita en una superficie metálica. Al evaporarse el compuesto orgánico, la matriz co - cristaliza junto con el analito. La placa metálica se introduce en la cámara de ionización del espectrómetro de masas, que se encuentra en alto vacío, y a continuación se incide con un pulso de un láser ultravioleta (UV) sobre ella. La matriz cristalizada absorbe la energía del láser UV y se produce un

importante aumento de energía en una superficie pequeña, lo que conlleva una rápida sublimación de la mezcla, dejando el analito ionizado y en fase gaseosa. La acción de un campo eléctrico produce el movimiento de los iones del analito hacia el analizador de masas. El TOF, mide el tiempo que necesitan los iones acelerados para recorrer una distancia, que depende de las características del instrumento, sin que los iones estén sometidos a un campo eléctrico y/o magnético (figura 1.20).

MALDI-TOF/TOF. En esta técnica el primer analizador es usado como un filtro de masas. Los fragmentos metaestables, así como los productos de decaimiento inducido por colisión se aceleran en un segundo analizador TOF para el análisis de masas (figura I-20).

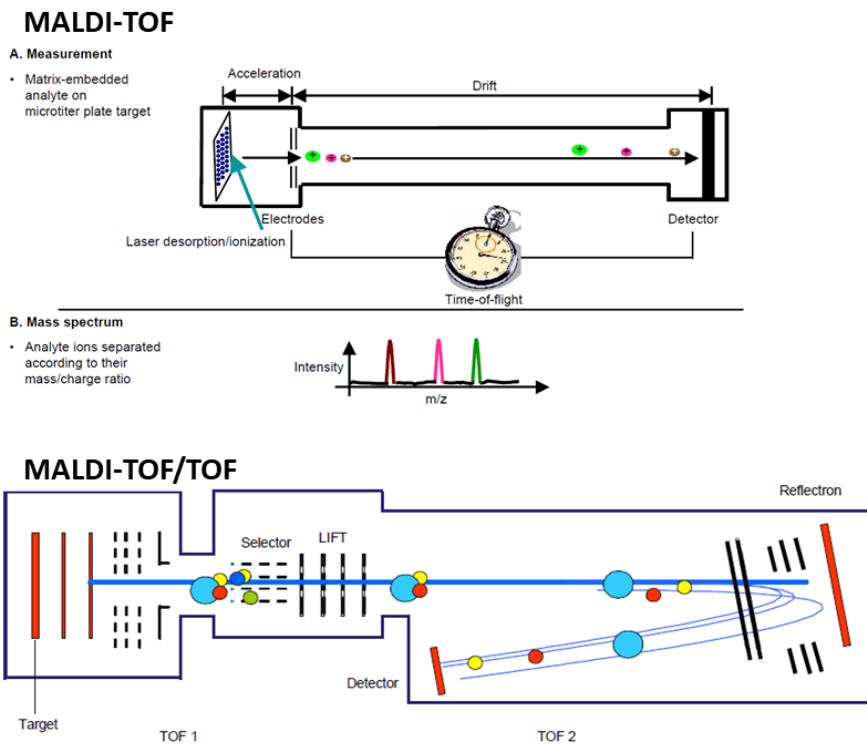


Figura I-20. Principio del MALDI-TOF y del MALDI-TOF/TOF.
 [Fuente: Pusch et al., 2003 (52)]

1.2.9. OBTENCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN *Escherichia coli*

La obtención de proteínas recombinantes en una gran cantidad permite su caracterización bioquímica, entre otros. En teoría, los pasos para obtener una proteína recombinante son bastantes sencillos: primero el gen de interés es clonado en un vector de expresión, luego este vector es transformado en un hospedador, luego este hospedador es inducido para que exprese el gen de interés, y finalmente la proteína esta lista para su purificación y caracterización. Sin embargo, en la práctica, decenas de cosas pueden salir mal, como el bajo crecimiento del hospedador la formación de cuerpos de inclusión o la inactividad de las proteínas (53)

E. coli, es uno de los organismos de elección para la producción de proteínas recombinantes. Las ventajas de usarlo como organismo huésped son: 1) la cinética de crecimiento es incomparablemente rápida, 2) se consigue fácilmente cultivos de alta densidad celular, 3) se pueden preparar medios complejos ricos a partir de componentes económicos y fácilmente disponibles, 4) la transformación con ADN exógeno es rápida y sencilla (53).

Vector de expresión

Los plásmidos de expresión son el resultado de múltiples combinaciones de replicones, promotores, marcadores de selección, sitios de clonación múltiples (MCS), y estrategias de remoción de proteínas fusionadas (figura I-21).

Los replicones son los elementos genéticos que se replican como unidades autónomas, consiste en un origen de replicación juntos con sus elementos de control en cis. Los promotores son regiones del operón que controlan el inicio de la transcripción, y uno de los más utilizados es el promotor *lac* componente clave del operón *lac*, el cual es inducido por lactosa; otros promotores usados son los híbridos sintéticos que combinan otros promotores con el promotor *lac*, por ejemplo, el promotor *tac* que consta de la región -35 del promotor *trp* y la región -10 del promotor *lac*. Ambos sistemas pueden ser inducido por lactosa o su análogo no hidrolizable Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (53).

El marcador de selección utilizado en los plásmidos es el marcador de resistencia, que favorece el crecimiento de las células que tienen el plásmido e impide el crecimiento de células sin plásmido; en el sistema de *E. coli*, los genes de resistencia a antibióticos se usan para este propósito. Por ejemplo, el gen *bla* confiere resistencia a ampicilina, cuyo producto es una enzima periplásmica que inactiva el anillo β -lactámico de los antibióticos betalactámicos (53).

Las etiquetas de afinidad también son importantes en el plásmido, para la detección de la proteína recombinante durante la expresión y purificación, para lograr la máxima solubilidad y para purificar fácilmente la proteína del medio celular de *E. coli*; las etiquetas de afinidad se expresan junto con la proteína recombinante y puede ser una secuencia corta de aminoácidos (etiqueta peptídica) o un polipéptido grande (pareja de fusión); las etiquetas peptídicas son menos probables de interferir cuando se fusionan a proteínas, sin embargo, en algunos casos pueden provocar efectos negativos en la estructura terciaria o en la actividad biológica de la proteína. Las etiquetas de afinidad permiten detectar la proteína

recombinante mediante western blot con anticuerpos comerciales, así mismo, permite la purificación de la proteína recombinante en un solo paso con el uso de resinas con afinidad a estas etiquetas. Las parejas o proteínas de fusión incrementan la solubilidad de las proteínas recombinantes, entre los más usados se tiene a: proteína de unión a maltosa (MBP) y GST, que pueden ser usado para purificar las proteínas fusionadas mediante cromatografía de afinidad. MBP está presente en la serie de vectores pMAL mientras que GST está presente en la serie de vectores pGEX (53).

Para realizar estudios bioquímicos o estructurales con la proteína recombinante es necesario remover las etiquetas, para que no interfiera con las estructura o actividad de la proteína. Las etiquetas pueden ser removidas por acción enzimática o química. En el caso de la remoción con enzimas, el vector de expresión posee secuencias que codifican para el sitio de escisión o corte de la enzima *downstream* del gen que codifica para la etiqueta. En el caso de la remoción química, se puede tratar a la proteína recombinante con un reactivo químico (53).

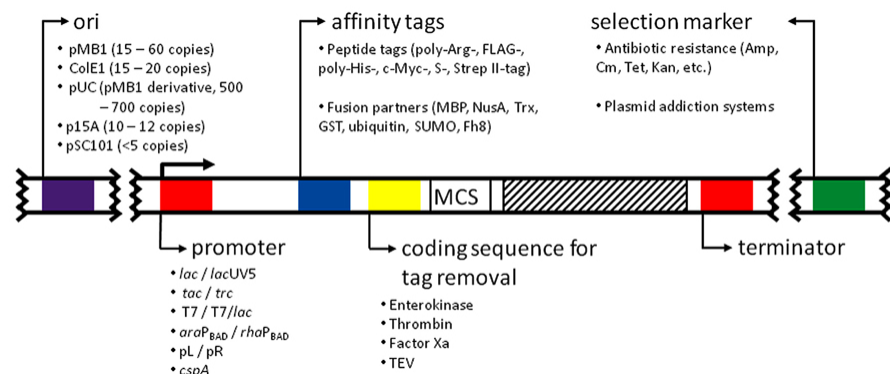


Figura I-21. Componentes de un vector de expresión.

[Fuente: Rosano & Ceccarelli 2014(53)].

Hospedador

La cepa de *E. coli* utilizada como hospedador es la BL21 y algunos derivados del linaje K12. Las células BL21 son deficientes de la proteasa Lon que degrada varias proteínas extrañas. Otro gen ausente en el genoma de los ancestros de BL21 es el gen que codifica la proteasa de la membrana externa OmpT cuya función es degradar las proteínas extracelulares. Cuando el gen de interés se coloca en un vector que tiene promotor T7, el hospedador debe proporcionar T7 RNAP, en estos casos se trabaja con la cepa BL21 (DE3) que tiene el profago λ DE3 en el cromosoma de BL21 y contiene el gen *T7 RNAP* bajo el promotor lacUV5. Otra cepa utilizada es BL21 (DE3) pLysS, esta cepa contiene el plásmido pLysS que confiere resistencia a cloranfenicol, además contiene el gen que codifica a la lisozima T7 que disminuye el nivel de expresión de fondo (basal) de los genes diana bajo el control del promotor T7 pero no interfiere con el nivel de expresión logrado tras la inducción con IPTG (54).

Consideraciones para trabajar con el vector de expresión pGEX

Las proteínas con etiqueta GST son construidas al insertar un gen en el sitio de clonamiento múltiple de uno de los 13 vectores pGEX. El promotor *tac* controla la expresión, y es inducida por el análogo de lactosa IPTG. Los vectores pGEX tienen un gen *lacI^q* cuyo producto es una proteína represora que se une a la región del operador del promotor *tac*, y previene la expresión hasta la inducción por IPTG. El vector pGEX-6P-1 codifica una secuencia de reconocimiento para el sitio específico de escisión por una proteasa *PreScission* ubicada entre el dominio GST

y el sitio de clonamiento múltiple. En cuanto al hospedador, se recomienda cepas de *E. coli* deficiente de genes que codifican proteasas citoplasmáticas tales como Lon, OmpT, DegP o HtpR, que ayudan a minimizar los efectos de la degradación proteolítica por el hospedador. *E. coli* B121, es una cepa defectiva en la producción de la proteasa OmpT, dando altos niveles de expresión de proteínas con etiquetas GST. También se recomienda usar una cepa alternativa para el clonamiento y mantenimiento del vector, por ejemplo, JM109 o DH5 α . En cuanto al inserto de DNA, debe poseer el marco abierto de lectura y debe ser menos que 2kb de longitud. Si el inserto ha sido subclonado en otro vector o si ha sido amplificado por PCR, el inserto debe tener los extremos compatibles con los extremos del vector linealizado. Se recomienda usar dos diferentes enzimas de restricción que permitirá la clonación direccional del inserto en el vector. La clonación direccional optimizará las inserciones en la orientación correcta (55).

1.2.10. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONEJOS

Una manera de identificar proteínas de interés es el uso de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales son heterogéneos y se unen a diferentes epítopos del antígeno proteico. A pesar, de que esto pueda disminuir la especificidad e incrementar las reacciones no específicas, estos anticuerpos tienen mayor probabilidad de unirse con éxito al antígeno específico en una variedad de técnicas que tienen condiciones diferentes. El conejo es el animal de laboratorio que se usa con frecuencia para la producción de los anticuerpos policlonales debido a que ofrece muchas ventajas comparadas a otras especies (56).

Dosis del inmunógeno

Un inmunógeno es una molécula capaz de generar una respuesta inmune cuando es inyectado en un animal. Ejemplo de inmunógeno son los polipéptidos que tienen pesos moleculares por encima de 10 kDa. El conejo es capaz de montar una respuesta de anticuerpos a múltiples inmunógenos simultáneamente. La dosis de inmunógeno puede afectar el nivel de la respuesta de anticuerpos (cantidad) y la afinidad del anticuerpo producido (calidad). La dosis muy baja del inmunógeno puede ser no adecuado para estimular la producción de anticuerpos, aunque pueden dar como resultado la producción de células B de memoria que pueden ser estimuladas por una exposición secundaria al inmunógeno. Mientras que, una dosis excesiva de inmunógeno puede ocasionar la producción de anticuerpos de baja afinidad o el desarrollo de tolerancia sin producción de anticuerpos. La dosis del inmunógeno es generalmente estimada en base a la experiencia del investigador o referencias en la literatura en la que utilizan compuestos similares. Generalmente,

100 a 250 μg de proteínas en adyuvante son adecuados para producir una respuesta con altos títulos de anticuerpos en conejos (56).

Ruta de inmunización

La ruta de inmunización, en gran parte, determina la distribución y presentación del inmunógeno y tiene un efecto sobre la respuesta inmune. La ruta ideal de inmunización debe resultar en la exposición del antígeno a un gran número de células presentadoras de antígenos. Además, el sitio de inmunización debe elegirse de manera que la reacción inflamatoria al inmunógeno/adyuvante genere el mínimo deterioro funcional, mínimo dolor o angustia en el animal huésped. Las rutas primarias de inmunización en conejos son: subcutáneo, intradérmica, transdérmica e intramuscular. La inyección subcutánea del inmunógeno-adyuvante, técnicamente es fácil de realizar en conejos y permite la inyección de grandes volúmenes de inmunógeno/adyuvante. La inyección se realiza en la zona dorsal de la espalda del conejo con un volumen máximo de 0.25 ml de emulsión de agua en aceite por sitio y 1 ml de volumen total (56).

Esquema de inmunización

La frecuencia de re - inmunización o refuerzos es una variable significativa en la producción de anticuerpos policlonales. El objetivo del refuerzo es re - estimular el sistema inmune e incrementar los niveles de anticuerpos en la circulación. El refuerzo debe administrarse después de que el nivel de inmunógeno inicial haya desaparecido (es decir, cuando los títulos de anticuerpos hayan

disminuido de manera apreciable), lo que permite la selección de células B que producen anticuerpos de mayor afinidad por el antígeno. Las inyecciones de refuerzo en el momento apropiado estimulan la expansión de las células B de memoria de alta afinidad, lo que resulta en la producción de altos niveles de anticuerpos de alta afinidad (56).

Adyuvante

Los adyuvantes se definen como compuestos que aumentan la respuesta inmunológica a un inmunógeno. Las proteínas purificadas son inmunógenos pobres y rara vez dan como resultado una respuesta inmune robusta cuando se inyectan sin un adyuvante. Uno de los requisitos previos para una buena respuesta inmune a un antígeno es una respuesta inflamatoria. La inflamación da como resultado el reclutamiento de células inflamatorias y activación de macrófagos y células dendríticas, un componente esencial en el desarrollo de una respuesta inmune. El adyuvante completo de Freund sigue siendo el adyuvante más utilizado y efectivo para la producción de anticuerpos policlonales, y está compuesto de aceite mineral, monooleato (surfactante) y micobacterias muertas por calor, se usan en la inmunización inicial. El adyuvante incompleto de Freund carece de las micobacterias y son usadas para los refuerzos. Los adyuvantes de Freund actuales son más refinados y menos tóxicos que las formulaciones originales. Ambos son emulsiones de agua en aceite, y cuando son preparados apropiadamente, liberan lentamente sus inmunógenos durante muchas semanas (56).

1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NCC es una enfermedad causada por el desarrollo del cisticerco de *T. solium* en el cerebro. Es un problema de salud pública en países endémicos de América Latina, en especial en áreas rurales de México y Perú donde es considerado como la causa principal de epilepsia (20,57,58). Partes de África y Asia también son severamente afectados por esta enfermedad, así mismo también se reportan casos en países no endémicos debido a la migración de personas provenientes de zonas endémicas, por ejemplo, en Estados Unidos se reporta que el número de muertes y la carga total de hospitalización relacionado a la enfermedad hace de la NCC un gran problema de salud, especialmente entre la población hispana (59,60). El 50 a 70% de todos los pacientes con NCC presentan convulsiones y es la causa principal de la aparición de ataques epilépticos en personas mayores de 25 años en países donde la infección por *T. solium* es endémica (61).

En Perú, se ha llevado a cabo una serie de estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de la cisticercosis, los estudios se basaron en el uso de la técnica del western blot demostrando seroprevalencias basales de 10 y 20% en la población general. Los valores son dos a tres veces más altos en personas con epilepsia confirmando el rol de la NCC en la etiología de la epilepsia en zonas endémicas (28). Se estima que las zonas del Perú claramente endémicas para NCC son la sierra, la costa norte y la selva alta (28). En la región norte del Perú, se ha reportado que las personas con epilepsia el 39% presentan NCC sugiriendo que la NCC es un factor contribuidor de epilepsia (62).

El diagnóstico de la NCC se basa principalmente en el resultado de la neuroimagen el cual es apoyado por el LLGP-EITB para la detección de anticuerpos anti-cisticerco. La sensibilidad y especificidad reportada para la LLGP-EITB es 98 % y 100% respectivamente (7). Esta técnica ha sido usada junto con la neuroimagen en varios estudios epidemiológicos (15,63–69), en los cuales se evidenció que la sensibilidad de esta prueba varía en cada estudio(35% a 60%). Así mismo, se ha reportado que la sensibilidad de esta prueba depende del número y estado del cisticerco en el cerebro, generalmente la sensibilidad es baja (28%) en muestras de pacientes que presentan 1 cisticerco viable o calcificado en el cerebro (8).

Frente a esta problemática, y al hecho de que el procedimiento para realizar esta prueba resulta laboriosa (sobre todo en la obtención de las glicoproteínas del cisticerco), se han reportado varios estudios en donde evalúan otros antígenos nativos (70–76) o recombinantes (77–84) del cisticerco de *T. solium* e incluso antígenos del cisticerco de otras especies de *Taenia* como *T. cracciceps* (85–87) y *T. saginata* (88–90), algunos de estos estudios reportan una sensibilidad similar al LLGP-EITB, pero aún no han sido validados en campo, salvo algunos estudios como el realizado por Arora et al., 2020 (91) en donde evaluaron el Western blot usando proteínas del fluido vesicular del cisticerco de *T. solium* en una población rural endémica del norte de la India, obteniendo una sensibilidad del 91.5% y especificidad del 91.6%.

Si bien algunas de estas pruebas (dependiendo del tipo de antígeno usado) reportan una sensibilidad similar al EITB, el problema ahora surge con la especificidad, que en el caso del LLGP-EITB evaluado en campo esta puede variar desde 57.9% hasta el 100 % (15,67). Motivo por el cual, hasta la actualidad se

siguen realizando estudios para identificar antígenos que puedan incrementar la capacidad de diagnóstico del western blot.

Hace unos años, se ha reportado la obtención *in vitro* de estadios intermedios entre oncósfera y cisticerco de *T. solium* denominados como formas o estadios postoncosferales (17). Las bandas proteicas de estas formas intermedias son reconocidas por el suero de pacientes con NCC (9), pero aún no se conoce que proteínas están presentes en estas bandas proteicas y su utilidad en el diagnóstico de la cisticercosis y tampoco se conoce la función o localización de estas proteínas en las postoncosferas. Caracterizar las proteínas de los estadios PO nos ayudarían a responder la siguiente pregunta de investigación:

¿Los antígenos de los estadios postoncosferales de *T. solium* serán útiles para el diagnóstico inmunológico de la NCC?

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Este trabajo de investigación se realizó con la finalidad de caracterizar los antígenos de los estadios postoncosferales de *T. solium* que son reconocidos por anticuerpos de pacientes con NCC. Caracterizar las proteínas de los estadios postoncosferales permitirá identificar las proteínas candidatas para el diagnóstico de la NCC, así mismo permitirá identificar proteínas que participan en la interacción hospedero-parásito.

En base a las proteínas identificadas se pueden obtener proteínas recombinantes para estudiar la localización y función de la proteína para comprender los mecanismos que utiliza el estadio de postoncosfera para evadir la respuesta inmune y establecerse en el tejido del hospedero para completar su desarrollo hasta cisticerco y causar NCC. Además, se pueden identificar antígenos blancos para el desarrollo de vacunas que actúen a nivel de estas proteínas y así eviten el desarrollo de la enfermedad.

Finalmente, de encontrarse proteínas candidatas para el diagnóstico de NCC, se podrían obtener proteínas recombinantes para ser usados en el diagnóstico de esta enfermedad en zonas endémicas de NCC donde las técnicas de neuroimagen son muy costosas e inaccesibles para la población rural.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo del primer estudio

Realizar una revisión sistemática y un metaanálisis de la sensibilidad y especificidad del western blot para el inmunodiagnóstico de la NCC.

2.2. Objetivos del segundo estudio

Objetivo principal

Caracterizar las proteínas de los estadios postoncosferales de *T. solium* que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC.

Objetivos específicos

- Detectar bandas antigénicas de los estadios postoncosferales de *T. solium* reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC mediante western blot.
- Evaluar la utilidad de las proteínas de los estadios postoncosferales de *T. solium* en el inmunodiagnóstico de la NCC.
- Evaluar la respuesta inmune humoral contra las proteínas de los estadios postoncosferales de *T. solium* en un modelo animal de NCC.
- Identificar las proteínas de los estadios postoncosferales de *T. solium* reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC mediante espectrometría de masas.
- Localizar las proteínas identificadas por espectrometría de masas en las postoncosferas de *T. solium* mediante la obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y anticuerpos policlonales.

III. METODOLOGIA

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- **Parásitos:** estadios adultos de *Taenia* en medio de transporte (25% de glicerol, 1000 UI/mL de penicilina, 1mg/mL de estreptomicina, 0.2 mg/mL de gentamicina, 0.025 mg/mL de anfotericina B), donado por el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI)-LID-Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).
- **Células:** Tubo criovial conteniendo células humanas de adenocarcinoma intestinal (HCT-8) compradas de la ATCC (*American Type Culture Collection*), células competentes DH5 α compradas de Invitrogen, y células BL21 (DE3) plysS donados por el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular-LID-UPCH.
- **Sueros:** Sueros de humanos con y sin neurocisticercosis donados por el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas. Unidad de Cisticercosis. Lima, Perú; Suero de conejo antiproteína recombinante Enolasa de *T. solium* obtenido por Ponce et al., 2018 (92), donado por el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular-LID-UPCH.

3.2. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

3.2.1. PRIMER ESTUDIO: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL WESTERN BLOT PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO DE LA NCC

3.2.1.1. Estrategia de búsqueda de artículos

La revisión sistemática fue realizada de acuerdo con la declaración PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses*) (93). La búsqueda de literatura se realizó en inglés, español y francés usando las bases de datos electrónicos Medline/Pubmed, Scopus y Google scholar, hasta mayo del 2020. Para la búsqueda se empleó el término MeSH (*Medical Subject Heading*) y los operadores booleanos: “Diagnosis” AND “Neurocysticercosis”. Otras palabras claves también fueron usados (Anexo 1.1).

3.2.1.2. Selección de artículos

Los artículos fueron explorados primero por título y resumen para seleccionar los estudios relevantes. Luego se realizó la selección de los artículos completos considerando los siguientes criterios de inclusión: 1) estudios epidemiológicos y de laboratorio en el cual usan el EITB o western blot (WB) para el inmunodiagnóstico de la NCC; 2) artículos en los cuales analizan muestras de suero de personas con NCC confirmado por estudios de neuroimagen o biopsia; 3) estudios en los cuales analizan muestras de suero de personas sin NCC (presencia de un grupo control); 4) estudios que tienen datos para calcular la sensibilidad y

especificidad de la prueba; 5) Estudios que usen EITB o WB para la detección de anticuerpos IgG; 6) Estudios que usen antígenos de *T. solium* en el EITB o WB.

Los criterios de exclusión fueron: 1) estudios que usan otras pruebas diferentes al EITB o WB para el diagnóstico de NCC; 2) estudios de cisticercosis porcina; 3) estudios en la cual usaron muestra de líquido cefalorraquídeo, saliva u orina; 4) estudios en la cual utilizan el EITB o WB para la detección de anticuerpos IgA o IgG; 5) estudios que usen antígenos de *T. saginata*, *T. crassiceps* o *T. pisiformis* en EITB o WB; 6) casos clínicos; 7) artículos de revisión, libros y cartas al editor sin datos originales; 8) resúmenes de conferencias debido a que es poco probable que tengan detalles suficientes acerca de la metodología usada; 9) EITB o WB usados para confirmar el resultado del ELISA.

3.2.1.3. Definiciones

Todos los artículos seleccionados incluyeron muestras de personas con NCC diagnosticados en base al criterio absoluto (demostración histológica del cisticercos a partir de una biopsia de cerebro) o al criterio de neuroimagen (5). En base a estos datos se realizó una recategorización en 6 grupos:

NCC activa: incluye estudios que reportan casos de NCC activa (63,65,67,94), en este grupo también se incluyó estudios que reportan pacientes con NCC transicional, pacientes sin calcificaciones (por ejemplo: pacientes con quiste único viable o quistes múltiples viables) (14,65,95).

NCC inactiva: incluye estudios que reportan casos de NCC inactiva (63,65,67,96), y estudios donde incluyeron pacientes con calcificaciones únicas o múltiples, o lesión calcificada única o múltiple (14,15,64,95).

Quiste único: en este grupo se incluyó estudios que reportan casos de NCC con un quiste, un quiste viable con o sin escólex, una calcificación, una lesión quística, o un granuloma que quiste único (14,63,64,67,94–99).

Múltiples quistes: en este grupo se incluyó estudios que reportan NCC con múltiples quistes, múltiples quistes viables con o sin escólex, múltiples quistes viables o un quiste racemoso, más de una calcificación, o más de una lesión activa (14,63,64,67,94–99).

Quiste viable único: en este grupo se consideró a aquellos artículos que reportan NCC con quiste único (no calcificado), un quiste viable con o sin escólex (14,67,94,95,97,99).

Múltiples quistes viables: se incluyó estudios que reportan NCC con múltiples quistes (no calcificados), múltiples quistes viables con o sin escólex, múltiples quistes viables o un quiste racemoso (14,94,95,97,99).

3.2.1.4. Extracción de datos y evaluación de la calidad

Se colectó los siguientes datos de cada artículo: autor (s), año de publicación, tipo de estudio (epidemiológico o de laboratorio), procedencia de la muestra de sueros, número de sueros de pacientes con NCC, método de diagnóstico de NCC, número de sueros control, tipo de antígeno usado en el western blot, datos

de la neuroimagen. Para cada estudio, se evaluó el riesgo de sesgo (*risk of bias*) y la aplicabilidad (*Applicability concerns*) usando la herramienta QUADAS-2 (100).

3.2.1.5. Análisis estadístico

Para el metaanálisis se siguió las recomendaciones del Manual Cochrane para revisiones sistemáticas de validez de las pruebas de diagnóstico (101). Los datos fueron reportados en tablas 2x2 para calcular la sensibilidad y especificidad estimada e intervalos de confianza (IC) del 95% de los estudios originales. Las estimaciones de la sensibilidad y especificidad observada fueron presentadas en una gráfica de *forest plot*.

En el metaanálisis, se utilizó el modelo jerárquico a fin de preservar la naturaleza bidimensional de la precisión del diagnóstico, ya que la sensibilidad y la especificidad generalmente están correlacionadas (102). Se utilizó el modelo de efectos aleatorios, bivariante para obtener estimaciones resumidas de la sensibilidad y especificidad y su IC del 95% (103). Para obtener la curva de resumen ROC basado en el modelo jerárquico se usó el modelo HSROC (*The hierarchical summary receiver operating characteristic*) (104). Los gráficos muestran las curvas de resumen ROC, resumen de los puntos de sensibilidad y especificidad con sus regiones de confianza y predicción del 95%. La región de predicción proporciona una representación visual del grado de heterogeneidad entre estudios (105).

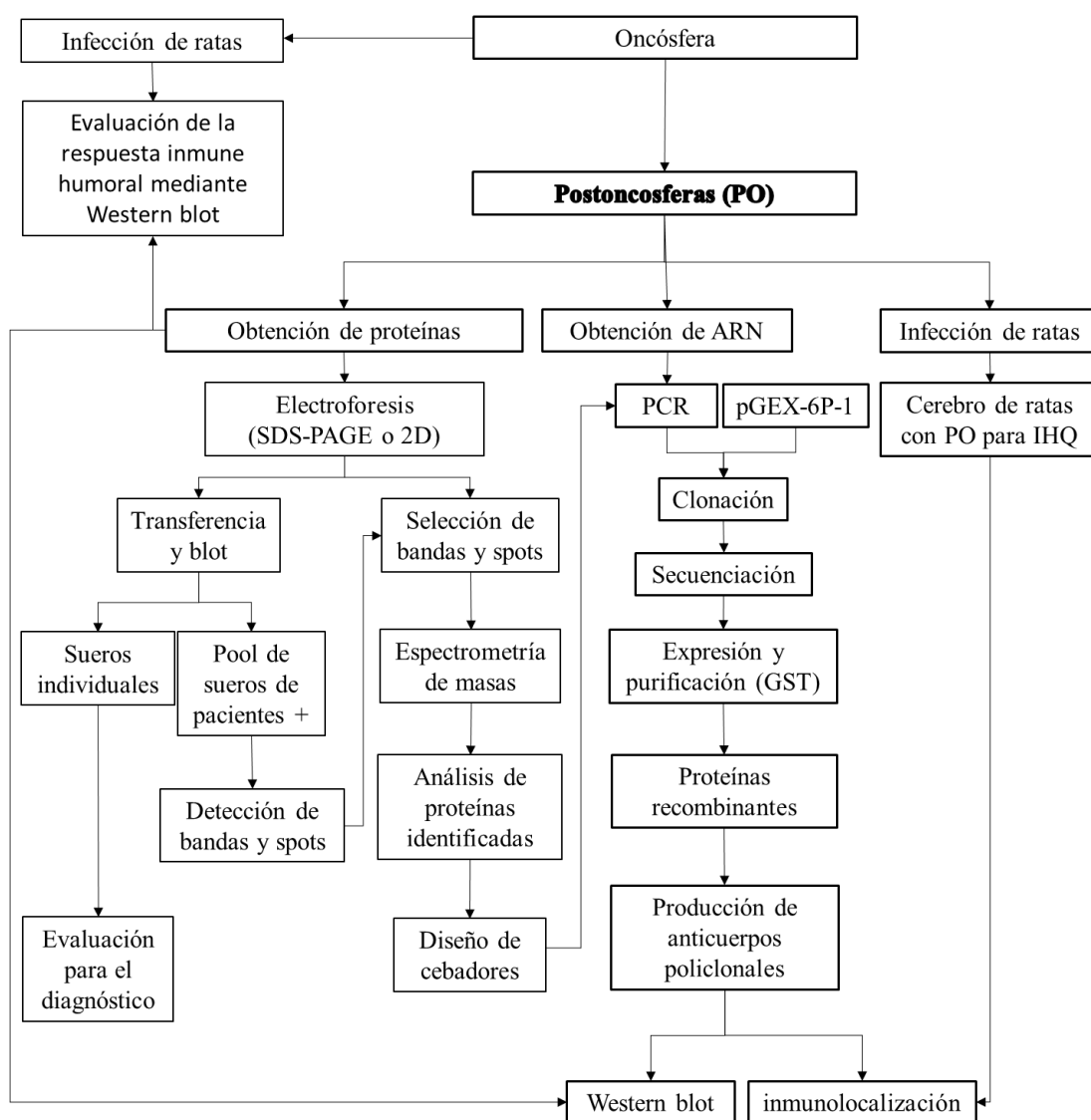
Para el análisis por el tipo de antígeno usado en el western blot, se categorizó los tipos de antígenos en 3 grupos: glicoproteínas purificadas con lentin lectin (LLGP) u otro procedimiento, antígeno recombinante y otros antígenos (ejemplo:

antígeno purificado, E/S, fluido vesicular, etc.). En el caso de que un estudio evaluó diferentes antígenos de la misma categoría, solo se consideró el que presenta una alta sensibilidad y especificidad. El resumen de la sensibilidad y especificidad fue reportado para cada categoría de antígeno. Así mismo, también se hizo un subanálisis basado en el tipo de estudio (epidemiológico y de laboratorio) y en las categorías (NCC activa/inactiva, NCC con quiste único/múltiples quistes, y NCC con quiste único viable/múltiples quistes viables) el resumen de la sensibilidad y especificidad fueron reportadas para cada grupo.

Los análisis fueron realizados usando el software Meta-DiSc versión 1.4 (106) y el software estadístico Stata versión 11.1, paquete: metandi (109).

3.2.2. SEGUNDO ESTUDIO: CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTADIOS POSTONCOSFERALES RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON NCC.

Estrategia experimental



3.2.2.1. Detección de bandas antigénicas de los estadios postoncosferales de *T. solium* reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC

Para detectar las proteínas de los estadios postoncosferales de *T. solium* que son reconocidos por anticuerpos de pacientes con NCC, se siguió los siguientes pasos.

A. Obtención de estadios postoncosferales

Para obtener estadios postoncosferales se utilizó gusanos adultos de *T. solium*, de los cuales se extrajo los huevos que contienen oncosferas, las oncosferas fueron activadas y cultivadas en una monocapa de células HCT-8.

Obtención de estadios adultos de *T. solium*. Los estadios adultos de *Taenia* donados por el LIEI-LID-UPCH, fueron confirmados como *T. solium* utilizando la técnica de PCR-REA reportado por Mayta et al. (108). Una vez confirmado, se procedió a seleccionar las proglótides grávidas.

Obtención de oncosferas activadas. Para la obtención de oncosferas se siguió la metodología reportada por Verástegui *et al.*, 2007 (23). Las proglótides grávidas fueron trituradas en agua destilada usando un homogenizador de vidrio, luego se colectó el sobrenadante que contiene los huevos. Los huevos fueron tratados con hipoclorito de sodio al 0.75% durante 5-10 minutos con la finalidad de romper la envoltura del huevo y liberar la oncósfera, seguidamente, las oncósferas fueron activadas en un medio intestinal artificial pH 8.04 (1% de bilis de cerdo, 0.01 g/mL de pancreatina, 0.002g/mL de carbonato de sodio, 0.01g/mL de bicarbonato de sodio, preparado en medio RPMI [10.4g/L de RPMI 1640, 1.5g/L de bicarbonato de sodio, 5.9g/L de hepes, 1000UI/mL de penicilina, 0.2mg/mL de gentamicina])

durante 1 hora a 37°C. Las oncósferas activadas fueron contadas, lavadas 2 veces con medio RPMI y resuspendidas en medio RPMI más 10 % de suero fetal bovino (RPMI-10%SFB).

Obtención de monocapa de células HCT-8. Las células de adenocarcinoma intestinal HCT-8 fueron descongeladas, lavadas y cultivadas en frascos de 75 cm² conteniendo 5 mL de medio RPMI-10%SFB; e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa (HR) hasta alcanzar confluencia (~95%). Una vez alcanzado la confluencia, se procedió a la tripsinización, las células fueron desprendidas del frasco mediante incubación a 37°C con 1 ml de tripsina-EDTA. Luego se realizó el conteo de células en una cámara neubauer. Las células fueron colocadas en una placa de 24 pozos (1x10⁵ células por pozo) e incubadas a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de HR hasta formar una monocapa de células en cada pozo.

Cultivo de oncosferas en monocapa de células HCT-8. Para la obtención de postoncosferas se siguió el protocolo reportado por Chile *et al.* (17). 10 000 oncosferas activadas fueron colocadas en placas de 24 pozos conteniendo monocapa de células HCT-8. Las placas fueron incubadas durante 15 días a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de HR, y el cambio de medio del cultivo se realizó cada 3 días. Después de los 15 días de cultivo las postoncosferas fueron trasladadas a una nueva monocapa de células HCT-8, y fueron incubadas durante 45 días adicionales, en este periodo de tiempo, el cambio de medio y monocapa se realizó cada 3 días.

B. Obtención de proteínas de los estadios postoncosferales

Proteínas solubles totales. A partir del cultivo, las postoncosferas fueron colectados en tubos de 1.5 ml a los 15, 30 y 60 días de incubación, a estas postoncosferas se les denominó como PO15d, PO30d y PO60d respectivamente. Seguidamente fueron lavados 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) (cada lavado consistió en dejar sedimentar por gravedad los parásitos durante 10 minutos en el tubo de 1.5 ml, luego se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se agregó 1 ml de PBS). Las postoncosferas fueron resuspendidas en PBS y sonicadas a 4.5Hz, 9-12W durante 30 segundos. El sonicado de parásitos fue centrifugado a 10000g durante 15 minutos a 4°C, seguidamente se colectó el sobrenadante (considerado como proteínas solubles totales). Se obtuvo proteínas solubles totales de PO15d, PO30d y PO60d.

Proteínas excretorio secretorio. También se colecto proteínas E/S de postoncosferas de 30 días de cultivo, de la siguiente manera: los parásitos fueron colectados de la monocapa de célula HCT-8 y lavados 3 veces con medio RPMI, luego fueron colocados en una placa de 24 pozos libre de monocapa en incubados con medio RPMI durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Después de la incubación, el medio del cultivo fue colectado y centrifugado a 2700 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue utilizado como proteínas E/S. A ambos tipos de proteínas obtenidas se les agregó inhibidores de proteasas: 1 µg/mL de Leupeptina (Sigma Aldrich), 1mM de Pefabloc SC PLUS (Roche) y 1 µg/mL de Pepstatina (Sigma Aldrich). Se retiró 5 µL de cada muestra para realizar la cuantificación y el resto fue congelado a -70°C hasta su posterior uso.

Cuantificación de proteínas. Las proteínas fueron cuantificadas utilizando el espectrómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) (109) . Se colocó 2 µl de muestra de las proteínas en el pedestal del equipo, la lectura se realizó usando la opción “Protein A280”, “Type: 1 Abs=1mg/mL”. Las lecturas se realizaron por duplicado.

C. Obtención de anticuerpos policlonales anti – postoncosfera

Se obtuvo anticuerpos policlonales mediante inmunización de conejos, este procedimiento fue realizado con el objetivo de identificar proteínas antigénicas en los estadios postoncosferales. Se usó la metodología reportada por Verastegui et al., 2007 (23).

Inmunización de conejos. Tres conejos hembras, raza Nueva Zelanda de 2kg, comprados del Instituto Nacional de Salud fueron trasladado al bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las dos primeras semanas los animales estuvieron en un periodo de adaptación; pasado este tiempo, se realizó la extracción de sangre (500 µl aproximadamente) de la arteria central de la oreja del conejo de la siguiente manera: se desinfectó la oreja con alcohol al 70%, seguidamente se le aplicó lidocaína en gel y se esperó 15 minutos, seguidamente se insertó una aguja de 23G en la arteria central de la oreja y se colectó la sangre en un tubo de 1.5 mL. Después de la toma de muestra de sangre, se procedió a la inmunización de los conejos (el primer, segundo y tercer conejo fue inmunizado con proteínas solubles totales de PO15d,

PO30d y PO60d respectivamente). Para la inmunización se preparó un inóculo de 500 µl de proteína (0.5mg/ml) + 500 µl de adyuvante de Freund (adyuvante de Freud completo para la primera inmunización y adyuvante de Freud incompleto para las siguientes inmunizaciones), seguidamente se desinfectó el sitio de inoculación con alcohol al 70%, y se le inyectó subcutáneamente el inóculo. El conejo recibió 4 dosis del inóculo (día 1, 15, 22 y 29). La muestra de sangre fue recolectada previo a cada inoculación para medir los títulos de anticuerpos (Anexo 3). Al final del experimento se realizó la eutanasia de los animales para el sangrado total y obtención de suero que contiene los anticuerpos policlonales.

Eutanasia. La eutanasia se realizó con el objetivo de coleccionar la mayor cantidad de muestra de sangre y obtener el suero necesario para las diferentes técnicas que se realizarán. El método que se utilizó fue eutanasia por agentes inyectables, para lo cual el animal fue previamente anestesiado de la siguiente manera: el animal fue sujetado con delicadeza y se le administró una combinación de Xilacina y Ketamina de 40mg/kg y 60mg/kg respectivamente. Cuando el animal se encontró en plano quirúrgico se procedió a la extracción de sangre por punción cardiaca mediante introducción de una aguja de 21' y se colectó la sangre con sistema Vacutainer en tubos de 10 ml. Una vez colectada la mayor cantidad de sangre, se procedió a la eutanasia para lo cual se inyectó pentobarbital sódico 20mg/kg por vía intracardiaca. El cese de la respiración, del latido cardiaco y la ausencia de reflejos nos indicaron la muerte irreversible de los conejos. Luego se procedió al descarte: autoclavado y eliminación a través de DISAL.

ELISA. La muestra de sangre colectada de los conejos (antes de cada inmunización y del sangrado total) fue centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos, luego se colectó el suero el cual fue almacenado a -70°C hasta su posterior uso. Para la medición de títulos de anticuerpos policlonales se realizó la técnica de ELISA, el cual consistió en fijar 100 μl de proteínas solubles totales (0.5 mg/ml) de postoncosfera en placas de 96 pozos durante toda la noche a 4°C , luego se realizó 5 lavados con 200 μl de PBS-0.05% de Tween20 (PBS-T), seguidamente se procedió a bloquear la placa con 200 μl PBS-T más 5% de leche durante 1 hora a 37°C . Terminado el tiempo de incubación, se repitió el lavado y se incubó por 1 hora (a 37°C) con 100 μl de suero de conejo (pre-inmune, 1era dosis, 2da dosis, 3era y 4ta dosis) diluido en PBS-T (1:500), luego se repitió el lavado y se incubó durante 1 hora (a 37°C) con 100 μl de conjugado cabra anti- conejo marcado con peroxidasa diluido en PBS-T hora a 37°C (dilución 1:10000), se volvió a lavar y a revelar con 100 μl de sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) durante 3 minutos, luego se detuvo la reacción con 50 μl de ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia (450nm) en el lector de ELISA.

D. Western blot para detectar proteínas antigénicas de postoncosfera

Para identificar las proteínas antigénicas de las postoncosferas, se utilizó la técnica de Western blot. En el primer experimento se utilizó diferentes concentraciones de proteínas solubles totales de postoncosferas de 15, 30 y 60 días de cultivo, para determinar la concentración ideal de proteínas que son reconocidas por los anticuerpos policlonales producidos en conejo. El segundo experimento consistió en comparar las proteínas solubles totales (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de oncosferas,

postoncosferas y cisticercos, con el objetivo de identificar proteínas específicas de los estadios postoncosferales.

Preparación de la muestra. Por cada 100 μ l de proteína se le agregó 2 μ l del buffer para muestra (10% de SDS más 0.1% de azul de bromofenol (1:1)). Seguidamente la mezcla fue colocada en baño María a 65 °C durante 15 minutos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Para la SDS-PAGE se preparó geles de poliacrilamida, cada gel está formado por un gel de separación al 15% (para 1 gel: 1.1 mL de agua ultrapura; 2.5mL de la mezcla de acrilamida al 30%; 1.3 de buffer Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8; 0.05 mL de SDS al 10%; 0.05mL de persulfato de amonio [APS] al 10%; 0.002 mL de TEMED) continuado por el gel de apilamiento al 5% (para 1 gel: 0.68 mL de agua ultrapura; 0.17 mL de la mezcla de acrilamida al 30%; 0.13 de buffer Tris-HCl 1M, pH 6.8; 0.01 mL de SDS al 10%; 0.01mL de APS al 10%; 0.001 mL de TEMED). El gel de apilamiento tiene 10 pozos para colocar las muestras. 20 μ l de la muestra fue colocado en cada pozo del gel de apilamiento, paralelo a las muestras también se agregó un marcador de peso molecular en uno de los pozos; luego se procedió a realizar la corrida electroforética en una cámara conteniendo buffer Tris-glicina-SDS (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0.1% de SDS). La cámara fue conectada a una fuente de poder y se realizó la separación de las proteínas bajo las siguientes condiciones de corrida: 5 mA/gel para alinear la muestra y/o marcadores de peso molecular en el gel de apilamiento y luego se cambió a 25mA/gel para la separación proteínas en el gel de separación.

Transferencia: Se retiró los geles de la cámara de electroforesis, luego se removió el gel de apilamiento. El gel de separación fue colocado sobre una membrana de

nitrocelulosa que tiene el mismo tamaño del gel; seguidamente ambos fueron colocados entre 2 papeles filtro y 2 esponjas a manera de un sándwich, este sándwich fue colocado en una cámara de transferencia conteniendo buffer de transferencia, la cámara fue conectada a una fuente de poder bajo las siguientes condiciones de transferencia: 350 mA durante 1 hora.

Blot: Terminada la transferencia de proteínas del gel hacia la membrana de nitrocelulosa, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS más 0.3% de Tween20. Una de las membranas fue incubada durante toda la noche con el suero de conejo anti – postoncosfera (dilución: 1 en 200 con PBS 0.3% de Tween20 más 5% de leche). Otra membrana fue incubada con suero de conejo pre inmune (dilución: 1 en 200). Después de la incubación, las membranas fueron lavadas 6 veces con PBS más 0.3% de Tween20 e incubadas con el conjugado (cabra anti-conejo marcado con peroxidasa, dilución 1 en 800) durante 1 hora. Las membranas fueron lavadas 6 veces y reveladas con el sustrato diaminobencidina (DAB) (50 mL de PBS, 500 µL de DAB, 5 µL de peróxido de hidrógeno) hasta que se visualicen las bandas. El peso molecular de las bandas proteicas fue estimado usando un marcador de peso molecular.

E. Western blot para detectar proteínas de postoncosfera reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC

Para la identificación de proteínas antigénicas reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC se utilizó la técnica de Western blot descrita anteriormente. Se realizó 2 experimentos:

Primer experimento. Se comparó las proteínas solubles totales ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de oncosferas, postoncosferas (PO15d, PO30d, PO60d) y cisticerco. Estas proteínas fueron separados por SDS-PAGE, luego fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. La primera membrana fue incubada con un pool de suero de pacientes con NCC (dilución 1 en 50) (el pool se realizó con 5 sueros de pacientes confirmados por neuroimagen y LLGP-EITB); y la segunda membrana fue incubada con un pool de sueros de personas sanas (negativos por neuroimagen y LLGP-EITB). Después de la incubación se lavó y se incubó con el conjugado (cabra anti - humano IgG marcado con peroxidasa) (dilución 1 en 4000), y se reveló con el sustrato DAB.

Segundo experimento. Se separó ($0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) las proteínas E/S de postoncosferas de 30 días (PO30d) por SDS-PAGE, seguido de la transferencia. Una membrana fue incubada toda la noche con el pool de sueros de pacientes con NCC (dilución 1 en 50) mientras que la segunda membrana fue incubada con el pool de sueros de personas sanas (dilución 1 en 50). Después de la incubación fueron lavados, e incubados durante 1 hora con el conjugado (cabra anti – humano IgG marcado con peroxidasa) dilución 1 en 4000. Seguidamente se lavó y reveló con el sustrato DAB.

3.2.2.2. Evaluación de la utilidad de las proteínas de los estadios postoncosferales en el diagnóstico inmunológico de la NCC

Como las proteínas de las formas postoncosferales son reconocidas por un pool de suero de pacientes con NCC, se evaluó su utilidad en el inmunodiagnóstico de la NCC. Para lo cual se utilizó el western blot o EITB (7) usando como antígenos las proteínas solubles totales de postoncosfera de 30 días de cultivo para detectar anticuerpos en los sueros de pacientes con NCC.

A. Información de los sueros

Se evaluaron 100 sueros, agrupados de la siguiente manera:

- **Grupo I (control):** conformado por 10 sueros de personas sin NCC, negativo por neuroimagen y LLGP-EITB.
- **Grupo II (casos con NCC parenquimatosa):** conformado por 50 sueros de pacientes que presentan entre 2 a 5 cisticercos en el parénquima cerebral, positivos al LLGP-EITB.
- **Grupo III (casos con NCC subaracnoidea):** conformado por 20 sueros de pacientes que presentan cisticercos en el espacio subaracnoideo, positivos al LLGP-EITB.
 - **Grupo IV (casos con quistes calcificados):** conformado por 20 sueros de pacientes que presentan cisticercos calcificados en el cerebro, negativos al LLGP-EITB.

B. Preparación de tiras con antígenos de postoncosfera

Para preparar las tiras con antígenos se procedió de la siguiente manera: 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas solubles de postoncosferas fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras en el sistema MiniPROTEAN Tetra cell (Bio-Rad). Se usaron geles de poliacrilamida al 15% que contienen el gel de apilamiento (al 5%) con 2 pozos: un pozo pequeño para el marcador de peso molecular (5 μL) y otro pozo de 67 mm de ancho y 8 mm de profundidad para la muestra; en este pozo se colocó 200 μl de las proteínas de postoncosferas. Después del SDS-PAGE se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS-0.3% de Tween20, y 2 veces con PBS solo, seguidamente cada membrana fue cortada en tiras de 3 mm de ancho usando la máquina *immuno strip membrane cutter*, obteniendo entre 20 a 22 tiras que contienen el antígeno de postoncosfera.

C. Evaluación de los sueros

La evaluación de los sueros se realizó en ciego. Cada tira fue incubada toda la noche con sueros individuales de pacientes con y sin NCC dilución 1 en 50 en PBS-0.3% Tween20 conteniendo 5% de leche descremada. Después de la incubación, las tiras fueron lavadas 6 veces con PBS-0.3% Tween20 e incubadas por 1 hora con el conjugado cabra anti - humano IgG marcada con peroxidasa (dilución 1 en 4000). Luego, las tiras fueron lavadas 3 veces con PBS-0.3% Tween20 y luego 3 veces con PBS solo. Finalmente, las tiras fueron reveladas con el sustrato DAB. La presencia de bandas en la tira se consideró como positivo mientras que la ausencia de bandas en la tira fue considerada como negativo.

3.2.2.3. Modelo animal de NCC para evaluar la respuesta inmune humoral contra las proteínas de postoncosferas

A. Infección de ratas

Se utilizó el modelo animal de NCC (34). Se realizaron 2 experimentos.

Infección con postoncosferas: se realizó con la finalidad de comprobar si las ratas eran capaces de formar anticuerpos contra las postoncosferas, para lo cual se infectaron 8 ratas de 15 días de edad (raza *Holtzman*) con 10 postoncosferas de 15 días de cultivo, la vía de infección fue intracraneal usando una jeringa de tuberculina, el volumen de inóculo fue de 50 µl. A los 15 días post infección se procedió al sacrificio de las ratas por eutanasia humanitaria, se colectó muestra de sangre para evaluar anticuerpos en el suero mediante western blot, luego se realizó la perfusión y obtención del cerebro para confirmar la infección.

Infección con oncosferas activadas: se realizó después de confirmar que las ratas son capaces de desarrollar anticuerpos contra postoncosferas. Este experimento se realizó con la finalidad de evaluar en qué momento de la infección aparecen los anticuerpos anti – postoncosfera y si estos persisten hasta el desarrollo de la NCC. Para este experimento se infectó vía intracraneal 9 ratas de 15 días de edad, la dosis fue de 500 oncósferas activadas de *T. solium* en 50 µl de solución salina. Además, 3 ratas adicionales fueron inoculadas con solución salina como control. Después de la infección se recolectó muestra de sangre de la cola a los 15 días, 1, 2, 4 y 6 meses para evaluar la formación de anticuerpos. Al año después de la infección, las ratas fueron sacrificadas mediante eutanasia humanitaria, luego se realizó la colección de sangre, perfusión y obtención del cerebro.

B. Eutanasia humanitaria

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (150mg/kg) y Xilacina (20 mg/kg) vía intraperitoneal. Luego se procedió a verificar que el animal se encuentre completamente anestesiado al presionar una de las patas traseras con una pinza, la ausencia de acto reflejo indicó la pérdida de sensibilidad. Luego se colectó la muestra de sangre mediante punción cardiaca en un tubo Vacutainer, seguidamente se realizó la perfusión con PBS (2 veces), y luego con paraformaldehído al 4% (1 vez). Después de la perfusión se procedió a remover el cerebro de las ratas, y colocarlos en un tubo de 50 ml conteniendo 10 ml de paraformaldehído al 4%.

C. Obtención de muestra de sangre

Durante la eutanasia se colectó muestra de sangre por punción cardiaca de ambos experimentos. En el segundo experimento además se colectó pequeños volúmenes de sangre usando el método de corte de la cola para obtener un volumen menor a 100 μ l; el protocolo consistió en inmovilizar al animal, calentar la cola con una bolsa térmica durante 10 minutos, luego se desinfectó la cola con etanol al 70% y se cortó perpendicularmente con una hoja de bisturí estéril (1-2 mm desde el extremo de la cola). Se recolectó la sangre en un tubo de 0.6 ml, y luego se aplicó hemostasia con un algodón durante 30 segundos. Las siguientes extracciones se realizaron a partir de la vena de la cola utilizando una jeringa. Las muestras de sangre fueron centrifugadas durante 15 minutos a 3500 rpm, luego se colectó el suero, el cual fue guardado a -70 °C hasta su posterior evaluación.

D. Evaluación de anticuerpos

El protocolo fue similar al utilizado en la evaluación de sueros humanos. La concentración de proteínas solubles totales de PO30d fue de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se utilizó 200 μL para la separación por SDS-PAGE, luego se realizó la transferencia a membranas, las cuales fueron cortadas en tiras de 3 mm de ancho. Cada tira fue incubada toda la noche con los sueros individuales de las ratas infectadas y ratas sanas (dilución 1 en 50), las tiras fueron lavadas e incubadas por 1 hora con el conjugado cabra anti- rata IgG marcada con peroxidasa (dilución 1 en 1000), luego fueron lavadas y reveladas con el sustrato DAB.

E. Procesamiento de los cerebros

Los cerebros colectados fueron lavados con agua destilada y almacenados en etanol al 70%. Los cerebros del primer experimento fueron colocados en parafina, y se realizó cortes coronales de 3 μm de grosor utilizando un micrótopo; luego se seleccionó cortes al azar, se desparafinó, se rehidrató y se coloreó con hematoxilina y eosina (34). Las láminas coloreadas fueron observadas en un microscopio para buscar los estadios postoncosferales. Los cerebros del segundo experimento fueron observados macroscópicamente para identificar cisticercos extra o intra parenquimales.

3.2.2.4. Identificación de proteínas de los estadios postoncosferales reconocidos por anticuerpos de pacientes con NCC

A. Identificación de proteínas de postoncosfera por SDS-PAGE y LC-MS/MS

Para identificar las proteínas presentes en las bandas de interés se procedió de la siguiente manera, las proteínas solubles totales y E/S de PO30d (12 ug) fueron separadas por SDS-PAGE. Uno de los geles con las proteínas fue teñido con azul de Coomassie G-250; el otro gel con proteínas fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, luego fue incubado con un pool de suero de pacientes con NCC o suero anti-postoncosfera para detectar la banda de 46 y 48 kDa. Una vez identificada la banda de 46 y 48 kDa, se procedió a cortar estas bandas a partir del gel teñido. Las bandas fueron colocadas en un tubo de 1.5 ml y se le agregó agua ultrapura, para luego ser enviados a la empresa Applied Biomics Inc. (Hayward, CA, USA) para su elución, digestión y separación por cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masa (LC-MS/MS), y su posterior análisis proteómico. El análisis proteómico realizado por la empresa consistió en buscar la similitud entre la secuencia de aminoácidos de los péptidos identificados por LC-MS/MS con las secuencias de las proteínas reportadas en la base de datos de secuencias primarias de *T. solium* y *Echinococcus granulosus*, para lo cual usaron el software MASCOT.

B. Identificación de proteínas de postoncosferas por electroforesis en 2D y MALDI-TOF/TOF

En este experimento se separó las proteínas de postoncosferas mediante electroforesis bidimensional (2D), luego se seleccionó las proteínas de interés para su identificación por MALDI-TOF/TOF.

Preparación de la muestra: las proteínas totales solubles fueron obtenidas como se describió previamente; luego fueron precipitadas con 3 volúmenes de acetona (previamente enfriado a -20°C) durante toda la noche a -20°C. Seguidamente se centrifugó a 10000g por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue rehidratado con la solución ReadyPREP2D (BIORAD), luego se realizó la cuantificación de las proteínas usando el kit 2-D Quant (GE Healthcare), para lo cual se siguió las recomendaciones del fabricante (110). La concentración que se utilizó fue de 75 µg de proteínas en un 125 µl de solución ReadyPREP2D.

Primera dimensión. La muestra de proteínas fue separada en base a su punto isoeléctrico usando el equipo de isoelectroenfoque PROTEAN IEF Cell (BIORAD). La muestra de proteínas (125 µl) fue colocada en una de las canaletas de la bandeja de enfoque del equipo, luego sobre la muestra se colocó una tira de IPG (gel con gradiente de pH (3-10) inmovilizado) de 7 cm (BIORAD). La bandeja fue colocada en el equipo de isoelectroenfoque, y se programó la corrida de la siguiente manera: 11 horas de rehidratación activa, 250V por 30 minutos, 500V por 1 hora, 1000V por 1 hora, 2000V por 2 horas, y 4000 V por 11 horas.

Segunda dimensión. Después del isoelectroenfoque, la tira de IPG fue retirada del equipo y fue colocada en un tubo de 15 mL. Luego se incubó primero con 5 mL de buffer de equilibrio (6M de urea, 75mM de Tris-HCl pH 8.8, 29.3% de Glicerol, 2% de SDS y 0.002% de Azul de bromofenol) conteniendo 10 mg/ml de DTT por 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, y luego con 5 mL de buffer de equilibrio conteniendo 25mg/ml de Iodoacetamida. Seguidamente la tira de IPG fue colocada en un gel de poliacrilamida al 15% (que tiene el gel de apilamiento para tiras de IPG) o en un gel de gradiente para tiras de IPG comercial (4-20% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, 7 cm IPG/prep well, 450 µl #4561091, BIORAD) para su separación por peso molecular.

Coloración de geles. Después de la corrida el gel fue coloreado con azul de Coomassie G-250 (Bio-safe Coomassie Stain, BIORAD).

Transferencia y blot. Dos geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa, para luego ser incubados con un pool de suero de pacientes con y sin NCC respectivamente.

MALDI-TOF/TOF. A partir de los resultados del western blot se procedió a seleccionar las proteínas de interés, para luego identificar estas proteínas en el gel teñido. Las proteínas seleccionadas que son visibles en el gel a manera de manchas o “spots” fueron cortadas y colocadas en tubos de 1.5 mL conteniendo agua ultrapura (mili-Q) para luego ser enviados a la empresa Applied Biomics Inc. (Hayward, CA, USA) para su posterior elución, digestión, separación por MALDI-TOF/TOF y análisis proteómico usando el programa MASCOT. Las muestras

fueron corridas por la empresa junto con 4 controles con 1 fmol de proteína. Brevemente el protocolo empleado por la empresa fue el siguiente: primero los spots fueron lavados para remover el colorante y otros inhibidores químicos, seguidamente los *spots* fueron secados y rehidratados en un buffer de digestión conteniendo tripsina modificada. Las proteínas fueron digeridas en el gel a 37°C, seguidamente los péptidos obtenidos de la digestión fueron extraídos del gel (spot) con un buffer que contiene ácido trifluoroacético, para luego ser desalados usando C-18 *Zip-tips* (Millipore). Los péptidos desalados fueron mezclados con la matriz CHCA (ácido alfa ciano-4-hidroxicinámico) y colocados en los pozos de la placa MALDI. El espectro de masas de los péptidos en cada muestra fue obtenido usando el analizador proteómico Applied Biosystems. Luego se seleccionó 10 a 20 de los más abundantes péptidos en cada muestra para luego ser fuertemente sujetos a fragmentación y a análisis por espectrometría de masa en tándem. La identificación de la proteína fue basada en el mapeo de masas de huellas peptídicas y el mapeo de los péptidos fragmentados. Los espectros combinados se enviaron para la búsqueda en la base de datos utilizando el software GPS Explorer acoplado al programa MASCOT para la identificación de proteínas en la base de datos de secuencias primarias de *Taenia solium* y *Echinococcus granulosus*. El reporte de la espectrometría de masa incluyó los 10 resultados con la más alta puntuación para cada spot, así como un resumen que enumera la mejor coincidencia para cada muestra.

C. Análisis de las proteínas identificadas

Para las proteínas identificadas por espectrometría de masas (LC-MS/MS o MALDI-TOF/TOF) identificadas usando la base de datos de *T. solium* y que reportan una secuencia parcial, se buscó la secuencia completa en la base de datos del genoma de *T. solium* usando el recurso de acceso abierto *WormBase ParaSite* (111) y en base a esa secuencia se calculó el peso molecular. Para el caso de las proteínas identificadas en la base de datos de *E. granulosus*, se utilizó los péptidos identificados por espectrometría de masas (que emparejaron con las secuencias de *E. granulosus*) para buscar secuencias similares en la base de datos del genoma de *T. solium* usando el recurso de acceso abierto *WormBase ParaSite* (111), y en base a esas secuencias se calculó el peso molecular. Una vez determinada el peso molecular de todas las proteínas identificadas, se procedió a seleccionar a aquellas proteínas que tienen el peso molecular de las proteínas de interés, por ejemplo, en el caso de las proteínas identificadas a partir de la banda de 46-48 kDa se procedió a seleccionar a las proteínas que están entre ese rango de peso molecular; y en el caso de los spots se procedió a seleccionar a las proteínas que tienen el peso molecular y punto isoelectrico esperado. Una vez seleccionadas las proteínas de interés, se procedió a trabajar con sus secuencias de aminoácidos para predecir si son de tipo secretora ya sea por la vía clásica o no clásica usando el servidor SignalP (versión 5.0) (112) y *SecretomeP* (versión 2.0) (113) respectivamente. También se realizó la predicción de la función molecular y el proceso biológico en el que participa usando la base de datos de InterPro (114); así como la localización de las proteínas usando el servidor deepLoc (versión 1.0) (115).

3.2.2.5. Localización de las proteínas de los estadios postoncosferales reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC

A. Obtención de proteínas recombinantes de postoncosferas en *E. coli*

Diseño de cebadores. Se diseñaron cebadores (5' → 3') *Forward* y *Reverse* para cada uno de los genes que codifican las proteínas seleccionadas. Primero se obtuvo la secuencia codificante en el servidor del NCBI (116) o en la base de datos del genoma de *T. solium* (111). A partir de la secuencia se diseñaron los cebadores: el cebador *forward* fue diseñado copiando los 25 primeros nucleótidos de la secuencia codificante, a esta secuencia se le agregó ocho nucleótidos adicionales (que contiene el sitio de corte para la enzima BamHI) en el extremo 5'; el cebador *reverse* fue diseñado seleccionando los 25 nucleótidos finales de la secuencia codificante, a partir de esta secuencia se obtuvo su complementaria reversa utilizando el servidor *Oligo Calc* (117). A esta secuencia complementaria reversa se le agregó 8 nucleótidos (que tienen sitio de corte para la enzima Sall) en el extremo 5'. Luego se calculó la temperatura de *melting* y de *annealing* de los iniciadores usando el servidor *Tm calculator* (118), en algunos casos, se redujo el número de nucleótidos en el extremo 3' de los iniciadores hasta conseguir una temperatura de *melting* y temperatura de *annealing* adecuado. También se evaluó que los cebadores no formen bucles u horquillas, ni que se unan entre sí, para lo cual se usó el servidor *Oligo Cal* (117). Finalmente se verificó *in silico* que los cebadores amplifican la secuencia deseada usando el servidor *Sequence Manipulation Suite* (119); también se verificó que las enzimas de restricción no corten la secuencia codificante para lo cual se utilizó el servidor *Web cutter* (120).

RT-PCR. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) consiste en retro transcribir una hebra de ARN en ADN complementario (cDNA) usando una enzima llamada transcriptasa reversa, y el resultado se amplifica mediante una PCR convencional.

Extracción de ARN: La extracción de ARN se realizó a partir de 50 postoncosferas colectadas a los 30 días de cultivo, las postoncosferas fueron lavadas 3 veces con PBS y almacenadas en solución *RNAlater* por 24 horas a 4°C y luego a -70°C hasta su posterior uso. Para la extracción de ARN se utilizó el kit *Direct-zol RNA MiniPrep Plus* (Zymo Research), se siguió las recomendaciones del fabricante. Después de la extracción, se realizó la cuantificación y evaluación de la pureza en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), también se evaluó la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Obtención de cDNA: A partir del ARN extraído se obtuvo cDNA usando el kit *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) se siguió el procedimiento del fabricante. Se utilizó ARN que cumpla con las siguientes características: proporción $260/280 \approx 2$ (que es una proporción aceptada como “pura” para ARN); proporción $260/230 = 2$ a 2.2 (rango aceptable); ARN integro al observar en un gel de agarosa. La cantidad de cDNA obtenido fue cuantificado usando el NanoDrop 2000.

PCR convencional: en un tubo de 0.2 mL se preparó una mezcla de los reactivos para la PCR (tabla III-1).

Tabla III-1. Reactivos y concentraciones usada para la PCR convencional

Reactivos	1 reacción de 20 µL	Concentración final
Agua libre de nucleasas	10.68 µL	---
Buffer 10X	2 µL	1X
25mM de MgCl ₂	2 µL	2.5mM
2.5 mM de dNTPs mix	1.6 µL	0.2mM c/u
10 µM Iniciador F	0.8 µL	0.4 µM
10 µM Iniciador R	0.8 µL	0.4 µM
Enzima Taq polimerasa (5U/µl)	0.12 µL	0.03U/µL
cDNA [50ng-100ng]	2 µL	
TOTAL	20 µL	

Seguidamente el tubo con la mezcla fue colocado en un termociclador para la amplificación. Se utilizó las condiciones para *Taenia* (108) con la variación en la temperatura de hibridación (*annealing*) (tabla III-2), el cual fue estandarizado para cada par de cebadores.

Tabla III-2. Condiciones para la PCR convencional

Pasos		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95°C	4 minutos
Ciclos del PCR = 32	Desnaturalización	94°C	1 minuto
	Hibridación	Estandarizar	1 minuto
	Extensión	72°C	2 minutos
Extensión final		72°C	4 minutos
Mantenimiento		4°C	∞

Electroforesis en geles de agarosa: Los productos amplificados fueron retirados del termociclador, luego se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa con el objetivo de confirmar que los productos tienen el tamaño esperado. Se preparó 1 gel de agarosa al 1 % para lo cual se agregó 1g de agarosa en 100 mL de buffer Tris-Acetato-EDTA 1X, luego fue calentando hasta que se disuelva completamente, se esperó a que enfríe para seguidamente agregarle 15 μ L bromuro de Etidio (1mg/ml), se mezcló y vertió el preparado sobre el molde para el gel, luego se colocó el peine para formar los pozos, y se esperó a que la agarosa polimerice. Después el gel fue colocado en una cámara electroforética con buffer Tris-Acetato-EDTA 1X, seguidamente se colocaron en los pozos los productos de amplificación (10 μ L de producto más 3 μ l de azul de bromofenol o rojo de Cresol) y en un pozo aparte se colocó el marcador de pares de bases (100bp) y se dejó corriendo a 90 V por 45 minutos. Finalizada la corrida, el gel fue retirado y colocado en un transiluminador UV conectado a una computadora con cámara.

PCR con la enzima DNA Polimerasa de alta fidelidad: una vez confirmada que los iniciadores amplifican los productos deseados, se procedió a amplificar cada uno de estos productos para la clonación. Esta vez se usó la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad con actividad de corrección (*Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase*, Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente: en un tubo de 0.2 mL se preparó una mezcla de los reactivos que se muestran en la tabla III-3.

Tabla III-3. Reactivos y concentraciones usada para la PCR con la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad.

Reactivos [stock]	1 reacción de 50 μ L	Concentración final
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 μ L	
5X SuperFi Buffer	10 μ L	1X
10 mM dNTP mix	1 μ L	0.2 mM cada uno
10 μ M forward primer (Iniciador F)	2.5 μ L	0.5 μ M
10 μ M reverse primer (Iniciador R)	2.5 μ L	0.5 μ M
Platinum SuperFi DNA polimerasa (2U/ μ L)	0.5 μ L	0.02 U/ μ L
cDNA [5-50ng]	varía	

Seguidamente el tubo con la mezcla fue colocado en un termociclador para la amplificación. Las condiciones se muestran en la tabla III-4.

Tabla III-4. Condiciones para la PCR con la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad.

Pasos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98 °C	30 seg.
Ciclos del PCR = 40	Desnaturalización	98°C
	Hibridación (<i>anneal</i>)	Depende de los iniciadores
	Extensión	72°C
Extensión final	72°C	5 min
Mantenimiento	4°C	∞

Para verificar que los productos de amplificación tienen el tamaño correcto, se realizó la electroforesis en gel de agarosa como se describió previamente.

Clonamiento y expresión de genes de interés en *E. coli*. Para el clonamiento y expresión se utilizó el vector pGEX-6P-1 (figura III-1) (GE Healthcare). El vector contiene los genes de resistencia a ampicilina y el gen beta-lactamasa como marcadores de transformación.

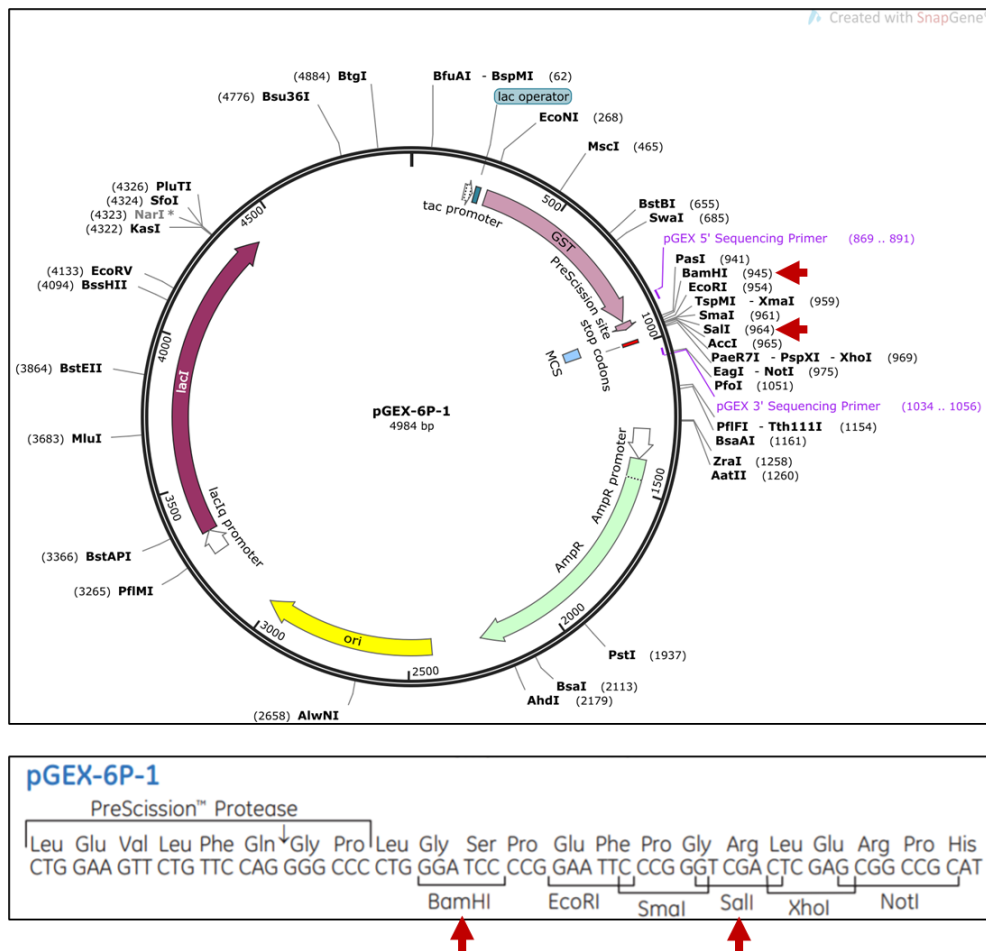


Figura III-1. Mapa del vector pGEX-6P-1.

Las flechas rojas indican las enzimas que se utilizaron para la clonación en este vector.

Purificación de los productos de amplificación: Los productos amplificados por RT-PCR usando la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad fueron purificados antes de realizar el clonamiento. Se utilizó el kit de purificación *GeneJet PCR*

Purification (Thermo Scientific) y se siguió el protocolo del fabricante. Luego se procedió a realizar la cuantificación en el NanoDrop 2000.

Digestión del vector y los productos de amplificación purificados: Una vez obtenidos los productos de amplificación purificados se procedió a digerir los extremos de los productos; y a linealizar el vector usando las enzimas de restricción BamHI y Sall (*FastDigest BamHI* y *FastDigest Sall*, Thermo Scientific). Se preparó la reacción de digestión según la tabla III-5.

Tabla III-5. Concentración de reactivos usados para la digestión del vector y los productos de amplificación de la PCR.

Reactivos	Digestión	
	Vector (plásmido)	Producto de la PCR
Agua libre de nucleasas	30 μ L	22 μ L
10X FastDigest buffer	4 μ L	2 μ L
FastDigest BamHI	2 μ L	1 μ L
FastDigest Sall	2 μ L	1 μ L
DNA	2 μ L (hasta 2 μ g)	4 μ L (\sim 0.2 μ g)
Total	40 μL	30 μL

Se mezcló suavemente la reacción, luego se centrifugó por 3 a 4 segundos, se incubó a 37°C por 15 a 20 minutos para el vector o por 60 minutos para el producto de PCR, seguidamente se inactivó las enzimas a 80°C por 5 minutos. Las muestras digeridas fueron purificadas usando el kit *GeneJET purification PCR* (para productos de PCR) y el kit *GeneJET plasmid miniprep* (para el plásmido) siguiendo

las recomendaciones del fabricante. Las muestras purificadas fueron cuantificadas en el NanoDrop.

Ligación: para la ligación del producto de la PCR digerido (purificado) en el plásmido pGEX-6P-1 digerido, se preparó la reacción según la tabla III-6. Además, se incluyeron 2 controles: Primer control sin la enzima ligasa T4 y segundo control sin el producto de PCR. Se mezcló brevemente la reacción y se centrifugó por 3 a 5 segundos, seguidamente se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, y se usó inmediatamente para realizar la transformación en bacterias *E. coli*.

Tabla III-6. Concentración de reactivos usados para la ligación del vector con el producto de amplificación de la PCR

Reactivos	TsCBP	Ts50	NEFTs	TsanB2
2X Buffer de reacción	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Producto de PCR digerido y purificado	2.5 μ L [68ng]	8 μ L [68 ng]	2.2 μ L [70ng]	3.4 μ L [70ng]
Proporción inserto/vector 1:5	~60 ng	~43 ng	~52 ng	~53 ng
Vector pGEX-6P-1 digerido y purificado	0.5 μ L [50 ng]	1 μ L [50 ng]	0.5 μ L [50 ng]	0.5 μ L [50 ng]
Agua libre de nucleasas	6 μ L	—	6.3 μ L	5.1 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Total	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

Transformación bacteriana y clonación: El inserto (producto de PCR) ligado al vector pGEX-6P-1 fue introducido en bacterias *E. coli* cepa DH5 alfa competentes (Invitrogen) con el objetivo de obtener una gran cantidad de bacterias con el inserto ligado al plásmido. El procedimiento fue el siguiente: 100 μ L de bacterias

competentes más 1.5 μL (3.75 ng) del producto de ligación (inserto+pGEX-6P-1) fueron colocadas en un tubo de 15 mL, la mezcla fue incubado en hielo por 30 minutos, seguidamente se le dio un shock térmico por 45 segundos a 42°C en baño maría y luego se colocó en hielo por 2 minutos. Luego se agregó 900 μL de medio SOC y se incubó por 1 hora a 37°C en agitación. 200 μL de las bacterias transformadas fueron sembradas en una placa de agar Luria-Bertani (LB) conteniendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la placa fue incubada toda la noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionó 4 colonias, cada colonia fue resembrada en otra placa de agar para luego confirmar si tienen el plásmido con el inserto.

PCR colonia: A partir de la placa resembrada se analizaron 4 a 6 colonias por PCR colonia para confirmar que presentan el DNA insertado. Para lo cual se preparó la reacción según la tabla III-7.

Tabla III-7. Reactivos y concentraciones usadas para la PCR colonia

Reactivos [stock]	1 reacción de 20 μL	Concentración final
Agua libre de nucleasas	13.9 μL	
10X Taq Buffer	2 μL	1X
dNTP mix, 2mM cada uno	2 μL	0.2 mM cada uno
25mM MgCl_2	1.2 μL	1.5 mM
10 μM forward primer (Iniciador F)	0.4 μL	0.2 μM
10 μM reverse primer (Iniciador R)	0.4 μL	0.2 μM
Taq DNA polimerasa (5U/ μL)	0.1 μL	0.02 U/ μL

Seguidamente, se picó una colonia con una punta para micropipeta y se resuspendió en los 20 μL de la reacción. Y luego fue colocado en un termociclador bajo las

siguientes condiciones: 95°C por 3 minutos; (94°C por 30 segundos, ___°C (depende del par de iniciadores) por 30 segundos, 72°C por 2 minutos; 32 ciclos); 72°C por 4 minutos. Luego se analizó la presencia del producto de PCR en gel de agarosa al 1%.

La punta para micropipeta fue colocada en 5 mL de caldo LB más ampicilina y fue incubado durante toda la noche a 37°C en agitación, para luego extraer el plásmido de las bacterias y realizar el análisis con enzimas de restricción.

Análisis con enzimas de restricción: Otra manera de confirmar que las colonias tienen el plásmido con el inserto es la extracción del plásmido y digestión con las enzimas de restricción. Para lo cual se realizó la extracción de plásmido por lisis alcalina siguiendo el protocolo reportado por Maniatis et al., 1982 (121). Seguidamente se realizó la cuantificación de plásmidos usando el espectrofotómetro NanoDrop. Luego se procedió a digerir el plásmido usando la reacción según la tabla III-8.

Tabla III-8. Reactivos y condiciones para la digestión del plásmido conteniendo el producto de amplificación de la PCR.

Reactivos	Digestión (1 reacción)	Sin digerir (control)
Agua libre de nucleasas	14 µL	16 µL
10X FastDigest Green buffer	2 µL	2 µL
FastDigest BamHI	1 µL	---
FastDigest Sall	1 µL	---
DNA plasmídico	2 µL (hasta 1 µg)	2 µL (hasta 1µg)
Total	20 µL	20 µL

Se mezcló suavemente la reacción, se centrifugó por 3 a 4 segundos (spin), se incubó a 37°C por 15 a 20 minutos, seguidamente se inactivó las enzimas a 80°C por 5 minutos. Las muestras fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para visualizar el producto de la digestión.

Secuenciamiento del plásmido: Una vez confirmado por PCR colonia y por digestión del plásmido con enzimas de restricción, se envió a secuenciar el plásmido a la empresa Psomagen (Macrogen USA) para verificar que la secuencia es la correcta y que no existan mutaciones. Para lo cual se sembró una de las colonias positivas en 50 mL de caldo LB más ampicilina, se dejó incubando toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizó la extracción del plásmido por lisis alcalina, seguidamente se realizó la purificación del plásmido usando el kit de *GeneJET plasmid miniprep* (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó 1 µL de plásmido (50 ng/ µL) para la PCR con los iniciadores para el plásmido pGEX-6P-1 (pGEX 5_F: GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG, pGEX 3_R: CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG); bajo las siguientes condiciones de ciclamiento: 95°C por 3 minutos; (94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos; 32 ciclos); 72°C por 4 minutos. Seguidamente se corrieron los productos de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Una vez confirmado que el plásmido tiene el inserto, se envió 50 µL (50ng/µL) de plásmido para el secuenciamiento con los primer del plásmido y del inserto.

Transformación bacteriana y expresión de proteínas recombinantes: Una vez confirmada que el plásmido pGEX-6P-1 contiene el inserto y la orientación correcta, se procedió a expresar las proteínas recombinantes fusionadas a GST en

la bacteria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. El procedimiento fue el siguiente: se realizó la transformación de bacterias usando 200 μ L de células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS competentes más 2 μ L del plásmido purificado (\sim 200 ng) que fueron colocados en hielo por 30 minutos, seguido de un shock térmico de 90 segundos a 42°C, luego se volvió a colocar en hielo por 3 minutos, seguidamente se le adicionó 800 μ L de medio SOC y se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. Terminado el tiempo, se centrifugó y el pellet fue resuspendido en 100 μ L de medio SOC, el cual fue distribuido sobre una placa de agar LB conteniendo ampicilina y cloranfenicol. La placa fue incubada a 37°C durante toda la noche. Después de la incubación, 4 colonias fueron evaluadas por PCR colonia para confirmar que tuvieran el inserto. Una vez confirmada, se realizó la inducción de la expresión de la proteína recombinante usando IPTG, para lo cual 1 de las colonias fue colocada en 5 mL de caldo LB más ampicilina y cloranfenicol y fue incubada a 37°C y en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se trasladó los 5 mL de cultivo a un matraz conteniendo 500 mL de medio LB más ampicilina y cloranfenicol, el matraz fue incubado a 37°C en agitación hasta que alcance un OD =0.6 a 0.8, seguidamente se agregó 0.1 mM de IPTG y se dejó incubando en agitación a 37°C por 4 horas. Antes de pasar al siguiente paso, se confirmó que las bacterias expresan la proteína deseada mediante SDS-PAGE, para lo cual 1 mL de bacterias antes de la inducción y 1 mL de bacterias después de la inducción fueron centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto, el pellet fue resuspendido en buffer de la muestra más DTT y fue corrido por SDS-PAGE, y coloreado con azul de Coomassie G-250.

Lisis celular y obtención de proteínas recombinantes. Las bacterias inducidas fueron centrifugadas a 3500 rpm por 30 minutos a 4°C, luego al pellet fue resuspendido con 12.5 mL de buffer de lisis (300 mM de NaCl, 50mM de Tris-HCl pH 7.5, 1mM de EDTA) y sonicado (3 ciclos de sonicación, cada ciclo fue de 1 minuto, y 2 minutos de descanso entre ciclo). Luego de la sonicación, se centrifugó y se colectó el sobrenadante (fracción soluble) y se guardó a -20°C; por otro lado, el pellet fue resuspendido en buffer de aislamiento (2M de Urea, 20mM de Tris-HCl pH8, 0.5M de NaCl, 2% de Tritón X-100) y sonicado 3 ciclos (1 minuto/ciclo), centrifugado, el pellet fue resuspendido en buffer de solubilización (8 M de Urea, 20mM de Tris-HCl pH8, 0.5 M de NaCl, 1mM de mercaptoetanol) y se dejó 1 hora en agitación suave a 25-37°C, luego se centrifugó a 12000rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante recuperado es la proteína solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión.

Se colectó alícuotas (100 µL) antes de la sonicación, después de la sonicación (lisado total), del sobrenadante después de la centrifugación (fracción soluble), de la proteína solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión (pellet); estas alícuotas fueron corridas por SDS-PAGE.

B. Purificación de las proteínas recombinantes

Una vez confirmada la expresión de la proteína de interés, así como su presencia en la fracción soluble, se procedió a la purificación usando la resina *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare), se siguió las indicaciones del fabricante. El procedimiento fue el siguiente: 250 µL de *Glutathione Sepharose 4B*

fue transferido a un tubo de 1.5mL, luego centrifugado a 500 g por 5 minutos, seguidamente se decantó el sobrenadante. La *Glutahione Sepharose 4B* fue lavado 2 veces por adición de 1.25 mL de buffer de unión (140 mM de NaCl, 2.7mM de KCl, 10mM Na₂PO₄, 1.8mM de KH₂PO₄, pH 7.3), se mezcló por inversión, luego fue centrifugado a 500 g por 5 minutos. Se decanto el sobrenadante, la *Glutahione Sepharose 4B* fue trasladado a un tubo de 50 mL que contiene 12.5 mL del sobrenadante del sonicado (fracción soluble) obtenido anteriormente, luego fue incubado durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente se procedió a centrifugar a por 5 minutos a 500g, luego se decantó el sobrenadante, y la *Glutahione Sepharose 4B* fue transferido a un tubo de 1.5mL para luego ser lavado 4 veces por adición de 1.25 mL de buffer de unión, se mezcló por inversión, se centrifugó a 500g por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Seguidamente se realizó la elución por adición de 250 µL de buffer de elución (50mM de Tris-HCl, 10mM de glutatión reducido, pH8)), se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación, luego se centrifugó y se colecto el sobrenadante para analizarlo por SDS-PAGE, este paso fue realizado 4 veces.

C. Evaluación de las proteínas recombinantes de postoncosferas

Para evaluar si las proteínas recombinantes obtenidas son reconocidas por anticuerpos anti-postoncosfera, se realizó el western blot, para ello 0.1µg/µl y 0.3 µg/µl de proteínas recombinantes anexina B2 y precursor de proteína de unión a calcio respectivamente fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa, y luego fueron incubadas con suero de conejos anti – postoncosferas (dilución 1/200) durante toda la noche, luego fueron lavados e

incubados con el conjugado marcado con peroxidasa (cabra anti – conejo, dilución: 1/800) y revelados con el sustrato DAB.

D. Localización de las proteínas recombinantes en las postoncosferas

Para localizar las proteínas en las postoncosferas se utilizó anticuerpos policlonales anti - proteínas recombinantes producidos en conejos siguiendo el protocolo descrito previamente. La identificación se realizó por western blot e inmunohistoquímica.

Western blot

Se separó 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas solubles totales de PO30d por SDS-PAGE. Se usó geles formados por el gel de separación al 15% y el gel de apilamiento al 5% que tiene 2 pozos, en el pozo pequeño se colocó 5 μL del marcador de peso molecular, y el pozo grande se colocó 200 μL de la muestra de proteínas. Después del SDS-PAGE se realizó la transferencia. Las membranas fueron cortadas en tiras largas, cada tira fue incubada toda la noche con los sueros de conejos antiproteínas recombinantes (1:200 para anti - anexina B2 y anti-enolasa; y 1:100 para anti-precursor de proteína de unión a calcio) y anti - proteína de postoncosfera como control positivo, las tiras fueron lavadas e incubadas por 1 hora con el conjugado (cabra anti- conejo IgG marcada con peroxidasa) dilución 1 en 800. Las tiras fueron lavadas y reveladas con el sustrato DAB.

Inmunohistoquímica

Se utilizó los cerebros del primer experimento de infección de rata (infección con postoncosferas). Los cerebros fueron fijados en solución PBS más 4% de paraformaldehído por 24 horas, luego fueron lavados y colocados en etanol al 70%. A partir de los cerebros se obtuvo cortes finos en parafina y colocados en láminas portaobjetos. Cada lámina fue calentada y luego sumergido en xilol, seguidamente fue rehidratado en una batería decreciente de alcoholes. Luego se realizó el desmascaramiento con buffer citrato 10 mM. Seguidamente se realizó el bloqueo con la solución de PBS más 5% de albúmina de suero bovino y 5% de suero de cabra. Las láminas fueron incubadas con los anticuerpos policlonales antiproteína recombinante (anti- enolasa dilución 1/8000, anti- precursor de proteína de unión a calcio dilución 1/1000, anti- anexina B2 dilución 1/500). Las láminas fueron lavadas e incubadas con el conjugado cabra anti-conejo marcado con peroxidasa (dilución 1/400). Las láminas fueron reveladas con la solución de DAB, contra teñidos con hematoxilina y montados con una solución de Entellan. Las imágenes fueron tomadas con la cámara Axiocam ERc5 acoplada al microscopio Zeiss Axio Lab. A1.

3.2.2.6. Análisis de datos

Para calcular el peso molecular de las proteínas identificadas se utilizó el programa GelAnalyser versión 19.1 (122). La evaluación de los sueros de personas con o sin NCC en el western blot con proteínas de postoncosfera se realizó en ciego; y para el cálculo de la sensibilidad y especificidad del western blot se usó el software online MedCalc (123).

3.2.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio ha sido aprobado por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) con código de inscripción 1011060.

Los experimentos en animales se realizaron siguiendo las recomendaciones del comité de ética para el uso de animales. En el caso de los sueros de personas, estos fueron seleccionados del repositorio del Grupo de Trabajo de Cisticercosis en Perú. Todos los sueros de pacientes y controles sanos fueron obtenidos por el grupo usando el consentimiento informado que incluye el permiso para usos futuros.

IV. RESULTADOS

4.1. PRIMER ESTUDIO: REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL WESTERN BLOT PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO DE LA NCC

4.1.1. Búsqueda de artículos

Usando la estrategia de búsqueda, se encontraron en total 4422 artículos; de los cuales 1266 fueron duplicados, quedando 3156 que fueron evaluados por título y resumen. De estos, 3052 artículos fueron excluidos debido a que no cumplían con los criterios de inclusión quedando 104 artículos, de los cuales 42 fueron incluidos para el análisis (figura IV-1).

4.1.2. Cobertura geográfica

Los estudios seleccionados evaluaron muestras de sueros que provienen de diferentes áreas endémicas como África [Burkina Faso (n=1), Tanzania (n=1) y Zambia (n=1)]; Asia [India (n=6)] y Latinoamérica [Brasil (n=2), Colombia (n=1), Ecuador (n=2), Honduras (n=1), México (n=3) y Perú (n=8)]. Cinco estudios usaron muestras de sueros procedentes de varias regiones endémicas, mientras que once estudios no mencionan la procedencia de la muestra (Anexo 1.2).

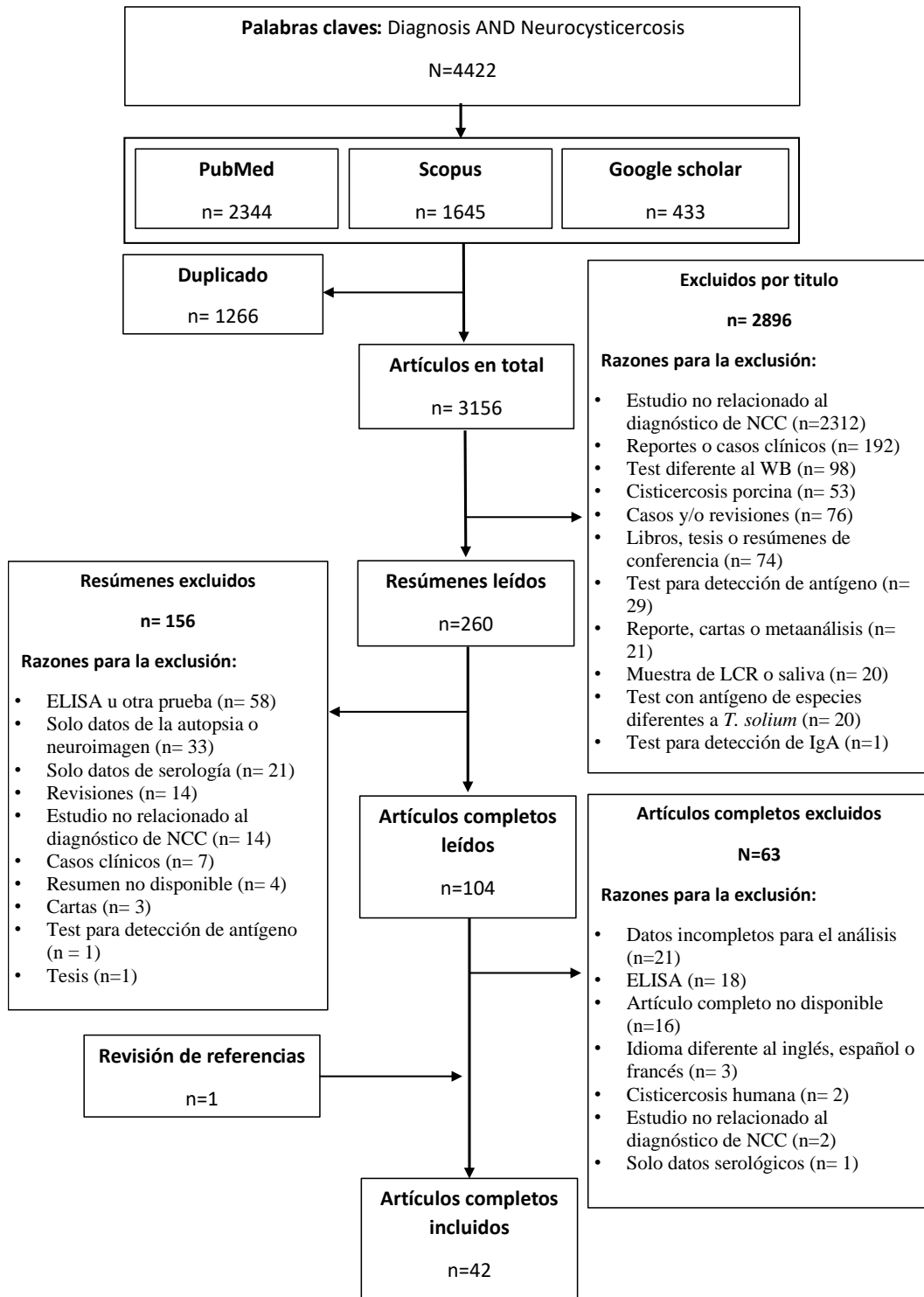


Figura IV-1. Diagrama de flujo de la búsqueda de artículos.

4.1.3. Características de los artículos

Se incluyó 42 estudios originales [12 epidemiológicos (14–16,63–69,91,124) y 30 estudios de laboratorio (7,70–79,81–84,94–99,125–133)] con un total de 11,599 muestras de suero. En el caso de los estudios epidemiológicos, 11 fueron estudios que usaron el western blot con glicoproteínas, mientras que un estudio utilizó el western blot con antígenos nativos del cisticerco. En el caso de los estudios realizados en laboratorio, usaron diferentes antígenos (glicoproteínas, antígenos recombinantes y otras proteínas nativas del cisticerco) para mejorar la sensibilidad del western blot, para comparar el western blot con el ELISA o para evaluar el western blot en niños o pacientes que tienen un granuloma con un cisticerco. Las características de los estudios seleccionados están descritas en el anexo 1.2. También se evaluó la calidad metodológica de cada estudio usando la herramienta QUADAS-2, los resultados y la evaluación de cada estudio se muestra en el anexo 1.3.

4.1.4. Metaanálisis

Los 42 estudios fueron tomados en cuenta para 46 evaluaciones con diferentes tipos de antígenos (figura IV.2). La sensibilidad está en el rango de 26% a 100% mientras que la especificidad está en el rango de 58% a 100%. El metaanálisis muestra que el western blot tiene una sensibilidad resumen de 78.9% [IC95%, 71.8%-83.6%] y una especificidad del 97.6% [IC95%, 95.7%-98.7%] (figura IV.3).

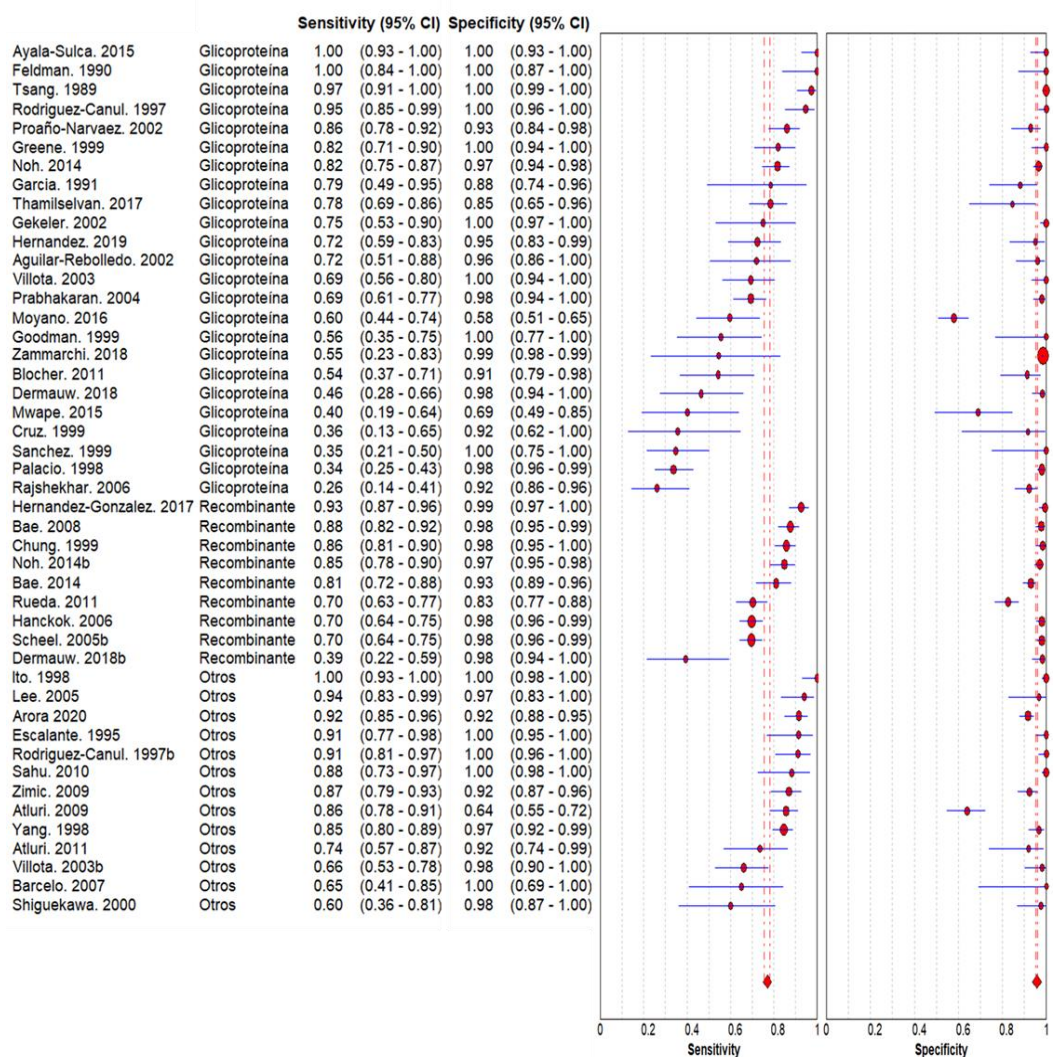


Figura IV-2. Forest plot que muestra la sensibilidad y especificidad del western blot en cada estudio.

Los estudios están representados por los círculos rojos, y la estimación de la sensibilidad y especificidad resumen está representado por el rombo rojo.

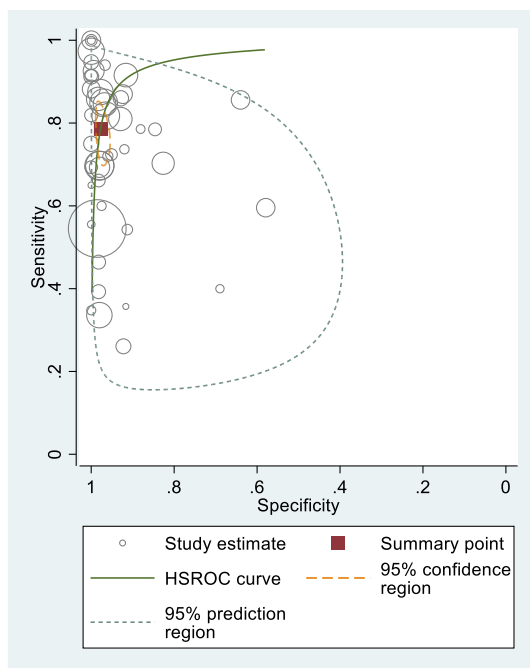


Figura IV-3. Curva HSROC para el western blot en el diagnóstico de la NCC.

Cada estudio está representado por un círculo vacío que varía de tamaño en relación con el número total de individuos evaluados en cada estudio. El cuadrado rojo representa el resumen estimado de la sensibilidad y especificidad. La región de predicción del 95% ilustra el grado de heterogeneidad entre los estudios.

Cuando el análisis se realiza por el tipo de estudio, la sensibilidad del western blot es menor en los estudios epidemiológicos (55.3% [IC95%, 41.1% - 69.8%]) comparado con los estudios de laboratorio (84.8% [IC95%, 79.4% - 88.9%]). La especificidad es mayor al 90% en ambos (92.7% [IC95%, 85.4% - 96.5%] en estudios epidemiológicos y 98.6% [IC95%, 97.0% - 99.3%]).

Cuando se analiza por tipo de antígeno la sensibilidad es ligeramente mayor cuando el western blot usa otros antígenos nativos (86.5% [IC95%, 79.3% - 91.4%]) comparado con el western blot que usa glicoproteínas (72.7% [IC95%, 60.3% - 82.4%]) o antígenos recombinantes (78.7% [IC95%, 69.3% - 85.9%]). En

cuanto a la especificidad, esta es mayor a 97 % en los tres grupos (97.9% [IC95%, 94.9% - 99.2%] para glicoproteínas, 97.2% [IC95%, 94.7% - 98.5%] para antígeno recombinante, y 98.4% [IC95%, 93.9% - 99.5%] para otros antígenos).

Al analizar el tipo de estudio con respecto al antígeno glicoproteína, la sensibilidad es menor en los estudios epidemiológicos (49.7% [IC95%, 38.7% - 60.8%]) comparado con los estudios en laboratorio (85.9% [IC95%, 74.6% - 92.7%]). Asimismo, la especificidad es ligeramente menor en los estudios epidemiológicos (92.8% [IC95%, 84.4% - 96.8%]) comparado con los estudios en laboratorio (99.4% [IC95%, 97.1% - 99.9%]) (anexo 1.4). No se realizó el análisis con los otros antígenos debido a que solo fueron usados en los estudios de laboratorio.

El análisis también se realizó de acuerdo con los grupos de neuroimagen (tabla IV-1). El western blot tiene una alta sensibilidad para identificar pacientes con NCC activa (89.2% [IC95%, 82.8% - 93.4%]), con quistes múltiples (88.7% [IC95%, 78.9% - 94.3%]) y con quistes múltiples viables (95.5% [IC95%, 92.0% - 97.5%]). La especificidad estuvo alrededor del 96% para todos los grupos. Con respecto al tipo de antígeno usado en la prueba, en la tabla IV-1 se observa que la sensibilidad es ligeramente menor cuando se usa glicoproteínas comparado con los antígenos recombinantes. Asimismo, el western blot con glicoproteínas tiene una sensibilidad alta para detectar anticuerpos de pacientes que presentan múltiples quistes viables en el cerebro [91.6% (IC95%, 79.5% - 96.8%)], mientras que en pacientes con quiste único (viable o calcificado) o con NCC inactiva la sensibilidad de la prueba está por debajo del 50%. En todos los análisis realizados la especificidad global del western blot con glicoproteínas fue mayor al 90%.

Tabla IV-1. Sensibilidad y especificidad del western blot de acuerdo con los resultados de neuroimagen

Grupos	Todos		Glicoproteínas		Antígeno recombinante		Otros antígenos	
	Sen (IC95%)	Esp (95%CI)	Sen (IC95%)	Esp (95%CI)	Sen (IC95%)	Esp (95%CI)	Sen (IC95%)	Esp (95%CI)
NCC activa	89.2% (82.8% - 93.4%)	96.5% (94.2% - 97.9%)	83.8% (65.0% - 93.5%)	96.4% (94.0% - 97.8%)	91.4% (84.0% - 95.5%)	97.2% (94.7% - 98.6%)	89.7% (82.3% - 94.2%)	94.1% (69.7% - 99.1%)
NCC inactiva	40.7% (26.4% - 56.9%)	96.8% (93.5% - 98.4%)	30.9% (21.2% - 42.7%)	95.3% (88.4% - 98.2%)	56.2% (35.6% - 74.8%)	97.7% (95.9% - 98.7%)	NC	NC
Quiste único	58.9% (45.9% - 70.7%)	95.9% (93.4% - 97.6%)	44.7% (28.8% - 61.7%)	96.6% (95.2% - 97.6%)	67.6% (51.4% - 80.4%)	97.5% (93.6% - 99.1%)	NC	NC
Múltiples quistes	88.7% (78.9% - 94.3%)	95.8% (93.1% - 97.5%)	78.5% (61.1% - 98.5%)	96.8% (95.5% - 97.7%)	96.2% (89.5% - 98.7%)	97.3% (93.4% - 98.9%)	NC	NC
Quiste viable único	64.5% (52.3% - 75.1%)	96.7% (94.7% - 98.0%)	54.8% (36.6% - 71.8%)	96.8% (94.7% - 98.1%)	67.6% (51.4% - 80.4%)	97.5% (93.6% - 99.1%)	NC	NC
Múltiples quistes viables	95.5% (92.0% - 97.5%)	96.8% (94.7% - 98.0%)	91.6% (79.5% - 96.8%)	97.0% (95.5% - 98.0%)	96.2% (89.5% - 98.6%)	97.3% (93.4% - 98.9%)	NC	NC

Sen=Sensibilidad, Esp= especificidad IC= intervalo de confianza, NC= no calculado (debido al número limitado de estudios).

4.2. SEGUNDO ESTUDIO: CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LOS ESTADIOS POSTONCOSFERALES RECONOCIDOS POR ANTICUERPOS DE PACIENTES CON NCC

4.2.1. Detección de proteínas de los estadios postoncosferales reconocidos por anticuerpos de pacientes con NCC

4.2.1.1. Proteínas antigénicas de estadios postoncosferales

En la figura IV-4 se muestra la morfología de las postoncosferas de *T. solium* de las cuales se realizó la extracción de proteínas. Las postoncosferas se diferencian de las oncosferas principalmente por la ausencia de ganchos y el incremento del tamaño. Las proteínas solubles totales obtenidas de postoncosferas colectadas a los 15, 30 y 60 días de cultivo fueron utilizadas para inmunizar conejos y obtener anticuerpos policlonales IgG anti- postoncosferas (Anexo 3). En la figura IV-5 se muestra los resultados del western blot de las proteínas solubles totales de postoncosferas incubadas con los anticuerpos policlonales anti-postoncosfera, la imagen muestra las proteínas antigénicas de las postoncosferas de *T. solium* a los 15, 30 y 60 días de cultivo. Las postoncosferas de *T. solium* presentan bandas antigénicas de diferentes pesos moleculares (rango de 12 kDa a 99 kDa), de las cuales dos bandas antigénicas de 46 y 48 kDa aproximadamente presentan una reacción fuerte o intensa en las proteínas de postoncosferas de 30 y 60 días de cultivo (figura IV-5A). Así mismo, también se enfrentó las proteínas de postoncosferas con suero de conejo pre-inmune como control, no se observó reacción en el western blot (figura IV-5B).

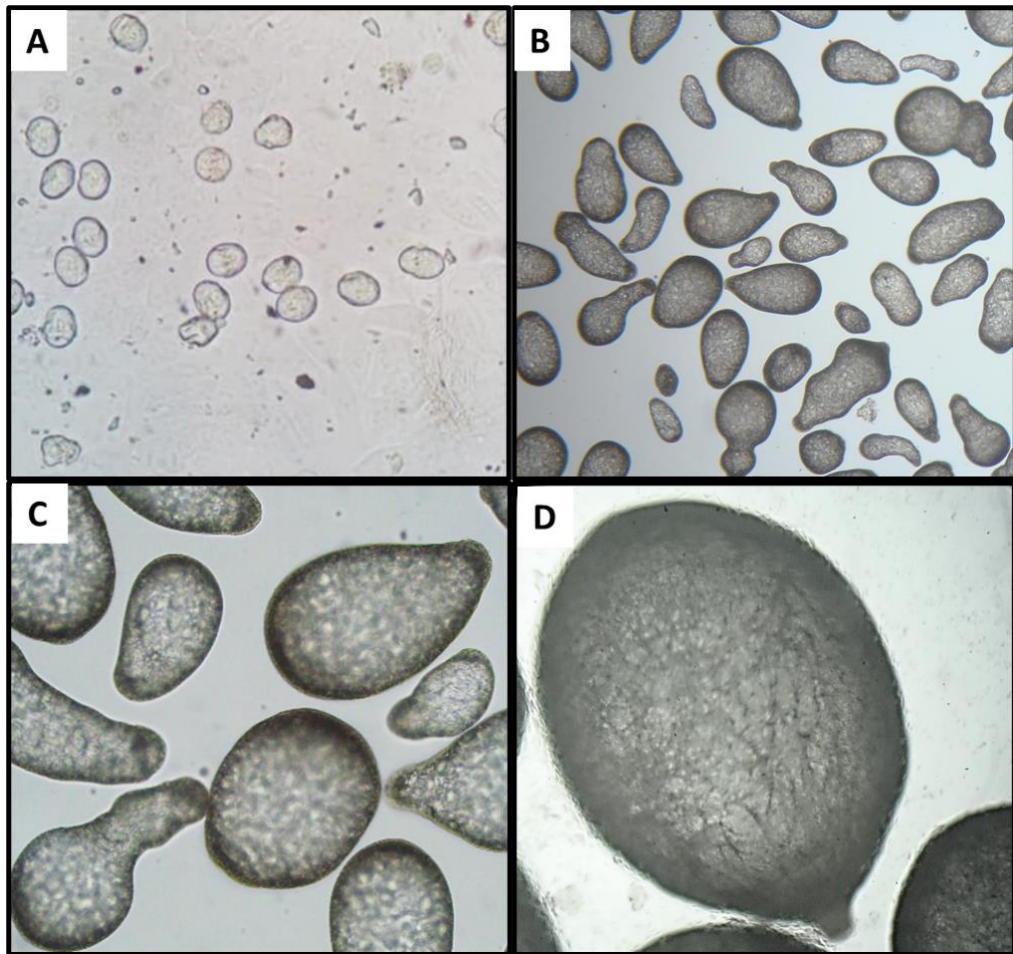


Figura IV-4. Morfología de los estadios postconcosferales de *T. solium*.

A) Oncósferas activadas (24 horas de cultivo), magnificación 400X. B) postconcosferas de 15 días de cultivo, magnificación 100X. C) postconcosferas de 30 días de cultivo, magnificación 100X. D) postconcosferas de 60 días de cultivo, magnificación 100X. Cultivos observados en un microscopio invertido.

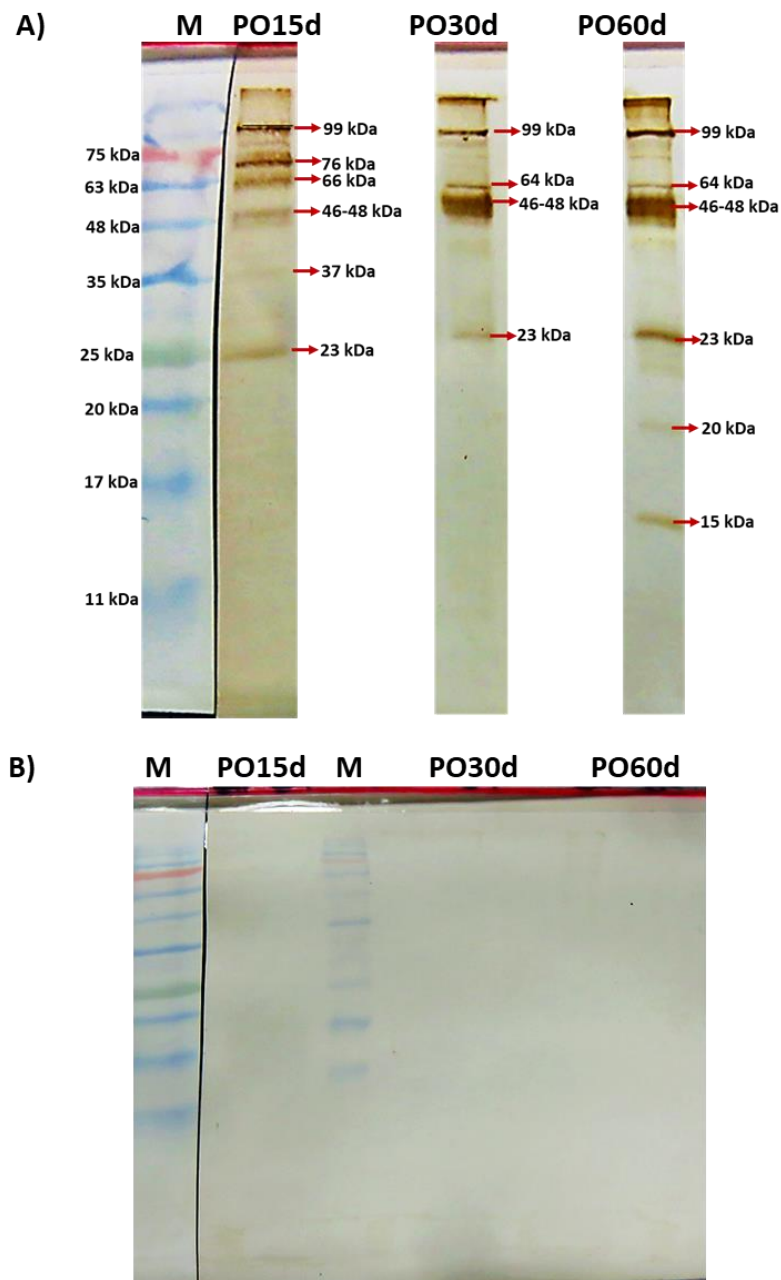


Figura IV-5. Proteínas antigénicas de postoncosferas de *T. solium* observadas por Western blot.

Proteínas solubles totales incubados con suero de conejo inmunizados con proteínas de postoncosferas (A) o suero de conejo pre-inmune (b). PO15d= proteínas de postoncosferas de 15 días de cultivo; PO30d=proteínas de postoncosfera de 30 días de cultivo; PO60d= proteínas de postoncosfera de 60 días de cultivo; M= marcador de peso molecular para proteínas.

Las proteínas solubles totales de postoncosfera de 30 días de cultivo fueron comparadas con las proteínas de oncosferas y cisticercos, en la figura IV-6 se presentan los resultados del western blot. La imagen muestra que los anticuerpos policlonales anti - postoncosferas no reconocen proteínas de oncósferas, pero si reconocen proteínas de cisticerco. Aparentemente las bandas de 46-48 kDa y la banda de 23 kDa de postoncosferas de 30 días podrían ser específicas de postoncosfera debido a que no están presentes en oncosfera ni cisticerco.

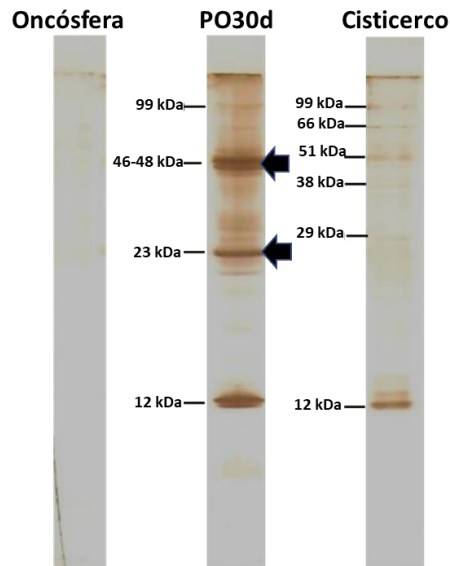


Figura IV-6. Comparación de las proteínas de oncosfera, postoncosfera y cisticerco de *T. solium* por Western blot.

Proteínas solubles totales incubadas con el suero de conejos inmunizados con proteínas de postoncosferas. Oncósfera = proteínas de oncósferas activadas; PO30d= proteínas de postoncosferas de 30 días de cultivo; Cisticerco = proteínas de cisticerco. Las flechas señalan las posibles bandas específicas de postoncosferas de *T. solium*.

4.2.1.2. Proteínas de postoncosfera reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC

Las proteínas solubles totales de las formas postoncosferales también fueron incubados con un pool de sueros de pacientes con NCC y un pool de sueros de personas sin NCC. En la figura IV-7A se muestra los resultados del western blot, se observa que las proteínas de 46 y 48 kDa presentes en las postoncosferas de 30 y 60 días de cultivo son reconocidas por el pool de sueros positivos mientras que no son reconocidos por el pool de suero de personas sin NCC. En el western blot también se comparó con las proteínas de oncósfera y cisticerco, observándose que las proteínas de 46 y 48 kDa no están presentes en oncosfera mientras que en cisticerco se puede observar una banda ligeramente por encima de las bandas de 46 y 48 kDa, con un peso aproximado de 50 kDa. La banda de bajo peso molecular (~23kDa) de las postoncosferas también son reconocidas por el pool de suero de pacientes con NCC, pero estas bandas aparentemente están presentes también en el cisticerco.

Las proteínas E/S de postoncosferas de 30 días de cultivo también fueron enfrentados con el pool de suero de pacientes con NCC. En la figura IV-7B podemos observar que el pool de sueros positivos también reconoce las bandas de 46 y 48 kDa en el E/S de postoncosferas, lo cual sugiere que las proteínas de 46 y 48 kDa podrían ser proteínas secretadas por las postoncosferas de *T. solium*.

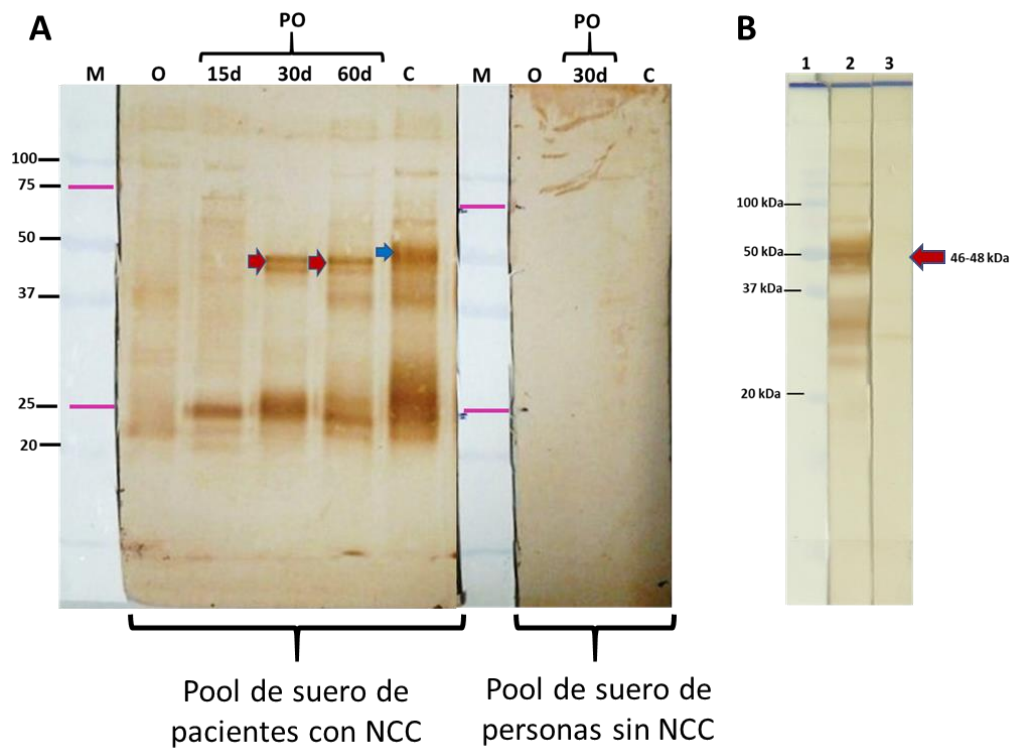


Figura IV-7. Western blot de proteínas de *T. solium* incubadas con un pool de sueros de personas con y sin NCC.

A) proteínas solubles totales de oncosferas [O]; postoncosferas [PO] de 15 días [15d], 30 días [30d] y 60 días [60d] de cultivo; y cisticerco [C]. B) proteínas excretorio secretorio de postoncosferas de 30 días de cultivo incubadas con un pool de suero de pacientes con NCC (carril 2) y un pool de suero de personas sin NCC (carril 3). M= marcador de peso molecular en kilodaltons (kDa); las flechas rojas señalan las proteínas de 46 y 48 kDa de postoncosferas; la flecha azul señala las proteínas de 50 kDa de cisticerco.

4.2.2. Evaluación de la utilidad de las proteínas de los estadios postoncosferales en el diagnóstico inmunológico de la NCC

Se evaluó sueros individuales de pacientes con NCC confirmados por neuroimagen. En la figura IV-8 se muestra el patrón de bandas observados en el Western blot usando proteínas de las formas postoncosferales de 30 días de cultivo, se observa las bandas de 46 kDa y 48 kDa, además de una banda de 23 kDa que son reconocidos por el suero de un paciente con NCC. También se muestra el resultado del western blot del mismo paciente usando el estándar de oro (LLGP-EITB).

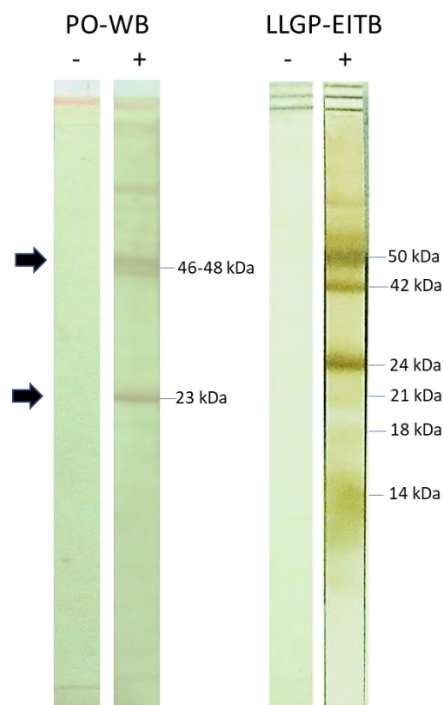


Figura IV-8. Comparación del patrón de bandas observados en el Western blot usando proteínas solubles totales de estadios postoncosferales de 30 días [PO-WB] y glicoproteínas purificadas de cisticercos [LLGP-EITB].

Incubados con suero de una persona sin NCC [-] y suero de una persona con NCC [+].

En la tabla IV-2 se presenta los resultados del western blot usando las proteínas solubles totales de postoncosfera (PO-WB). El 98% (49/50) de pacientes con NCC parenquimatosa fueron positivos al PO-WB; y el 100 % (20/20) de pacientes con NCC subaracnoidea fueron positivos al PO-WB. Del grupo de personas sin NCC, el 100 % (10/10) fueron negativos al PO-WB. El grupo de pacientes que presentan cisticercos calcificados y que son negativos a la prueba del LLGP-EITB, fueron también negativos al PO-WB.

Tabla IV-2. Resultados del Western blot de proteínas de postoncosferas de *T. solium* incubadas con sueros individuales de personas con y sin NCC.

PO-WB	Sensibilidad			Especificidad
	NCC Parenquimatosa, LLGP-EITB positivo	NCC subaracnoidea, LLGP-EITB positivo	Calcificado, LLGP-EITB negativo	
Cualquier banda	49/50 (98%; IC95%, 89.35-99.95)	20/20 (100%; IC95%, 83.16-100)	0/20	10/10 (100%: IC95%, 69.15-100)
Banda de 46-48 kDa	47/50 (94%; IC95%, 83.45-98.75)	20/20 (100%; IC95%, 83.16-100)	0/20	10/10 (100%: IC95%, 69.15-100)
Banda de ~23 kDa	46/50 (92%; IC95%, 80.77-97.78)	20/20 (100%; IC95%, 83.16-100)	0/20	10/10 (100%: IC95%, 69.15-100)

IC= intervalo de confianza; PO-WB= western blot utilizando proteínas solubles totales de postoncosfera de 30 días; LLGP-EITB= Inmunoelectrotransferencia blot con glicoproteínas purificadas con lentejas de lectina. El cálculo se muestra en el anexo 22

4.2.3. Respuesta inmune humoral contra las proteínas de postoncosferas

Los pacientes con NCC presentan anticuerpos contra los estadios postoncosferales; para conocer en qué momento de la infección con *T. solium* se forman los anticuerpos contra las proteínas de postoncosferas, se utilizó el modelo animal de NCC.

Las ratas infectadas con postoncosferas forman anticuerpos contra las proteínas de 46-48 kDa (anexo 4), confirmando que, si es posible evaluar la respuesta humoral contra las proteínas de postoncosfera en las ratas. Por lo cual se procedió a infectar a un grupo de ratas, con oncosferas activadas de *T. solium* para evaluar en qué momento de la infección aparecen los anticuerpos contra las proteínas de 46-48 kDa.

De las 9 ratas infectadas, 7 desarrollaron NCC confirmado por necropsia (figura IV.9), siendo el porcentaje de infección 78%. Las ratas control no desarrollaron NCC. De las 7 ratas que desarrollaron NCC, el 43% (3/7) formaron anticuerpos anti – postoncosfera a partir del primer mes de infección, el porcentaje de ratas con anticuerpos anti - postoncosfera incremento a 100% (7/7) a partir del segundo mes después de infección. A los 6 meses post infección los anticuerpos anti -postoncosfera continuaron presentes en el suero de las ratas con NCC (figura IV-9C, anexo 5). Al final del experimento, solo 3 ratas con NCC cumplieron el año de infección, y los 3 aún presentaban anticuerpos anti-postoncosfera. Estos resultados sugieren que los anticuerpos contra las postoncosferas empiezan a formarse a partir del primer mes de infección y que estos perduran incluso hasta después de haberse desarrollado el cisticerco en el cerebro.

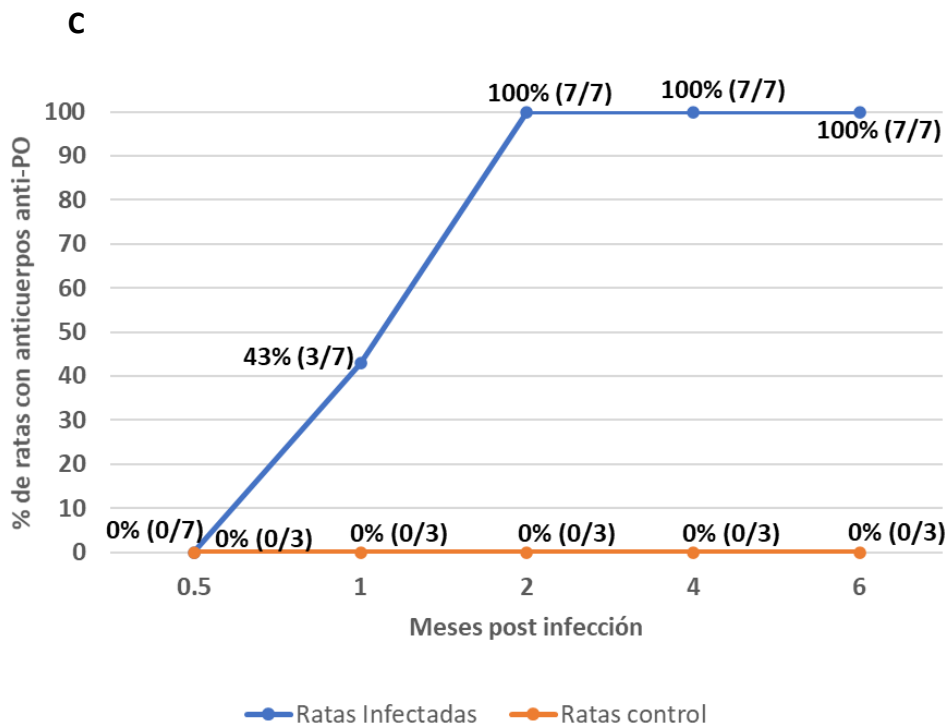
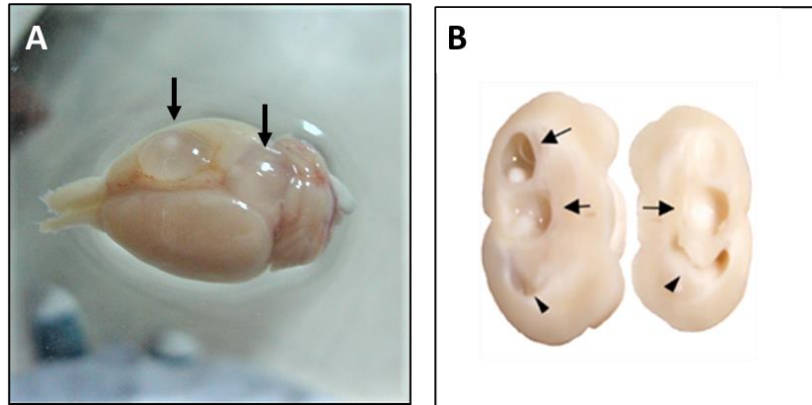


Figura IV-9. Infección de ratas con oncosferas activadas de *T. solium*.

Cisticercos extraparenquimales (A) e intraparenquimales (B) que desarrollaron en el cerebro de rata a los 6 meses post infección. Las flechas señalan a los cisticercos. C) Porcentaje de ratas que formaron anticuerpos anti-postoncosfera. La formación de anticuerpos anti – postoncosfera (banda de 46-48 kDa) se evaluó mediante Western blot.

4.2.4. Identificación de proteínas de postoncosfera reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC, por espectrometría de masas

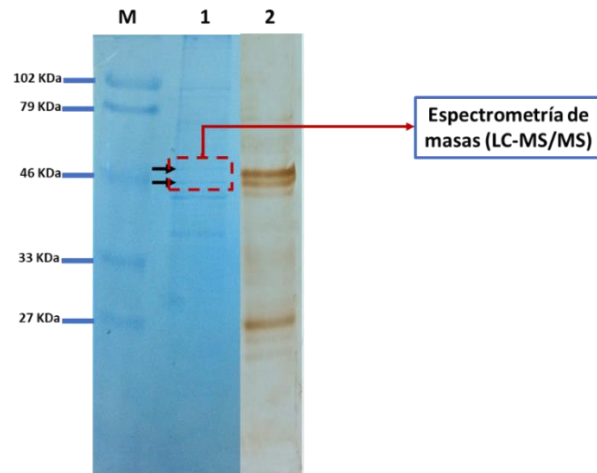
Para la identificación de proteínas de postoncosferas reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC, se utilizó dos estrategias: la primera fue a partir de la banda de 46-48 kDa obtenido del SDS-PAGE, y la segunda fue a partir de los spots de la electroforesis bidimensional (2D).

4.2.4.1. Proteínas identificadas por SDS-PAGE y LC-MS/MS

Usando la base de datos de T. solium. A partir de la banda de 46 - 48 kDa de las proteínas solubles totales, se identificó 14 proteínas (anexo 6). Y a partir de la banda de 46-48 kDa de las proteínas E/S se identificó 6 proteínas (anexo 7). Para ambos casos las secuencias de los péptidos obtenidos por espectrometría de masa fueron alineados con las secuencias de las proteínas reportadas en la base de datos de *T. solium* para su identificación.

Las proteínas factor de elongación 1 alfa, actina, enolasa y el producto proteico sin nombre se identificaron en ambos tipos de proteínas. El factor de elongación 1 alfa es la proteína más abundante en la banda de 46 y 48 kDa de las proteínas solubles totales mientras que el producto proteico sin nombre es la proteína más abundante en la banda de 46 y 48 kDa de las proteínas E/S (figura IV-10).

A)



B)

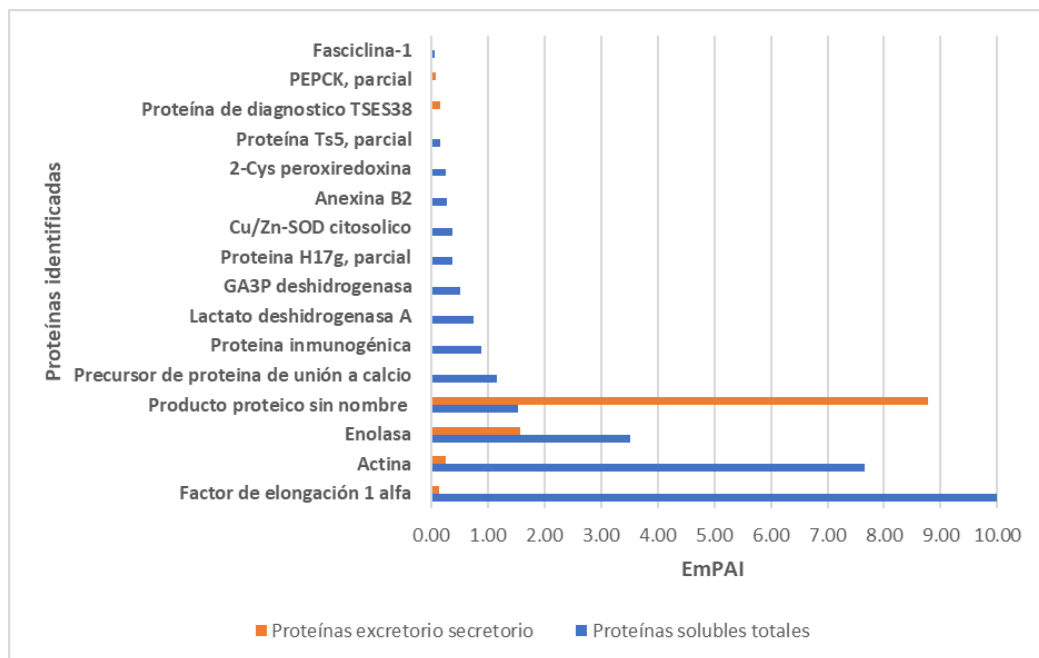


Figura IV-10. Proteínas identificadas en la banda de 46 y 48 kDa mediante LC-MS/MS y análisis proteómico usando la base de datos de *T. solium*.

A) Bandas de 46 y 48 kDa que fueron cortadas de un gel de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie G-250. B) Proteínas identificadas en la banda de 46-48 kDa tanto del gel con proteínas solubles totales como del gel con proteínas excretorio secretorio. EmPAI= *Exponentially Modified Protein Abundance Index*

Usando la base de datos de E. granulosus. A partir de la banda de 46-48 kDa de las proteínas solubles totales se identificaron 73 proteínas (anexo 8). Y en la banda 46-48 kDa de las proteínas E/S se identificaron 20 proteínas (anexo 9); para ambos casos se usó la base de datos de proteínas reportadas para *E. granulosus*, para identificar proteínas similares no reportadas en *T. solium*.

Las proteínas: actina citoplasmática 2, enolasa, factor de elongación 1 alfa, proteína hipotética ERG_05011, ubiquitina, factor *splicing* rico en serina/arginina y fosfoglicerato quinasa fueron identificado en ambos tipos de proteínas. El factor de elongación 1 alfa es la proteína más abundante en las proteínas solubles totales, mientras que enolasa es más abundante en las proteínas E/S (figura IV-11).

De las 73 proteínas solubles totales identificadas usando la base de datos de *E. granulosus*, 47 son proteínas no reportadas en la base de datos de proteínas de *T. solium*. Y en el caso de las 20 proteínas E/S identificadas usando la base de datos de *E. granulosus*, 16 son proteínas no reportadas en la base de datos de proteínas de *T. solium*.



Figura IV-11. Proteínas identificadas en la banda de 46 y 48 kDa mediante LC-MS/MS y análisis proteómico usando la base de datos de *E. granulosus*.

EmPAI= *Exponentially Modified Protein Abundance Index*.

4.2.4.2. Proteínas identificadas por electroforesis en 2D y MALDI-TOF/TOF

En el segundo experimento las proteínas solubles totales de postoncosferas de 30 días fueron separadas por punto isoelectrico y peso molecular por electroforesis en 2D, e incubados con un pool de suero de pacientes con NCC. En la figura IV-12 se observan *spots* que representan las proteínas reconocidas por el pool de sueros de pacientes con NCC, de estas proteínas se seleccionó 16 *spots* (rango de 15 a 75 kDa) que fueron visibles en el gel teñido con azul de Coomassie. Por MALDI-TOF/TOF y análisis proteómico, las 16 proteínas fueron identificadas con una alta confiabilidad (tabla IV-3). En el caso del spot 5, una proteína adicional ha sido identificado haciendo un total de 17 proteínas.

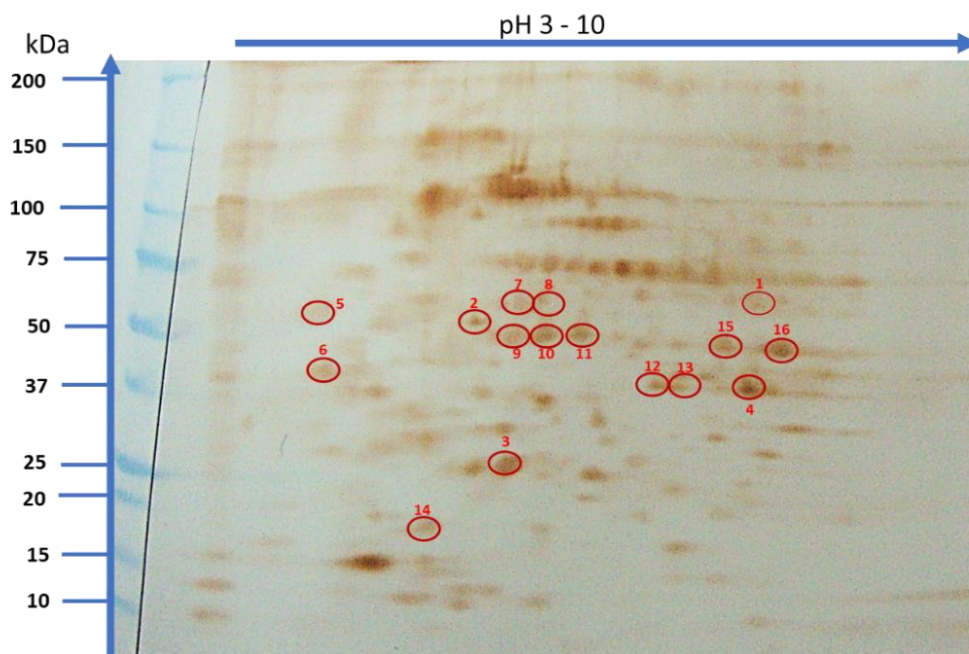


Figura IV-12. Electroforesis en 2D y western blot de las proteínas de postoncosferas de *T. solium*.

Proteínas solubles totales de postoncosferas de 30 días incubados con un pool de suero de pacientes con NCC. Los círculos indican las proteínas seleccionadas para la identificación por espectrometría de masa.

Tabla IV-3. Proteínas identificadas en las proteínas solubles totales de postconosferas de 30 días de cultivo mediante MALDI-TOF/TOF y análisis proteómico. Esta lista incluye la mejor coincidencia para cada muestra.

# spot	Nombre de la proteína	No. De acceso	Organismo	MW (kDa)	PI	Score proteína C. I. (%)	Ion total C.I. (%)	# de péptidos
1	Transcetolasa	gi 674563860	<i>E. granulosus</i>	67.72	6.3	100		6
2	Precursor Proteína de unión a calcio	gi 14029538	<i>T. solium</i>	45.54	4.4	100		11
3	p27	gi 333101790	<i>T. solium</i>	26.68	5.1	100		7
4	Inhibidor de disociación Rab GDP	gi 576694030	<i>E. granulosus</i>	50.17	5.9	99.9		5
5	Metaloproteínasa asociada a membrana	gi 73672819	<i>T. solium</i>	54.51	6.2		99.6	3
	Antígeno diagnostico GP50, parcial	gi 37789875	<i>T. solium</i>	29.72	8.8		77.7	2
6	TSES38 antígeno de diagnóstico	gi 226894774	<i>T. solium</i>	30.56	4.7		95.4	3
7	Actina	gi 161652	<i>T. solium</i>	41.71	5.3	100	100	17
8	Actina	gi 161652	<i>T. solium</i>	41.71	5.3	100	100	12
9	Actina	gi 161652	<i>T. solium</i>	41.71	5.3	100	100	20
10	Actina	gi 161652	<i>T. solium</i>	41.71	5.3	100	100	22
11	Actina	gi 161652	<i>T. solium</i>	41.71	5.3	100	100	14
12	Anexina B3	gi 63029698	<i>T. solium</i>	34.83	5.5	100	100	21
13	Anexina B3	gi 63029698	<i>T. solium</i>	34.83	5.5	100	100	11
14	Transportador de aminoácido Y+L	gi 576691120	<i>E. granulosus</i>	30.04	4.9		96.9	1
15	Enolasa	gi 563425937	<i>T. solium</i>	46.52	6.5	97.6		10
16	Enolasa	gi 563425937	<i>T. solium</i>	46.52	6.5	100	100	7

MW=peso molecular, C.I.= intervalo de confianza.

4.2.4.3. Análisis de las proteínas identificadas

A. Proteínas identificadas por LC-MS/MS

Las proteínas identificadas por LC-MS/MS, fueron ordenadas en base al peso molecular (anexo 10). 13 proteínas están en el rango de 45.5-49 kDa que podrían ser parte de las proteínas que se encuentran en la banda de 46 - 48 kDa de las postoncosferas de *T. solium*. De estas proteínas, 3 fueron identificadas en la base de datos de *T. solium* y 8 en la base de datos de *E. granulosus*.

Proteínas reportadas en la base de datos de *T. solium*

Las 3 proteínas identificadas son: el precursor de la proteína de unión a calcio (45.5 kDa), enolasa (46.5 kDa) y el factor de elongación 1 alfa (48.8 kDa), además, en este grupo de proteínas se consideró al producto proteico sin nombre/ antígeno GP50 (32.9 kDa) reportada como una proteína glicosilada de 50 kDa (80). En la tabla IV-4 se muestra la información y los resultados de la predicción del tipo, localización y función de las proteínas identificadas.

Factor de elongación 1 alfa. Esta proteína ha sido identificada en las proteínas solubles totales y en el E/S de las postoncosferas, sin embargo, en la predicción esta proteína no tiene la secuencia señal para ser secretado por la vía clásica y no clásica, sugiriendo otra vía de secreción. Los péptidos identificados por espectrometría de masas llegan a cubrir el 41.5 % de la secuencia completa de la proteína (anexo 11). La función de esta proteína es la elongación de la cadena peptídica durante la síntesis de proteínas.

Tabla IV-4. Proteínas identificadas en la banda de 46-48 kDa de las proteínas de postoncosfera.

Proteína	Péptidos identificados	emPAI		Localización	Signal P	MW (kDa)	Proceso biológico	
		ST	ES					
Factor de elongación 1 alfa [<i>T. solium</i>]	R.LPLQDVF.K I R.FQEISSEM.K A R.GITIDIALWK.F K.RFQEISSEM.K A K.YLVTIIDAPGHR.D R.EHALLAFTLGVK.K R.GNVAGDSKNHPPRE K.GPTLLASIDLVEPPTRPVDKPLR.L R.VETGIMKPGMIVTFAPVGISTEVK.S K.NMITGTSQADCAILVVAAGTGEFEAGISK.N R.TTGIVLDSGDGVTHSVPIYEGYALPHAILR.L	K.CDVDIRK.D K.MDAVDYSEK.R K.MDAVDYSEKR.F K.ISGIGTVPVGR.V K.IKSGDAAIVR.M K.AGFAGDDAPR.A	9.99	0.14	Citoplasma	No	48.8	Biosíntesis de proteínas
Enolasa [<i>T. solium</i>]	K.YNQLLR.I R.VQQAIDKK.A K.AVYAGEHFR.N R.AAGWGVMSHR.S K.FIVTDQEKIDEFMIR.L K.LAMQEFMILPTGAK.N K.IGMDVAASEFYQDGK.Y R.SGETEDSTIADIVVGLR.T K.AGIQIVGDDLTVTNPER.V R.AAVPSGASTGVHEAVELR.D	K.IDEFMIR.L K.KACNALLK.V K.LAEIYLEMLSK.Y K.VNQIGSVTESIK.A K.MGTEVYHHLK.S	3.52	1.58	Citoplasma	No	46.5	Proceso glucolítico
Producto proteico sin nombre* o antígeno de diagnóstico GP50 [<i>T. solium</i>]	K.DTPWFR.V R.ESFAFAGLK.T K.IMEMDEITARPR.V K.DLSTLVATMPAYATK.T K.GAEFCTDMVKDESADLR.V K.VKDLSTLVATMPAYATK.T R.VIGKPSGSDTMSYENDNYR.T K.TALTVSIDYSQSGISPEVADCK.Q	R.VFRGVFPR.K R.FVKDTPWFR.V K.GAEFCTDMVK.D	1.54	8.78	Membrana	Yes	32.9	Ninguna predicción
Precursor de proteína de unión a calcio, Calreticulina [<i>T. solium</i>]	K.HEQNIDCGGGYVK.L K.GDFDDKEDGGMR.T R.TFAYIGLDLWQVK.S K.TAETGSLVADFDMIPPR.T K.SKYDESNLGLCEYAKPK.G K.SGTIFDNFIVSDNVSECAHAHEYWQK.R	K.MIPNPAYR.G R.YSAPFNKPLSNK.D	1.16		Retículo endoplásmico	Yes	45.5	Plegamiento de proteínas

*Proteínas que hacen match con el mismo set de péptidos: antígeno de diagnóstico GP50 gi|37787345, gi|37787347, gi|37787357, gi|37789875 y gi|37789877. emPAI= cuantificación relativa de proteínas en una mezcla. MW= peso molecular. ST= proteínas solubles totales. ES= proteínas excretorio secretorio.

Enolasa. También fue identificada en las proteínas solubles totales y en el E/S de las postoncosferas. Sin embargo, en la predicción esta proteína no tiene la señal para ser secretada por la vía clásica y no clásica, sugiriendo otra vía de secreción. Esta proteína tiene un peso molecular de 46.5 kDa y los péptidos identificados por espectrometría de masa cubren el 52.2% de la secuencia completa (anexo 12). Enolasa es una enzima de tipo liasa que participa en la glucólisis.

Producto proteico sin nombre. Esta proteína fue identificada en las proteínas solubles totales y en el E/S, lo cual coincide con la predicción, ya que presenta el péptido señal para ser secretado por la vía clásica. Los péptidos identificados por LC-MS/MS además de emparejar con esta proteína también emparejaron con las siguientes proteínas: producto proteico sin nombre parcial (gi|17901100, gi|17901102); precursor del antígeno de diagnóstico GP50a (gi|37787345), GP50b (gi|37787347), GP50c (gi|37787357); y con la secuencia parcial del antígeno de diagnóstico GP50 (gi|37789875, gi|37789877). Los péptidos identificados fueron usados para buscar la secuencia completa de la proteína en la base de datos del genoma de *T. solium*, se encontró una secuencia correspondiente al antígeno de diagnóstico GP50 (TsM_000313800) que alineo con todos los péptidos identificados (anexo 13). Sugiriendo que el producto proteico sin nombre es el antígeno GP50 de *T. solium*. El peso molecular de la proteína completa GP50 es de 32.98, pero por literatura se conoce que la GP50 es una proteína glicosilada de 50 kDa aproximadamente, por lo que podría estar en la banda de 46-48 kDa de las postoncosferas de *T. solium*. Los péptidos identificados por espectrometría de masa cubren el 48.3% de la secuencia completa de la proteína.

Precursor de la proteína de unión a calcio. Esta proteína (gi|14029538) fue identificada en las proteínas solubles totales de las postoncosferas, y tiene un peso molecular de 45.5 kDa. Los péptidos identificados llegan a cubrir el 42.3% de la secuencia total de la proteína (anexo 14). Según la predicción, esta proteína tiene péptido señal y su localización es el retículo endoplasmático donde actúa como chaperona en los procesos de plegamiento de las proteínas.

Proteínas no reportadas en la base de datos de *T. solium*

8 proteínas no reportadas en la base de datos de *T. solium* fueron identificados en la banda de 46-48 kDa de postoncosferas, usando la base de datos de *E. granulosus*: una anexina (47.4 kDa) en las proteínas E/S; y 7 en las proteínas solubles totales de postoncosferas (tabla IV-5).

Anexina. Los 3 péptidos identificados por espectrometría de masas que alinearon con la proteína anexina de *E. granulosus* (gi|674561213), alinearon con una secuencia de la base de datos del genoma de *T. solium* (TsM_000511100) (Anexo 15). El peso molecular es de 47.4 kDa, la secuencia identificada también fue alineada con anexinas reportadas en *T. solium* (anexina B1, B2 y B3), se observó que esta secuencia presenta el motivo K-G-X-G-T que es conservado en las anexinas (figura IV-13). La secuencia de *T. solium* también fue modelada por homología con proteínas cristalizadas, usando el servidor SWISS-MODEL (figura IV-14), la estructura tridimensional de la anexina de *T. solium* consiste básicamente de alfa hélices como estructura secundaria, y tiene el sitio de unión a calcio que también es característico de las anexinas.

Tabla IV-5. Proteínas identificadas en la banda de 46 - 48 kDa de las proteínas de postoncosferas, usando la base de datos de *E. granulosus*

Proteína	Péptidos identificados	emPAI		Localización	Sec P	MW (kDa)	Proceso biológico	Función molecular	% identidad*
		ST	ES						
Anexina [TsM_000511100]	K.ILVALLQAQR.E R.DKALMQLVLGR.C K.AIENDTSGDYKR.M		0.22	Núcleo	Si	47.4	Ninguno	Unión a calcio	84.7
Proteína hipotética EGR_06985 [TsM_000276900]	K.ENLEGAWVILSEVAR.G	0.06		Núcleo	Si	46.6	Transporte mediado por vesículas	Unión a proteínas	38.5
Proteína ribosomal 60S L4 [TsM_001179700]	K.LAPGGMGR.F R.FTIWTEGAFR.T K.AGHQTSAESWGTGR.A R.SDVLFNFVHDSLRR.N R.FAMCSAIAATGVPALVMAR.G	0.65		Citoplasma	No	46.9	Traducción	Componente estructural del ribosoma	80.9
Proteína ribosomal 60S L3 [TsM_000850600]	K.GCCMGPR.K R.HGSLGFTPK.K R.VIAHTQMR.L	0.05		Citoplasma	No	47.6	Traducción	Componente estructural del ribosoma	41.4
Proteína asociada a proliferación 2G4 [TsM_000488200]	K.EFVAQFR.F R.KNETLYHLK.M K.IIELCEYGDR.R K.AVADFDCRPIQGVQSHLLK.K	0.25		Citoplasma	No	47.0	No hay término GO	No hay término GO	78.5
Subunidad 6A reguladora del proteosoma 26S [TsM_000546900]	K.AVCVEAGMIALR.R K.DRFDAIGIQPPK.G R.KIEFPTPNEEAR.S K.LAAPQLVQMFIDGAK.L R.KMNVHEDVNFELAR.C K.EKAPAIIFIDELDAIGTK.R	0.64		Citoplasma	No	47.9	Proceso catabólico de proteínas	Activación del proteosoma	77.7
Subunidad 6B reguladora del proteosoma 26S [TsM_000506400]	K.RFDAQTGADR.E K.AVAHHTTAAFIR.V K.EYMHAQEEVQR.I R.FDAQTGADREVQR.I K.ISGADINAICQEAGMQAVR.E	0.38		Núcleo	Si	46.6	Proceso catabólico de proteínas	Activación del proteosoma	100
Proteína de unión a histona RBBP4 [TsM_000275100]	K.INHEGEVNR.A K.HPSKPDPSGVCEPELR.L	0.23		Núcleo	Si	48.4	Ninguno	Unión a proteínas	99.8

*Porcentaje de identidad con *E. granulosus* proteínas. emPAI= cuantificación relativa de proteínas en una mezcla. MW= peso molecular. ST= proteínas solubles totales. ES=proteínas excretorio secretorio

```

ANB2 ----- 0
ANB1 ----- 0
TsM_000511100 MAGYPPVGFNINPDAPAGYPPQGPMGYPPQGVHPQGGQMGYPPQGQMGYPPQGPMPQL 60
ANB3 ----- 0

ANB2 -----MAKN 4
ANB1 -----MAY 3
TsM_000511100 PPQGGQMGYPPYGGQPGYGGAPLPQGGPTNVPGYGVSQPMGSGYGAGALGDPSPGYGGGAA 120
ANB3 ----- 0

ANB2 TRSPSQYFDCNGKPFRTLPKPNPNFDVNADVEALCKSMRCWGTDEETITKILGKRTSEER 64
ANB1 CRSLVHLYAPNGEKYKPTITPTPGFSPTADAEHLKRAMRGLGTNERAIIDILGNRTSAER 63
TsM_000511100 VGSFSAY-----YSGRPTVVPMPNPNPGQDAEDLRKAMRGMGTDEGRIIGVLSKRTSNQR 175
ANB3 -----MATVKPFRCFNANEDAQELEKAMKIGTDEATIIDVLNRTSSQR 45
                * : * * . * . : * * : : * * : * : * * : *

ANB2 LQIVSLYKQKYGRELAHDLDGLKGFHFRDCTILLTEDPIYLMAKSLYYAMKGVGTNENTI 124
ANB1 MAIRDAYPSISSKTLHDALTSELSGKFRRFALLLIQSPWQVMAEALYDAMKAGTNERKERV 123
TsM_000511100 SEIAKKYKASFGKDLEKHLKSELSGKFEDLVLLSLESPLGMLATTIYQAVKGVGTDEQLL 235
ANB3 REIVKAYKAQYGGKDLKERLHKELSGNFRQAVEWSLYDRAHVNAALQKAMKAGTNEGML 105
                * . * . : * . * : * . * . . : * : : * : * * * * * :

ANB2 IEIIVGCTNEEINKLKQFYIYVLRDKGIKDPKRTLETDIRTETTGYFCMMLQLLKGDIP 184
ANB1 NEIIAGCSKDDIPQLKKAFFEV-----GGETLDDAIKGDTSGDYREALLLAGQAD 176
TsM_000511100 IQALVPYPNSIVGEISKAYHTKY-----GR-DVVEDVRSDTSGDFEKILVALLQAQRE 287
ANB3 IDVLCATNNEVKKIKEAYEDLT-----QK-SLEDDVESETSGNFKRVLVALQARRE 157
                : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

ANB2 DPTPEQLRTIQKGGDLMVNQKEVTAAVKQIVEALAKPKNSTNSVLLNAPQHKNVWEIAA 244
ANB1 EPQAMQLKNLTPSTLSQVNPGLAETDAKELYACGEGRPGTAESRFMRPVIIVRSFLQLNA 236
TsM_000511100 E RTP-----VSVNGAAADAALYKAGENRNLGTEEAFTIRILTRQSRFEQIKA 333
ANB3 TACD-----KQAREDALEIFKAGEDKLGTDSTFTRILCTRSHDQIRV 201
                . . : . . : : : : : : : : :

ANB2 MDKEYKKASGKLISAISEAVEGEGFTLLMAMVQHAVDRPKFYSEALYQSMVGQGRDFL 304
ANB1 TNEAYNRAYGHPLIDAIKKETSRDLEDFLITRVRYATDRASLFAELLHFAMRGAGTKDST 296
TsM_000511100 IAQSYQQKYGRSLESIAIKKETSGNYKDAMVSIIVRYAEDKNALLAALWYESVMGMGTRDKS 393
ANB3 INEVYEDEAGHDLIKAIKKETSGDYKVLRSRIVLMSKDPIGTVADMILYRSMKAGTKDSD 261
                : * : * : * * * . : : : : : * : * : * : * * * * *

ANB2 LMRVLIIRSEIDLLDIKETFDKD-HKSLAEWIKGETSGYEQLLLALLNES 354
ANB1 LQRVLALRADTDLGSIKEKYAELYGETLEAAIKGDTSGDYEAALCLKLIGPA 347
TsM_000511100 LMQLVLRCEIDLQDVKEAYQRKYKSLVKAIENDTSGDYKRMLVALVGP- 443
ANB3 LIRIILAHSEDNLRKIQNKFDDTYEKSLEVMISGDTSGDYKFLLAILE-- 310
                * : : : : * : : : : : : * : * * * * * : : : : :

```

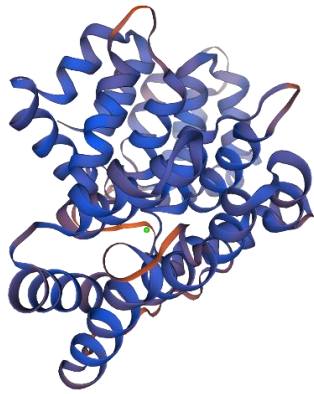
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: ANB2	100.00	33.82	33.74	33.98
2: ANB1	33.82	100.00	38.96	37.10
3: TsM_000511100	33.74	38.96	100.00	45.16
4: ANB3	33.98	37.10	45.16	100.00

Figura IV-13. Alineamiento de anexinas de *T. solium* con la secuencia TsM_000515500 que codifica para una proteína similar a anexina.

ANB1= anexina B1 (GenBank: AAD34598.1), ANB2 (GenBank: AAY17503.1), ANB3 (GenBank: AAY27744.1). La flecha señala el motivo K-G-X-G-T que es conservado en las anexinas.

A)



B)

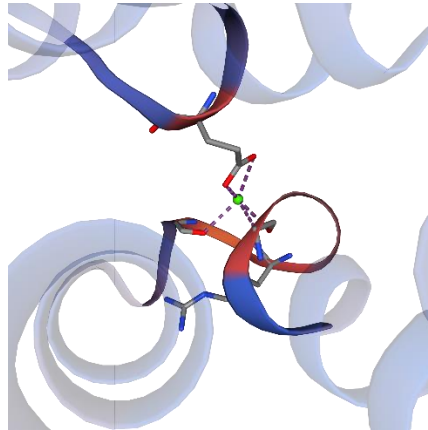


Figura IV-14. Modelo tridimensional de la secuencia TsM_000511100 de *T. solium* similar a anexina.

A) Se muestra la estructura tridimensional de la proteína obtenida por modelamiento con la anexina cristalizada 1axn.1 usando el programa SWISS-MODEL, la alfa hélice es la principal estructura secundaria de esta proteína. B) Se muestra la unión a calcio (esfera verde).

La información de las otras 7 proteínas se muestra en la tabla IV-5. Según la predicción 3 son secretadas por la vía no clásica. La función de estas proteínas es: la unión a proteínas, componentes estructurales del ribosoma y activación del proteosoma.

B. Proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF.

3 son proteínas que también han sido identificadas en la banda de 46-48 kDa (enolasa (2 spots), precursor de proteína de unión a calcio y antígeno de diagnóstico GP50) descritas en la tabla IV-4. Por otro lado, 3 son proteínas no reportadas en la base de datos de proteínas de *T. solium*: Transcetolasa, inhibidor de disociación Rab GDP y el transportador de aminoácidos Y+L. Buscando en la base de datos del genoma de *T. solium* se encontró 2 secuencia que hacen match con los péptidos identificados para Transcetolasa y el inhibidor de disociación Rab GDP, no se encontró una secuencia en el caso del transportador de aminoácidos Y+L. Las otras proteínas identificadas fueron: actina (5 spots), anexina B3 (2 spots), p27, metaloproteínasa asociada a membrana y el antígeno de diagnóstico TSES38 (tabla IV.6). La p27 y la metaloproteínasa han sido reportadas como proteínas reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC (134–136).

Tabla IV-6. Información de proteínas identificadas por MALDI-TOF/TOF

No. acceso	Proteína	Localización	Signal P	MW (kDa)	Proceso biológico/ Función molecular
gi 333101790	P27	Núcleo	No	26.6	Unión a proteínas
gi 226894774	TSES38 antígeno de diagnóstico	Extracelular	Si	30.5	No hay termino GO
gi 63029698	Anexina B3	Citoplasma	No	34.8	Unión a calcio
gi 161652	Actina	Citoplasma	No	41.7	No hay termino GO
TsM_000761500	Inhibidor de disociación Rab GDP	Citoplasma	No	50.2	Transporte de proteínas
gi 73672819	Metaloproteínasa asociada a membrana	Retículo endoplásmico	No	54.5	Proteólisis
TsM_000587600	Transcetolasa	Mitocondria	No	70.5	Actividad catalítica

4.2.5. Localización de las proteínas de postoncosfera identificadas por espectrometría de masas

4.2.5.1. Obtención de proteínas recombinantes de postoncosferas

Selección de proteínas y diseño de cebadores

Se seleccionó las proteínas de 45.5 kDa a 49 kDa que fueron identificados usando la base de datos de *T. solium* (tabla IV.4) a excepción de enolasa debido a que se cuenta con la proteína recombinante de enolasa obtenida por Ponce et al. 2018 que es 99.5% idéntica a la enolasa identificada por espectrometría de masa (anexo 12). También se seleccionó la proteína anexina B2.

En la tabla IV-7 se muestran las proteínas seleccionadas, así como la secuencia de los cebadores diseñados. Los cebadores “forward” tienen una secuencia adicional corta de 8 nucleótidos el cual incluye el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BamHI (5’GGATCC3’) mientras que los cebadores “reverse” tienen una secuencia adicional corta de 8 nucleótidos que incluye el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Sall (5’GTCGAC3’). También se muestra las temperaturas óptimas para el “*annealing*” así como los resultados del RT-PCR.

Todos los pares de cebadores diseñados amplificaron la secuencia esperada (anexo 16).

Tabla IV-7. Cebadores y condiciones de ciclamiento para el RT- PCR. Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción están subrayados.

Proteína	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'→3')	Producto (pb)	Temperatura <i>annealing</i>	Resultado RT-PCR
GP50	Ts50_F	CC <u>GGATCC</u> GAAAATGCCCAAAGATGT	849	60°C	Amplificó
TsM_000313800	Ts50_R	GG <u>GTCGAC</u> TCACAAAACCATTGGTATCA			(Ts50)
Precursor de proteína de unión a calcio gi 14029538	TsCBP_F	CC <u>GGATCC</u> ATGGCTGTTCTGCGTTT	1188	58°C	Amplificó
	TsCBP_R	GG <u>GTCGAC</u> CTACAATTCATCCTTCGAG			(CBP)
Factor de elongación gi 269935947	TsNEF_F	CC <u>GGATCC</u> ATGGGCAAATCCTCTTTCAAGT	1035	56°C	Amplificó
	TsNEF_R	GG <u>GTCGAC</u> CTGGGGACCATCCTGAC			(NEF)
Anexina B2 gi 62868630	TsAnB2_F	CC <u>GGATCC</u> ATGGCAAAAATACTCGCTCAC	1065	54°C	Amplificó
	TsAnB2_R	GG <u>GTCGAC</u> TTAGGATTCATTCAGTAGTGCG			(ANB2)

F= forward, R=Reverse.

Clonación de los genes que codifica las proteínas seleccionadas

Se seleccionó solo 3 de los 4 productos de amplificación. Los productos digeridos fueron ligados cada uno al plásmido pGEX-6P-1 digerido (anexo 17) y el producto de la ligación fue introducido en células DH5 α . No se realizó la clonación de la secuencia codificante para la síntesis de la proteína GP50 debido a que es una proteína glicosilada que requiere un sistema de expresión eucariota. En los 3 casos, se obtuvieron colonias que tuvieron el plásmido con el inserto esperado, el cual fue confirmado por PCR-colonia, digestión del plásmido y secuenciamiento. Los resultados para la clonación de la región codificante para la proteína de unión a calcio se muestran en la figura IV.15 y anexo 18. Resultados similares se obtuvieron para el factor de elongación alfa 1 y anexina B2 (anexo 19-21).

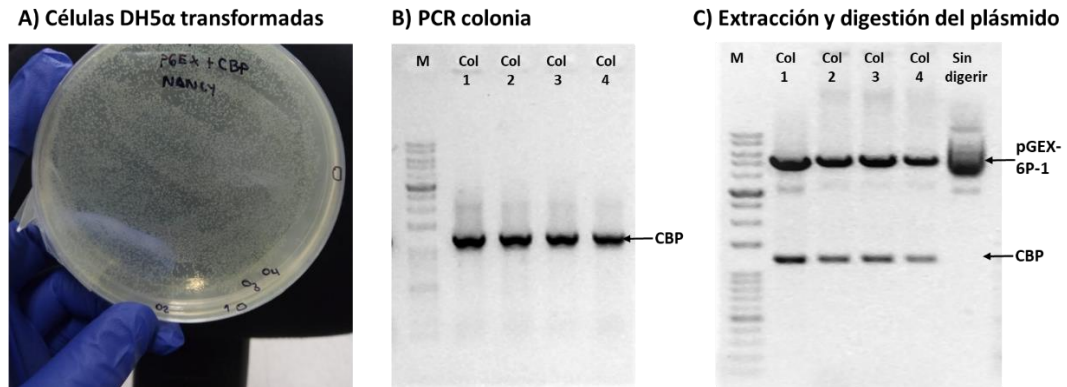


Figura IV-15. Clonación en células DH5 α de la secuencia que codifica para el precursor de proteína de unión a calcio (CBP).

A) Placa con agar LB más ampicilina mostrando las colonias de células DH5 α transformadas con el plásmido pGEX + secuencia CBP. B) Resultado de la PCR-colonia de 4 colonias seleccionadas de la placa. C) Resultado de la digestión del plásmido de las 4 colonias seleccionadas. M= marcador de pares de bases (DNA 1kb (Opti-DNA Marker, ABM). Col= colonia.

Expresión, extracción y purificación de proteínas recombinantes

Los plásmidos conteniendo el inserto esperado fueron extraídos, purificados e introducidos en células BL21. Para los 3 casos, las células BL21 expresaron la proteína con el tamaño esperado. En la figura IV-16 se muestra el resultado de la inducción de la expresión para la proteína de unión a calcio, que tiene un peso molecular por debajo de 75kDa que correspondería al peso molecular de la proteína fusionada a GST (proteína de unión a calcio= 45.7 kDa y GST=26 kDa); resultados similares se obtuvieron para la proteína factor de elongación nuclear y para anexina B2.

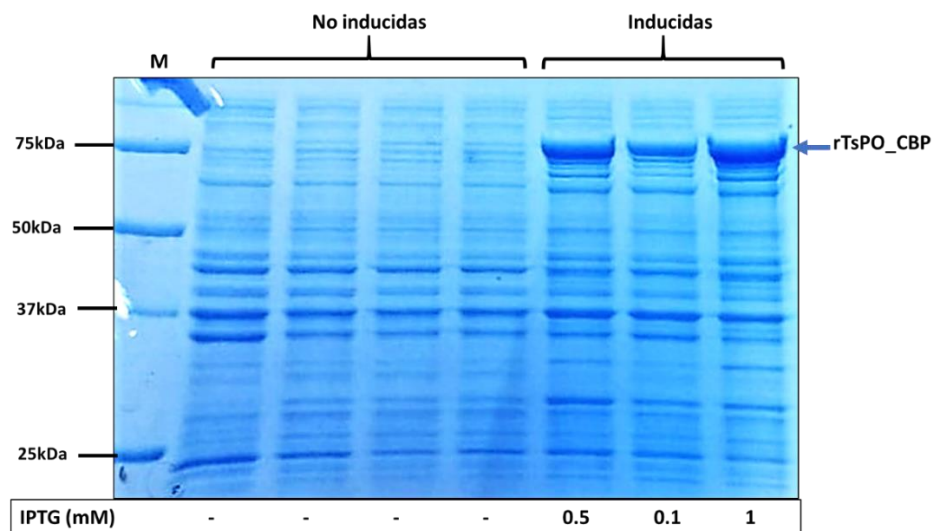


Figura IV-16. SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de las células BL21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1+CBP.

M= marcador de peso molecular para proteínas. rTsPO_CBP= proteína recombinante precursor de proteína de unión a calcio de postoncosferas de *T. solium*.

Se realizó la extracción y purificación de 2 proteínas recombinantes: la proteína de unión a calcio y anexina B2 que fueron solubles (figura VI-17 y VI-18). En el caso

de la proteína factor de elongación alfa 1, esta resultó insoluble por lo cual no se pudo continuar con la purificación (figura VI-19).

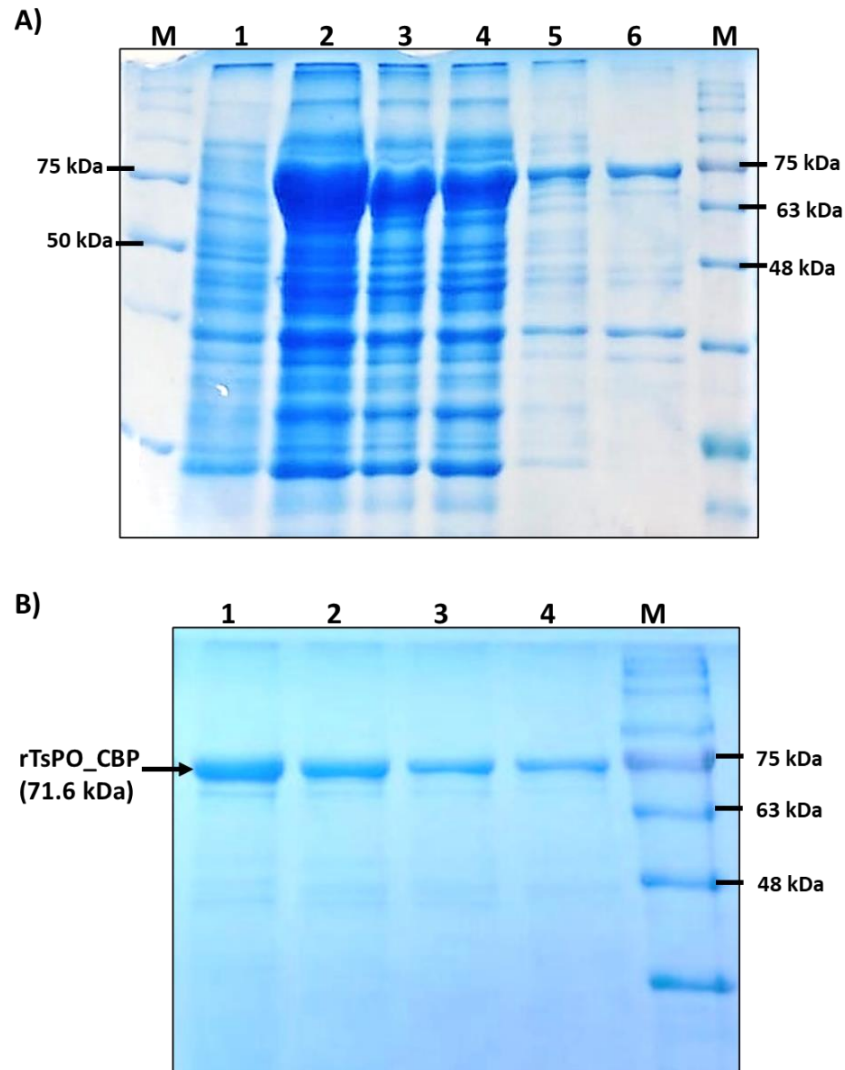


Figura IV-17. SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de células B121 que contienen el plásmido pGEX-6P-1 + CBP.

A) Células no inducidas [1], Células inducidas [2], extracto del sonicado de células inducidas [3], Sobrenadante del primer sonicado [4], sobrenadante del segundo sonicado [5] y pellet solubilizado [6]. B) Purificación de la proteína recombinante, fracciones eluidos [Pozos 1-4]. M= marcador de peso molecular para proteínas.

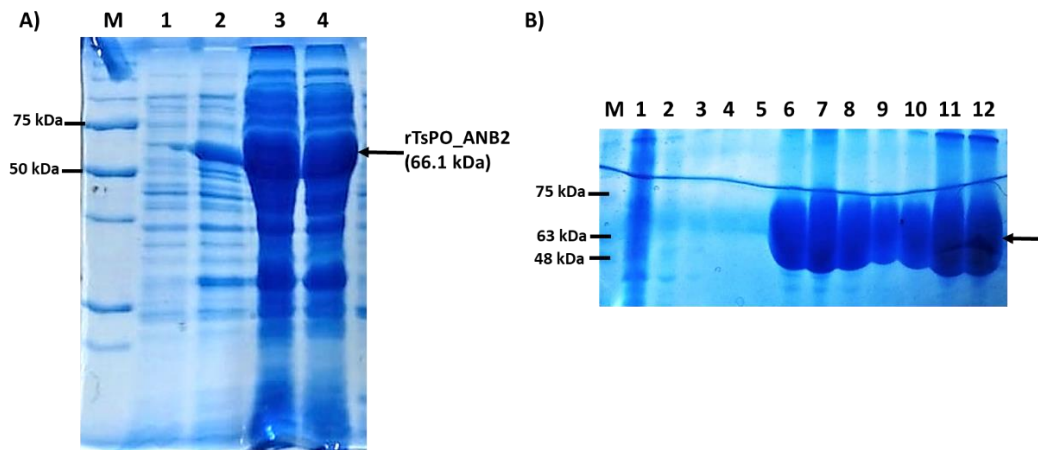


Figura IV-18. SDS-PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de células BI21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1 + ANB2.

A) Células no inducidas [1] e inducidas [2], extracto del sonicado de células inducidas [3], sobrenadante del sonicado. B) Purificación de la proteína recombinante: proteínas no unidas a la resina glutatión sefarosa 3B [1], lavados [2-5], fracciones eluidas [6-12]. M= marcador de peso molecular para proteínas.

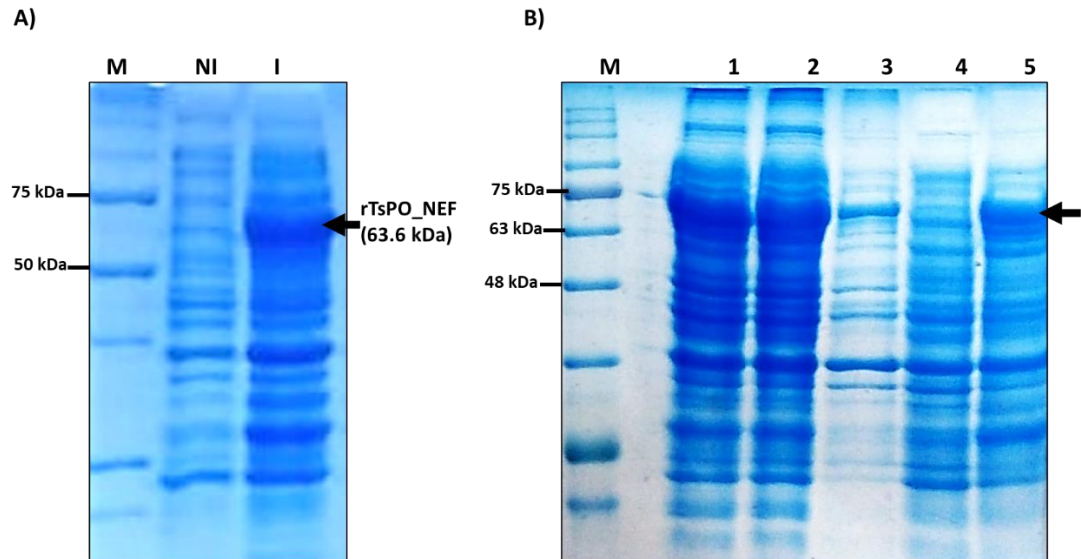


Figura IV-19. SDS PAGE y coloración con azul de Coomassie G-250 de proteínas de células BI21 que contienen el plásmido pGEX-6P-1 + NEF.

A) Células no inducidas [NI] e inducidas [I]. B) células inducidas [1], células lisadas [2], sobrenadante del lisado [3], segundo sobrenadante del lisado [4], pellet solubilizado [5]. M= marcador de peso molecular para proteínas.

4.2.5.2. Evaluación de la antigenicidad de las proteínas recombinantes de postoncosferas de *T. solium*

Para confirmar si las proteínas recombinantes rTsPO_CBP y rTsPO_ANB2 son de postoncosferas de *T. solium*, se incubó las proteínas recombinantes con el suero de conejos que reconocen proteínas de postoncosferas. En la figura IV-20 se muestra el resultado del western blot en donde se observa una banda correspondiente a la proteína recombinante que es reconocida por los anticuerpos anti- postoncosfera sugiriendo que las proteínas recombinantes son de postoncosfera de *T. solium*.

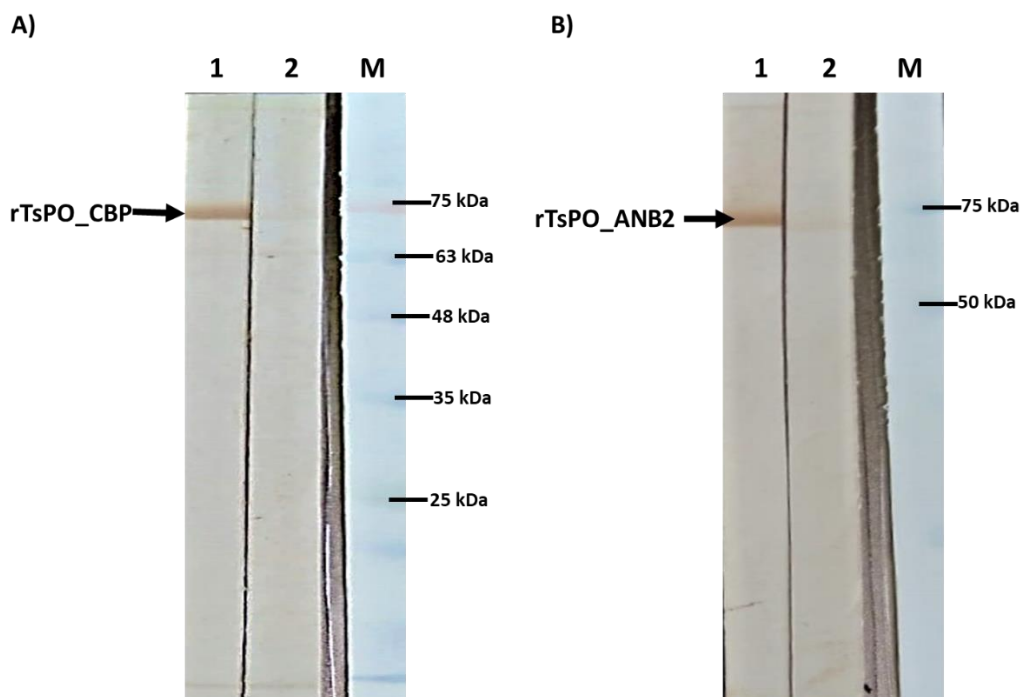


Figura IV-20. Western blot de proteínas recombinantes incubadas con suero de conejo anti-postoncosfera.

A) Proteína recombinante precursor de proteína de unión a calcio. B) proteína recombinante Anexina B2. Carril 1= suero de conejo post inmune, carril 2= suero de conejo pre-inmune, M= marcador de peso molecular para proteínas.

4.2.5.3. Localización de proteínas de postoncosferas de *T. solium*

Se realizó la localización de proteínas identificadas por espectrometría de masa en las postoncosferas de *T. solium*, usando anticuerpos policlonales contra estas proteínas. Los anticuerpos policlonales que se utilizaron fueron anti - enolasa de *T. solium* obtenido por Ponce et al., 2018 (92); y anticuerpos policlonales anti-precursor de proteína de unión a calcio, y anti – anexina B2 obtenido por inmunización de conejos con proteínas recombinantes (Anexo 22).

Localización de enolasa

Mediante western blot, se confirmó que la proteína enolasa se encuentra en las proteínas solubles totales de las postoncosferas de *T. solium*. En la figura IV-21A, se muestra que el peso molecular de esta proteína corresponde al peso molecular de las proteínas que se encuentran en la banda de 46 y 48 kDa. Mediante inmunohistoquímica se localizó la proteína en las postoncosferas de *T. solium* en corte de cerebro de rata. Tanto en las postoncosferas de menor tamaño como las de mayor tamaño, la proteína se localiza en el tegumento, las células subtegumentales y en las fibras musculares (figura IV.21B y C).

Localización del precursor de proteína de unión a calcio

Mediante western blot, se confirmó que el precursor de la proteína de unión a calcio se encuentra en las proteínas solubles totales de las postoncosferas de *T. solium*. En la figura IV-22A, se muestra que el peso molecular de esta proteína corresponde al peso molecular de las proteínas que se encuentran en la banda de 46

y 48 kDa. En postoncosferas de menor tamaño, esta proteína se localiza en las células subtegumentales, también se observa reacción en el tejido del hospedero que rodea a la postoncosfera (figura IV-22B II). Cuando la postoncosfera incrementa de tamaño se forma una interfase entre el parásito y el tejido del huésped; en estas postoncosferas de mayor tamaño también se observa reacción en las células subtegumentales mientras que en el tejido del huésped se observa reacción cerca a la interfase (figura IV-22C).

Localización de anexina B2

Mediante western blot, se confirmó que la proteína anexina B2 se encuentra en las proteínas solubles totales de las postoncosferas de *T. solium*. En la figura IV-23A, se muestra que el peso molecular es de 40 kDa aproximadamente, lo cual corresponde con el peso molecular reportado para esta proteína. Esta proteína no es parte del grupo de las proteínas de 46 y 48 kDa. En las postoncosferas de *T. solium* que desarrollan en el cerebro de ratas, la proteína anexina B2 se localiza en el tegumento y en las células del subtegumento de la postoncosfera (figura IV-23 B y C). También se realizó la localización de esta proteína en cisticercos de *T. solium* (figura IV-23D) debido a que no hay reportes en la literatura, esta proteína se localiza en el tegumento y células subtegumentales de la pared y del canal espiral del cisticerco.

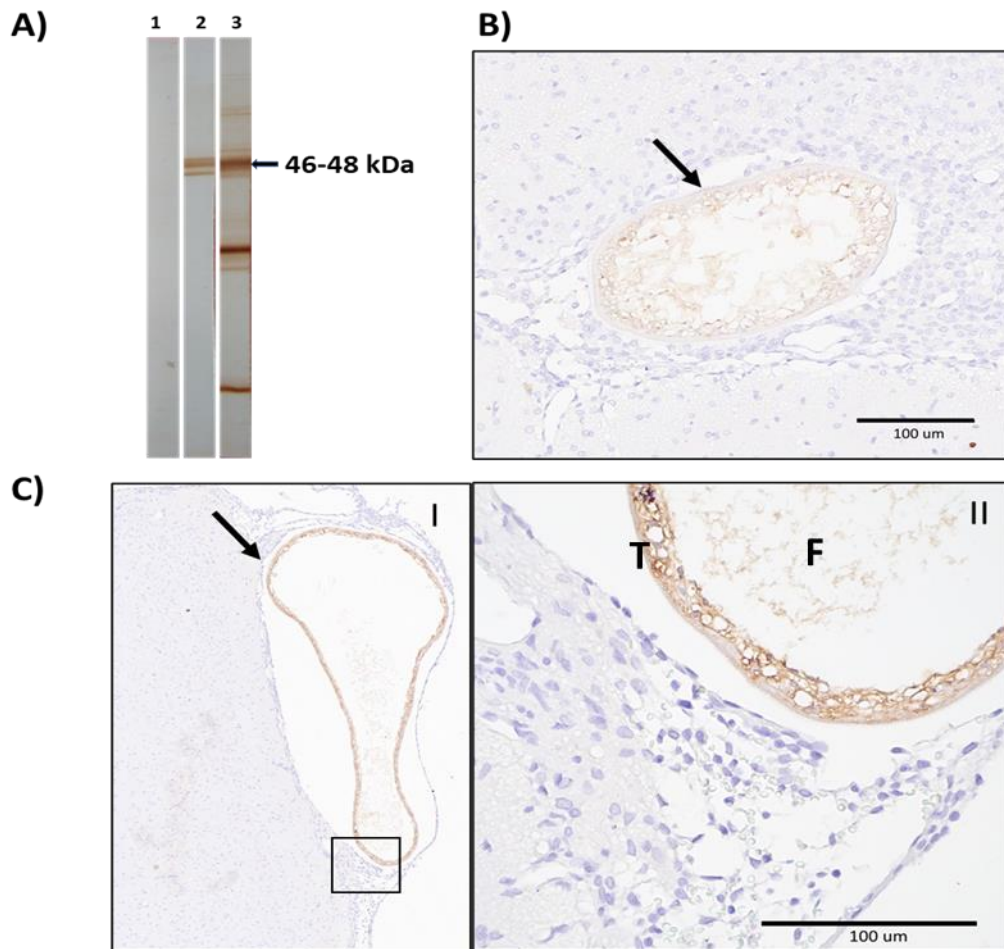


Figura IV-21. Localización de enolasa en postoncosfera de *T. solium*.

A) Western blot de las proteínas solubles totales de postoncosferas de *T. solium* incubadas con suero de conejo: pre-inmune [carril 1], anti – proteína recombinante enolasa de *T. solium* [carril 2], y anti - postoncosfera de *T. solium* [carril 3]. B y C) Inmunohistoquímica de cerebro de ratas con postoncosferas incubadas con suero anti – proteína recombinante enolasa de *T. solium*. La flecha en B y C señalan la postoncosfera de *T. solium*. CII es una ampliación de CI, y se aprecia el tegumento [T] y las fibras musculares [F].

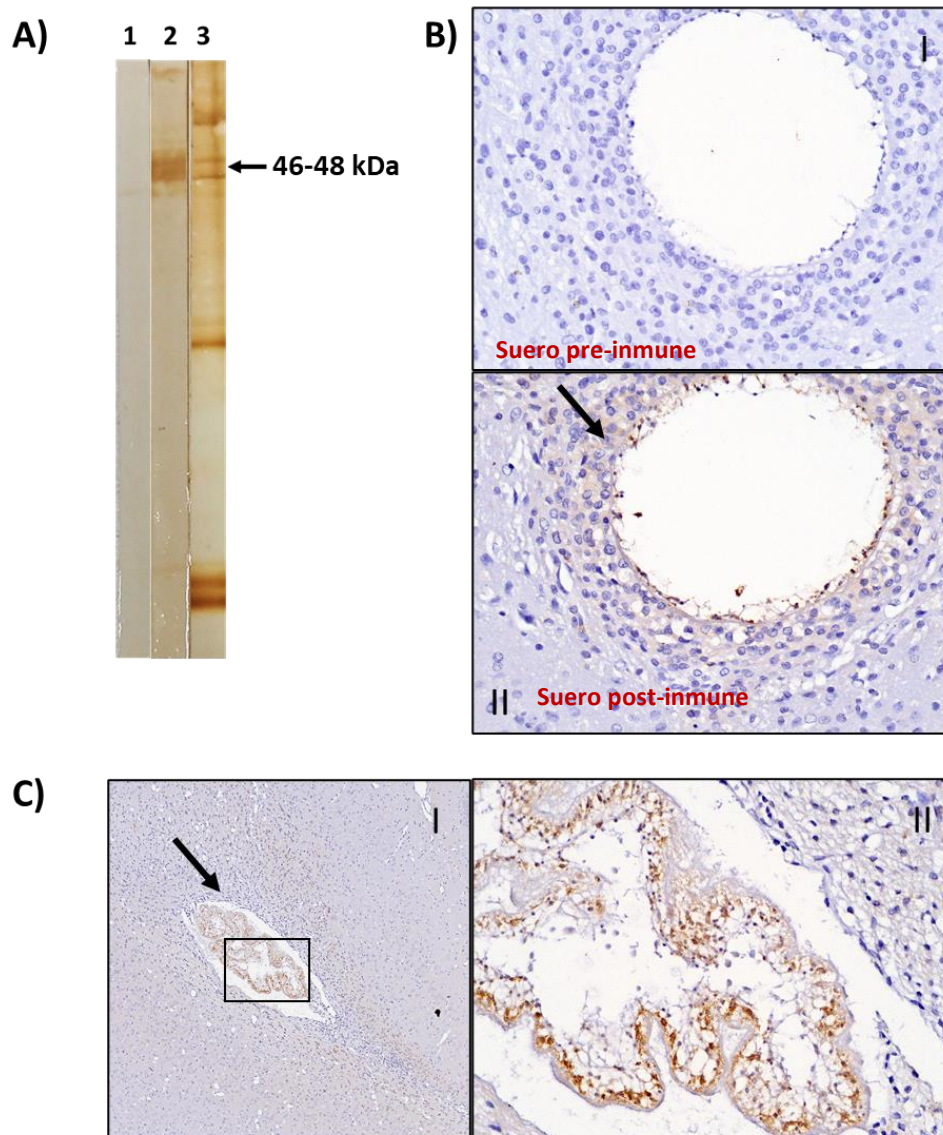


Figura IV-22. Localización del precursor de proteína de unión a calcio en postoncosfera de *T. solium*.

A) Western blot de las proteínas solubles totales de postoncosferas incubadas con suero de conejo: pre-inmune [carril 1], anti – proteína recombinante precursor de proteína de unión a calcio [carril 2], y anti - postoncosfera de *T. solium* [carril 3]. B y C) Inmunohistoquímica de cerebro de ratas con postoncosferas incubadas con el suero de conejo pre-inmune [BI] y anti- proteína recombinante precursor de proteína de unión a calcio (BII y C); las flechas señalan las postoncosferas. CII es una ampliación de CI, donde se aprecian las células subtegumentales.

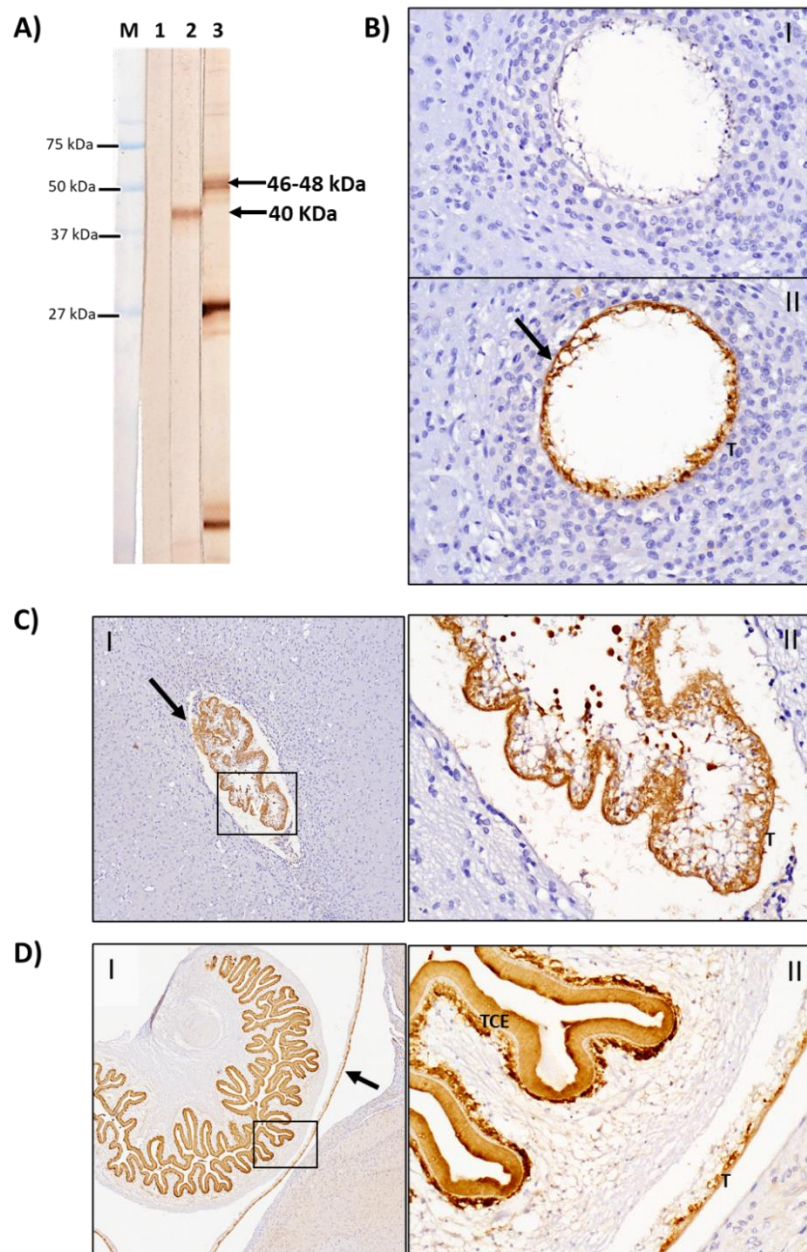


Figura IV-23. Localización de anexina B2 en postoncosferas y cisticerco de *T. solium*.

A) Western blot de proteínas solubles totales de postoncosferas incubadas con suero de conejo: pre-inmune [carril 1], anti – proteína recombinante anexina B2 [carril 2] y anti - postoncosfera de *T. solium* [carril 3]. Inmunohistoquímica de cerebro de ratas con postoncosferas (B y C) y cisticerco (D) incubadas con suero pre-inmune (BI) y anti – proteína recombinante anexina B2 (BII, C y D). Las flechas señalan al parásito. CII y DII es una ampliación de CI y DI. M= marcador de peso molecular. T= tegumento, TCE= tegumento del canal espiral.

V. DISCUSIÓN

5.1. Primer estudio: Metaanálisis

El metaanálisis muestra la validez del western blot para el inmunodiagnóstico de la NCC. La sensibilidad y especificidad global fue calculado en base a los datos de estudios originales que emplearon muestras de varias zonas endémicas. El metaanálisis se realizó en base al tipo de antígeno, tipo de estudio, y al resultado de neuroimagen. La sensibilidad del western blot es baja en estudios epidemiológicos comparados con los estudios realizados en el laboratorio; así mismo, el western blot tiene una alta sensibilidad para detectar pacientes con quistes múltiples viables; y una baja sensibilidad para detectar pacientes con quistes únicos o con NCC inactiva. La especificidad del western blot es mayor a 90%.

El diagnóstico de la NCC incluye los hallazgos de las pruebas de neuroimagen y del diagnóstico de laboratorio, así como los aspectos clínicos y epidemiológicos (5). Los estudios de neuroimagen siguen siendo el método preferido para establecer un diagnóstico de NCC debido a que proporciona información importante para el manejo clínico (137). La tomografía computarizada y/o la resonancia magnética rara vez están disponibles en países con ingresos medios o bajos, principalmente en áreas rurales, en donde la aplicación de las pruebas serológicas representan una alternativa importante para el diagnóstico (138). Sin embargo, podrían existir limitaciones para poder realizar esta prueba en estas zonas, sobre todo por los costos financieros y la falta de laboratorios.

El western blot que usa glicoproteínas (LLGP), denominado como LLGP-EITB es considerado actualmente como la prueba de elección para el diagnóstico serológico de la cisticercosis (7). El metaanálisis, por tipo de antígeno usado en la prueba, estimó una sensibilidad del 72.7% para el western blot que usa glicoproteínas; y como era de esperar esta sensibilidad varió de acuerdo a los resultados de la neuroimagen, siendo el rendimiento de esta prueba alta para detectar pacientes con quistes múltiples viables (sensibilidad mayor a 90%); esto se debe a que en NCC, la respuesta humoral está relacionada con la magnitud de la infección y a menudo es mayor en pacientes con quistes múltiples (98); mientras que la presencia de un solo quiste podría no ser suficiente para provocar una respuesta de anticuerpos con títulos altos. Al igual que en el caso de los pacientes con NCC inactiva (donde los quistes están calcificados), la respuesta de anticuerpos puede haber desaparecido después de la muerte de los parásitos (64,69); así mismo, no se pueden descartar que las calcificaciones se deban a otras causas como: infección por citomegalovirus, tuberculosis, toxoplasmosis, abscesos e infecciones micóticas (67,139).

En cuanto a la especificidad del western blot, esta no es del 100%, debido a que esta prueba puede ser positiva en pacientes con teniasis, con cisticercosis ocular (69), hidatidosis o himenolepiasis (99), incluso en paciente sin evidencia de cisticercosis (140). Es por eso que algunos estudios epidemiológicos, tienen cuidado con la interpretación de la prueba, ya que un resultado positivo al LLGP-EITB puede indicar: 1) teniasis, 2) NCC activa o 3) cisticercosis en otras partes del cuerpo (65).

En cuanto al tipo de estudio la sensibilidad de la prueba es menor en estudios epidemiológicos comparado a los estudios realizados en el laboratorio, una de las explicaciones es debido a que en la mayoría de los estudios epidemiológicos, los individuos en la población evaluada presentaron calcificaciones (15,65,67), así mismo, los casos de NCC fueron reportados en pacientes con epilepsia que en su mayoría presentan calcificaciones (14,16,63,64,66) y es conocido que el LLGP-EITB tiene una baja sensibilidad para detectar estos casos.

Los antígenos recombinantes y/o sintéticos que son desarrollado a partir de las fracciones del LLGP ofrecen nuevas perspectivas (81,82,84,99), sin embargo, su desempeño fue evaluado en entornos de laboratorio. Sería interesante evaluar su validez en estudios epidemiológicos y clínicos. El uso de proteínas nativas y proteínas recombinantes en el EITB, si bien incrementa la sensibilidad en condiciones de laboratorios, la desventaja es que a menudo presentan reacciones cruzadas principalmente en pacientes con teniasis, hidatidosis, himenolepiasis entre otros (76–79,83,99,125,126,128)

Nuestro metaanálisis tenía ciertas fortalezas intrínsecas. En primer lugar, la estrategia de búsqueda en grandes bases de datos permitió identificar estudios originales con un gran número de muestras de suero. En segundo lugar, el diagnóstico de NCC se estableció utilizando criterios absolutos (demostración histológica del parásito a partir de un cerebro, biopsia) o criterios de neuroimagen. En tercer lugar, se realizaron modelos estadísticos para preservar la naturaleza bidimensional de la precisión diagnóstica. Este método considera la presencia

potencial de una correlación (negativa) entre sensibilidad y especificidad dentro de los estudios, que se aborda incorporando explícitamente esta correlación en el análisis (103). Por último, la mayoría de los estudios proporcionaron información específica sobre las características y el número de quistes en el cerebro (activos/inactivos, únicos/múltiples, únicos viables/múltiples viables) e información general de los diferentes antígenos utilizados en el WB, lo que permitió realizar análisis restringidos.

De igual manera, este estudio tiene varias limitaciones que deben ser consideradas. En primer lugar, no hubo una evaluación sistemática de la neuroimagen dentro de los grupos control en la mayoría de los estudios realizados en el laboratorio, sin embargo, se aplicaron ciertos criterios estándar para asignar individuos al grupo de control, incluido el examen clínico, la historia clínica o la evaluación serológica (por ejemplo, ELISA). En segundo lugar, en determinados estudios de laboratorio no se describe con detalle la información relacionada a las muestras, como la procedencia de la muestra o los métodos para la determinación de casos y controles.

5.2. Segundo estudio: Caracterización de las proteínas de los estadios postoncosferales

En este trabajo se ha identificado proteínas de las formas postoncosferales de *T. solium* que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC. Por western blot se evidenció bandas proteicas (23kDa, 46 kDa y 48 kDa) de postoncosferas de *T. solium* que son reconocidas por el 98% y 100% de sueros de pacientes con NCC parenquimal y subaracnoideo respectivamente. Aparentemente los anticuerpos contra las proteínas de 46kDa y 48 kDa son las primeras en formarse al mes de la infección en el modelo animal de NCC, y estos perduran incluso después de la formación del cisticerco en el cerebro. Por espectrometría de masas se identificó las proteínas presentes en las bandas proteicas de 46 y 48 kDa, de las cuales 3 fueron seleccionadas para para su localización en la postoncosfera de *T. solium*.

5.2.1. Proteínas antigénicas de estadios postoncosferales reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC

Las bandas proteicas de 23 kDa, 46 y 48 kDa de postoncosferas son reconocidas por un pool de suero de pacientes con NCC; y al compararlas con los antígenos de oncosfera y cisticerco, se observa que la banda de 46 y 48 kDa aparentemente son específicas de este estadio; así mismo, también se ha observado estas dos bandas en las proteínas E/S de las postoncosferas, sugiriendo que son proteínas secretadas por el parásito. Se ha reportado que cada estadio de desarrollo del parasito expresa proteínas que son específicas (11) y podrían participar en la

modulación de la respuesta inmune del hospedero durante la infección, permitiéndole establecerse y sobrevivir (141,142).

Los pacientes con NCC tienen anticuerpos contra las proteínas de postoncosfera, sugiriendo que estas podrían ser candidatas para el diagnóstico de NCC. Las proteínas de *T. solium* que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC han sido estudiadas en el estadio de oncósfera y cisticerco; en el caso de oncósferas solo un 20% de pacientes con NCC tienen anticuerpos anti – oncósfera (11), probablemente estos anticuerpos no perduran durante el tiempo; en el caso del estadio de cisticerco se han reportado bandas proteicas específicas que son reconocidas por el suero de pacientes con NCC, de las cuales el 61% son glicoproteínas (13) que han demostrado ser útiles para el diagnóstico inmunológico de la cisticercosis (7).

5.2.2. Utilidad de las proteínas antigénicas de postoncosferas para el diagnóstico de la NCC

La sensibilidad del western blot empleando las proteínas de postoncosfera fue de 98% en pacientes con NCC parenquimatosa y 100 % en pacientes con NCC subaracnoidea; así mismo al evaluar suero de pacientes con calcificaciones o sueros de personas control ninguno fue positivo a la prueba. Estos resultados sugieren que las proteínas de postoncosfera son útiles para diagnosticar pacientes con NCC que tienen parásitos viables. Estos resultados son similares al LLGP-EITB que es altamente sensible para detectar anticuerpos de pacientes con múltiples quistes viables (8). Mas estudios son necesarios para demostrar su utilidad en pacientes con

un quiste viable, así como para evaluar si incrementando la concentración del antígeno o usando antígenos E/S se logra detectar anticuerpos en pacientes con NCC inactiva.

5.2.3. Respuesta humoral contra las proteínas de postoncosferas

Las proteínas de postoncosfera son expresadas en etapas tempranas del desarrollo del cisticerco; y los anticuerpos que el hospedero forma contra las proteínas de este estadio temprano al parecer perduran por periodos largos. Con el objetivo de conocer en qué momento de la infección aparecen los anticuerpos anti-postoncosfera y cuánto tiempo perduran estos anticuerpos el hospedero, se utilizó el modelo murino de NCC.

Los anticuerpos contra las proteínas de 46 y 48 kDa de postoncosferas de *T. solium* aparecen a partir de los 30 días después de la infección con oncosferas activadas y persisten hasta después de que el cisticerco se ha desarrollado en el cerebro que usualmente es a los 3 meses post infección. La evaluación se realizó hasta el año de infección, donde los cisticercos seguían viables en el cerebro; lo cual coincide con los resultados de la evaluación de pacientes con NCC en los cuales se detecta anticuerpos en pacientes con quistes viables.

Una explicación del porque los animales y personas con NCC tienen anticuerpos anti- postoncosfera podría deberse a que, en el tejido, aparte de estar presentes los cisticercos, también, estarían presentes las formas postoncosferales que podrían estar activando la respuesta inmune humoral. Otra explicación podría ser que el hospedero desarrolla memoria inmunológica contra los antígenos de postoncosfera, la cual se activa probablemente por la expresión de estas proteínas

en el cisticerco de *T. solium*, ya que se ha reportado que el patrón de bandas proteicas de postoncosfera es similar al de cisticerco (17). O probablemente los anticuerpos contra postoncosferas que se formaron en el hospedero persisten a pesar de que el antígeno no esté presente (143); que es lo mismo que al parecer sucede con los anticuerpos anti-cisticerco que perduran en la mayoría de pacientes que han recibido tratamiento (144).

5.2.4. Identificación de las proteínas de postoncosfera por espectrometría de masas

El análisis de las proteínas identificadas a partir de las bandas de 46 y 48 kDa revelaron la presencia de 4 proteínas *de T. solium*; el factor de elongación nuclear alfa 1, el antígeno de diagnóstico GP50, enolasa y el precursor de la proteína de unión a calcio (calreticulina). 3 de estas proteínas fueron identificadas también en el ES, sin embargo en la predicción 2 no tienen la señal para ser secretadas, sugiriendo que podrían ser secretadas por otra ruta, por ejemplo dentro de vesículas (145,146). Así mismo dos de estas han sido reportadas como proteínas que son reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC (80,147)

El factor de elongación nuclear alfa 1, es una proteína de 48.8 kDa, y ha sido reportado en el E/S del cisticerco de *T. solium* (40) sin embargo, su rol en la interacción con el hospedero o su evaluación en el diagnóstico de la NCC aún no ha sido realizado. Esta proteína citosólica es responsable de la unión dependiente de GTP del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma durante la síntesis de proteínas (148), también participa en otros procesos biológicos como la interacción con el citoesqueleto, exportación nuclear, proteólisis y apoptosis (149). En parásitos, se ha

reportado como una proteína presente en el E/S (150–152) y en vesículas (153) participando en la regulación del sistema inmune del hospedero (153), además se ha reportado su participación en el mecanismo de invasión de *Cryptosporidium* y *Toxoplasma* en las células del hospedero (154,155) y es considerado como candidato para el desarrollo de vacunas. Su probable rol en las postoncosferas podría ser en la evasión de la respuesta inmune permitiéndole establecerse y desarrollar hasta cisticerco en el tejido del hospedero

El antígeno de diagnóstico GP50 es una glicoproteína de cisticerco utilizada en el LLGP-EITB para el diagnóstico de la cisticercosis (7,156). Es una glicoproteína de membrana anclada a glicosilfosfatidilinositol (80), también se le ha identificado en el E/S del cisticerco de *T. solium* (40). Su peso molecular de 50 kDa incluyendo la glicosilación, mientras que la parte proteica madura (sin péptido señal) tiene un peso molecular de 28.9 kDa (80). La localización de esta glicoproteína en el cisticerco es a nivel del parénquima, las ventosas, el rostelo, en el tegumento y glicocálix del escólex y del canal espiral (157) mientras que en postoncosferas aún no se conoce la localización ni la función. La presencia de la parte proteica de esta glicoproteína en la postoncosfera sugiere que las postoncosferas podrían tener una glicoproteína similar a GP50, lo cual explicaría porque los pacientes con NCC tienen anticuerpos que reconocen proteínas de los estadios postoncosferales.

Enolasa es otra proteína identificada en las formas postoncosferales de *T. solium*, es una enzima glucolítica que cataliza la deshidratación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en los últimos pasos de la vía glucolítica (158). Esta proteína ha sido reportada también en el E/S (40) y el tegumento del cisticerco de *T. solium*

(159), y tiene sitios de unión a plasminógeno (92,159). Esta propiedad de la enolasa de unirse a plasminógeno ha sido reportado en otros parásito, y está involucrado en la migración y establecimiento del parásito en el hospedero (160), también ha sido descrito como un potencial candidato a vacuna en *Ascaris* (161), nuevos estudios sugieren su posible participación como modulador del sistema inmune innato del hospedero (162). Como producto E/S, enolasa podría estar envuelto en la unión a plasminógeno y activación de plasmina que participa en la degradación y proteólisis de la matriz extracelular y así de esta manera facilitar el establecimiento de la postoncosfera para completar su desarrollo en el tejido.

El precursor de la proteína de unión a calcio denominada como calreticulina, es una proteína que se encuentra en el lumen del retículo endoplásmico donde participa como chaperona y en la homeostasis de calcio intracelular (163). Esta proteína también se ha encontrado en múltiples localizaciones subcelulares y media una variedad de procesos celulares (163–165). En parásitos, esta proteína participa en la evasión de la respuesta inmune por inhibición de la activación del complemento (166). En *T. solium* esta proteína está localizada en los citones del tegumento de la pared del cisticerco y del escólex (167), sin embargo su rol en la interacción hospedero-parásito es desconocido.

La identificación de estas proteínas en la postoncosfera de *T. solium* sugiere que las postoncosferas expresan proteínas que también son expresadas por el cisticerco de *T. solium*. y la presencia de anticuerpos anti-postoncosfera en los pacientes con NCC podría deberse a la memoria inmunológica contra los antígenos de postoncosfera, la cual se reactiva por la expresión de estas proteínas en el cisticerco de *T. solium*.

Otra proteína identificada en las bandas de 46-48 kDa del E/S de la postoncosfera de *T. solium*, es una proteína de 47.4 kDa similar a anexina. La secuencia de esta proteína es diferente a las anexinas reportadas en *T. solium* (anexina B1, B2 y B3). Las anexinas son una familia grande de proteínas que se expresan en todos los eucariotas y participan en un amplio rango de actividades biológicas como el metabolismo de calcio, adhesión celular, crecimiento y diferenciación celular, transporte subcelular, así como en la reparación de la membrana (168) y también se ha reportado que es capaz de unirse a plasminógeno (162). En el cisticerco, anexina B1 y B2 proteínas de 38 kDa y 40 kDa respectivamente, han sido caracterizados como proteínas de unión a calcio y fosfolípidos (169,170). Anexina B1 se localiza en el tegumento del cisticerco y en el tejido del hospedero que rodea al parásito (171,172) sugiriendo un rol en la interacción con el hospedero, favoreciendo la su permanencia en el tejido (171,173). Estudios son necesarios para demostrar si la anexina de 47.4 kDa de postoncosfera tiene una función similar a las anexinas del cisticerco.

En el análisis de proteínas identificadas a partir de los spots de la electroforesis bidimensional, se encontró la proteína P27 y una metaloproteínasa asociada a membrana. La proteína P27 ha sido previamente reportado en el cisticerco por Salazar-Anton et al. (134), esta proteína es reconocida por sueros de pacientes con NCC (134) y ha sido evaluado para el diagnóstico de cisticercosis humana con una sensibilidad de 85.71% y una especificidad de 96.69% de la prueba (135). La metaloproteínasa ha sido reportado también en el cisticerco por Zhang et al. (136), esta proteína como recombinante es reconocida por el 87.5% de pacientes con NCC (136).

5.2.5. Localización de proteínas identificadas por espectrometría de masas en postoncosferas de *T. solium*

Obtención de proteínas recombinantes

Las postoncosferas de *T. solium* tienen los transcritos de los genes que codifican para el antígeno GP50, el factor de elongación nuclear alfa 1, el precursor de la proteína de unión a calcio (presentes en la banda de 46 y 48 kDa) y anexina B2. La obtención de proteínas recombinantes se realizó para el factor nuclear de elongación alfa 1, el precursor de la proteína de unión a calcio y anexina B2 en un sistema de expresión procariota (*E. coli*), no se incluyó al antígeno de diagnóstico GP50 debido a que este sistema de expresión carece de la maquinaria para realizar modificaciones postraduccionales como la glicosilación (174). Los genes que codifican para las proteínas seleccionada fueron exitosamente clonados en el vector de expresión pGEX-6P-1, sin embargo, cuando se realizó la inducción de la expresión, solo el precursor de la proteína de unión a calcio y la anexina B2 fueron solubles, mientras que el factor de elongación nuclear alfa 1 fue insoluble. Los vectores pGEX tienen una etiqueta de afinidad que es una enzima llamada GST que se expresa fusionada a la proteína recombinante de interés, esta etiqueta le da una ventaja adicional para incrementar la solubilidad (175), sin embargo esto no se cumple en todos los tipos de proteínas. Una de las causas de la insolubilidad es el alto nivel de expresión de la proteína recombinante en *E. coli* causando agregación de la proteína expresada (cuerpos de inclusión); otra causa se debe a que el sistema de control de calidad de proteínas en *E. coli* se satura o se agota, y las proteínas parcialmente plegadas o mal plegadas se agregan para formar cuerpos de inclusión

(176). En el caso del factor de elongación nuclear probablemente se deba a que se clonó la secuencia parcial para la proteína, y esto pudo haber originado un mal plegamiento y agregación de las proteínas expresadas.

Localización de proteínas

Se realizó la localización de 3 proteínas identificadas por espectrometría de masas, la primera es la enolasa, la cual se localiza en el tegumento, las células subtegumentales y en las fibras musculares de las postoncosferas de *T. solium*. La probable participación de enolasa ubicada en el tegumento de las postoncosferas de *T. solium* podría ser en la migración y establecimiento de estas formas tempranas del parásito en el tejido del hospedero permitiendo así su desarrollo hasta cisticerco, esto debido a su propiedad de unión a plasminógeno (160).

La segunda proteína, es el precursor de la proteína de unión a calcio que se localiza en las células subtegumentales de las postoncosferas de *T. solium*, en estas células probablemente esta proteína participa en la modulación del calcio intracelular o como chaperona en el plegamiento de glicoproteínas (177) que probablemente se dirijan a la superficie del tegumento del parásito que se caracteriza por ser rico en glicoconjugados (178).

La tercera proteína, es anexina B2 y se localiza también en el tegumento y las células subtegumentales de la postoncosfera de *T. solium*. Debido a que no hay reportes en cisticerco de *T. solium*, en este estudio también se incluyó la localización de anexina B2 en el cisticerco observando que anexina B2 se encuentra en el tegumento de la pared y del canal espiral. En ambos estadios del parásito, esta proteína al estar en el tegumento probablemente cumpla un rol en la interacción con

el hospedero como por ejemplo en la regulación de la respuesta inmune del hospedero (179). Anexina también se ha reportado como una proteína capaz de unirse a plasminógeno (162), probablemente al igual que enolasa cumplan un rol en la migración y establecimiento del parásito en el tejido.

5.2.6. Limitaciones del estudio

Este estudio presenta varias limitaciones, la primera es en la estrategia para la identificación de las proteínas, debido a que se utilizó la base de datos de las proteínas de *T. solium* que contiene solo 705 proteínas reportadas, esto debido a que aún no se disponía de la base de datos del genoma de *T. solium*. Sin embargo, para compensar esta limitación se optó por usar también la base de datos de proteínas de *E. granulosus* que contiene 44723 proteínas reportadas.

Otra de las limitaciones del estudio es que la identificación se enfocó principalmente en la banda de 46 y 48 kDa de las postoncosferas de *T. solium*, y no en las otras bandas que también podrían tener proteínas de importancia. Esta limitación se trató de compensar con la electroforesis en 2D en donde se trató de abarcar proteínas con pesos molecular diferentes a 46 y 48 kDa.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones del primer estudio:

- Este estudio provee evidencia de la validez del western blot en muestras de suero para el diagnóstico inmunológico de la NCC. El western blot que usa glicoproteínas continúa siendo una opción valiosa acompañada de los estudios de neuroimagen.
- La sensibilidad del western blot que usa glicoproteínas es alta para la detección de pacientes con NCC que tienen múltiples cisticercos viables.
- La sensibilidad del western blot que usa glicoproteínas evaluado en estudios epidemiológicos es menor comparado con los estudios realizados en el laboratorio.
- El uso de proteínas recombinantes y otras proteínas nativas incrementa la sensibilidad del western blot en estudios realizados en el laboratorio.
- La especificidad global del western blot es mayor a 90%.

Conclusiones del segundo estudio:

- Las proteínas (bandas de 23 kDa, 46 y 48 kDa) son reconocidas por los anticuerpos de pacientes con NCC.
- Las proteínas de postoncosfera son útiles para el diagnóstico inmunológico de la NCC parenquimal y subaracnoidea (viables), mas no para NCC con calcificaciones.

- Los anticuerpos contra las bandas antigénicas de 46 y 48 kDa de postoncosferas de *T. solium* aparecen en etapas tempranas de la infección y perduran hasta después de que el cisticerco se ha desarrollado en el cerebro, en el modelo animal de NCC
- Las proteínas factor de elongación nuclear alfa 1, el precursor de la proteína de unión a calcio, el antígeno de diagnóstico GP50, enolasa, y una proteína similar a anexina están presentes en las bandas de 46 y 48 kDa de postoncosferas de *T. solium*, de las cuales dos han sido reportadas como proteínas reconocidas por anticuerpos de pacientes con NCC.
- Otras proteínas identificadas en postoncosfera de *T. solium* fueron la proteína p27 (27 kDa) y la metaloproteínasa asociada a membrana (54 kDa) que han sido reportados como proteínas reconocidas por pacientes con NCC.
- Las postoncosferas de *T. solium* tienen los transcritos para la expresión de los genes que codifican el antígeno GP50, el factor de elongación nuclear alfa 1, el precursor de la proteína de unión a calcio y anexina B2.
- La proteína enolasa, el precursor de la proteína de unión a calcio y anexina B2 fueron localizados en el tegumento y/o las células subtegumentales de las postoncosferas de *T. solium*, sugiriendo un rol en la interacción con el hospedero.

VII. RECOMENDACIONES

Del segundo estudio:

- Se recomienda realizar la proteómica de las proteínas E/S de las postoncosferas de *T. solium*.
- Se recomienda obtener la proteína recombinante GP50 de las postoncosferas de *T. solium* en un sistema de expresión eucariota para evaluar su función en este estadio.
- Se recomienda caracterizar la proteína similar a anexina identificada en el E/S de las postoncosferas de *T. solium*, ya que no ha sido reportado en los otros estadios de *T. solium*.
- Se recomienda obtener la proteína recombinante del factor de elongación nuclear alfa 1 usando la secuencia completa del gen que codifica para esta proteína, y evaluar su rol en la interacción con el hospedero.
- Se recomienda realizar la electroforesis en 2D de las proteínas E/S de las postoncosferas de *T. solium* para identificar proteínas que cumplan un rol en la interacción del parásito con el hospedero.
- Se recomienda realizar la evaluación de la respuesta contra las proteínas de oncosfera, postoncosfera y cisticerco, usando el modelo de cerdo..

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* Cysticercosis and Its Impact in Neurological Disease. Clin Microbiol Rev. 2020;33(3).
2. Garcia HH, O'Neal SE, Noh J, Handali S, Cysticercosis Working Group in Peru. Laboratory Diagnosis of Neurocysticercosis (*Taenia solium*). J Clin Microbiol. 2018;56(9).
3. Organización Mundial de la Salud. Teniasis y cisticercosis [Internet]. 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
4. OPS/OMS | Teniasis - Cisticercosis [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2018. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14520:hoja-informativa-teniasis-cisticercosis&Itemid=40721&lang=es
5. Del Brutto OH, Nash TE, White AC, Rajshekhar V, Wilkins PP, Singh G, et al. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. J Neurol Sci. 2017;372:202-10.
6. Garcia HH. Neurocysticercosis. Neurol Clin. 2018;36(4):851-64.
7. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989;159(1):50-9.
8. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, et al. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. J Infect Dis. 1991;164(5):1007-9.
9. Chile Andrade N. Estudio in vitro del estadio postoncosférico de *Taenia solium* y su utilidad en el diagnóstico de neurocisticercosis. 2014; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/1064>
10. Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, White AC. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. J Parasitol. 1993;79(1):124-7.
11. Verastegui M, Gilman RH, Garcia HH, Gonzalez AE, Arana Y, Jeri C, et al. Prevalence of antibodies to unique *Taenia solium* oncosphere antigens in taeniasis and human and porcine cysticercosis. Am J Trop Med Hyg. 2003;69(4):438-44.
12. Mayta H, Hancock K, Gilman RH, Zamudio R, Castillo JP, Levine MZ, et al. A novel *Taenia solium* protein that resembles troponin T proteins. J Parasitol. 2009;95(3):591-7.

13. Grogil M, Estrada JJ, MacDonald G, Kuhn RE. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J Parasitol.* 1985;71(4):433-42.
14. Palacio LG, Jiménez I, Garcia HH, Jiménez ME, Sánchez JL, Noh J, et al. Neurocysticercosis in persons with epilepsy in Medellín, Colombia. The Neuroepidemiological Research Group of Antioquia. *Epilepsia.* 1998;39(12):1334-9.
15. Moyano LM, O'Neal SE, Ayvar V, Gonzalvez G, Gamboa R, Vilchez P, et al. High Prevalence of Asymptomatic Neurocysticercosis in an Endemic Rural Community in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0005130.
16. Rajshekhar V, Raghava MV, Prabhakaran V, Oommen A, Muliyl J. Active epilepsy as an index of burden of neurocysticercosis in Vellore district, India. *Neurology.* 2006;67(12):2135-9.
17. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, et al. In Vitro Study of *Taenia solium* Postoncospherical Form. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2).
18. Singh G, Prabhakar S. *Taenia solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. Chandigarh, India: CABI Publishing; 2002. 480 p.
19. CDC - DPDx - Cysticercosis [Internet]. 2019 [citado 3 de noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/cysticercosis/index.html>
20. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet.* 2003;362(9383):547-56.
21. Yoshino, K. Studies on the Post-embryonal Development of *Taenia solium*: On the hatching of the egg of *Taenia solium*. *J Formosa Med Ass.* 1933;32:139-41.
22. Mendlovic F, Garza-Rodríguez A, Carrillo-Farga J, González-Domínguez F, Maravilla P, Flisser A. From stillness to motion: 80 years after the first description of *Taenia solium* oncosphere hatching. *Parasit Vectors.* 2014;7:12.
23. Verastegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velásquez J, Farfán M, et al. *Taenia solium* Oncosphere Adhesion to Intestinal Epithelial and Chinese Hamster Ovary Cells In Vitro. *Infect Immun.* 2007;75(11):5158-66.
24. Zimic MJ, Infantes J, López C, Velásquez J, Farfán M, Pajuelo M, et al. Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *J Parasitol.* 2007;93(4):727-34.
25. Yoshino, K. Studies on the Postembryonal Development of *Taenia solium*: On the youngest form of *Cysticercus cellulosae* and on the migratory course of the oncosphaera of *Taenia solium* within the intermediate host. *J Formosa Med Ass.* 1933;155-8.

26. Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P. *Taenia solium* human cysticercosis: a systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):e0003919.
27. Gripper LB, Welburn SC. The causal relationship between neurocysticercosis infection and the development of epilepsy - a systematic review. *Infect Dis Poverty*. 2017;6(1):31.
28. Garcia HH, Gonzalez A, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang V, et al. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. 2010;27:592-7.
29. Watts NS, Pajuelo M, Clark T, Loader M-CI, Verastegui MR, Sterling C, et al. *Taenia solium* Infection in Peru: A Collaboration between Peace Corps Volunteers and Researchers in a Community Based Study. *PLOS ONE*. 2014;9(12):e113239.
30. Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcía M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(4).
31. Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Cjuno RA, et al. Diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis en el Perú. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. 2010;27(4):586-91.
32. Rodriguez S, Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathog Glob Health*. 2012;106(5):286-98.
33. Arora N, Tripathi S, Kumar P, Mondal P, Mishra A, Prasad A. Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunol*. 2017;39(7).
34. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, et al. Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. *Am J Pathol*. 2015;185(8):2259-68.
35. de Lange A, Mahanty S, Raimondo JV. Model systems for investigating disease processes in neurocysticercosis. *Parasitology*. 2019;146(5):553-62.
36. Gomez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Sciutto E, et al. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). *Sci Rep*. 2015;5.
37. Santivañez SJ, Hernández-González A, Chile N, Oleaga A, Arana Y, Palma S, et al. Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;171(1):32-9.

38. Mayta H, Hancock K, Levine MZ, Gilman RH, Farfán MJ, Verastegui M, et al. Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(2):154-61.
39. Gauci C, Jayashi C, Lightowers MW. Vaccine development against the *Taenia solium* parasite: the role of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Bioengineered*. 2013;4(5):343-7.
40. Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, et al. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics*. 2012;12(11):1860-9.
41. Diaz-Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio JR, Mendoza-Hernández G, Rosas G, Estrada K, et al. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: identification of candidate antigens through immunoproteomics. *The Veterinary Journal*. 2013;198(3):656-60.
42. da Costa GCV, Peralta RHS, Kalume DE, Alves ALGM, Peralta JM. A gel-free proteomic analysis of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci vesicular extracts. *Parasitol Res*. 2018;117(12):3781-90.
43. Hou T-Y, Chiang-Ni C, Teng S-H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019;27(2):404-14.
44. Büyükköroğlu G, Dora DD, Özdemir F, Hızel C. Chapter 15 - Techniques for Protein Analysis. En: Barh D, Azevedo V, editores. *Omics Technologies and Bio-Engineering*. Academic Press; 2018. p. 317-51. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128046593000154>
45. Fernández-Lainez C, Vela-Amieva M, Ibarra-González I. Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatr Mex*. 2009;30(5):258-63.
46. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
47. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1988;2(8):151-3.
48. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-Based and Gel-Free Quantitative Proteomics Approaches at a Glance. *Int J Plant Genomics*. 2012. p. e494572.
49. Mass Spectrometry Service [Internet]. Applied Biomics. Disponible en: <https://www.appliedbiomics.com/Services/mass-spectrometry.html>

50. Niessen WMA. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. CRC Press; 2006. 629 p.
51. Yergey AL, Coorsen JR, Backlund PS, Blank PS, Humphrey GA, Zimmerberg J, et al. De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002;13(7):784-91.
52. Pusch W, Flocco M, Leung S-M, Thiele H, Kostrzewa M. Mass spectrometry-mased clinical proteomics. *Pharmacogenomics*. 2003;4:463-76.
53. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5.
54. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci*. 2019;28(8):1412-22.
55. GE Healthcare Life Sciences. *GST Gene Fusion System Handbook*. 2014.
56. Stills HF. Chapter 11 - Polyclonal Antibody Production. En: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP, editores. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. Boston: Academic Press; 2012. p. 259-74. (American College of Laboratory Animal Medicine).
57. Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med*. 1990;150(2):325-7.
58. Garcia HH, Gilman R, Martinez M, Tsang VC, Pilcher JB, Herrera G, et al. Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *Lancet*. 1993;341(8839):197-200.
59. Sorvillo FJ, DeGiorgio C, Waterman SH. Deaths from Cysticercosis, United States. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(2):230-5.
60. O'Neal SE, Flecker RH. Hospitalization frequency and charges for neurocysticercosis, United States, 2003-2012. *Emerging Infect Dis*. 2015;21(6):969-76.
61. Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, et al. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ, Bull World Health Organ*. 2000;78:399-406.
62. Moyano LM. *Epidemiología de la epilepsia en el Perú: Neurocisticercosis como causa de epilepsia secundaria en la región norte del Perú [PhD Thesis]*. 2016.
63. Blocher J, Schmutzhard E, Wilkins PP, Gupton PN, Schaffert M, Auer H, et al. A cross-sectional study of people with epilepsy and neurocysticercosis in

- Tanzania: clinical characteristics and diagnostic approaches. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1185.
64. Cruz ME, Schantz PM, Cruz I, Espinosa P, Preux PM, Cruz A, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in an Andean community. *Int J Epidemiol*. 1999;28(4):799-803.
 65. Goodman KA, Ballagh SA, Carpio A. Case-control study of seropositivity for cysticercosis in Cuenca, Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(1):70-4.
 66. Mwape KE, Blocher J, Wiefek J, Schmidt K, Dorny P, Praet N, et al. Prevalence of Neurocysticercosis in People with Epilepsy in the Eastern Province of Zambia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003972.
 67. Sanchez AL, Ljungström I, Medina MT. Diagnosis of human neurocysticercosis in endemic countries: a clinical study in Honduras. *Parasitol Int*. 1999;48(1):81-9.
 68. Zammarchi L, Angheben A, Fantoni T, Chiappini E, Mantella A, Galli L, et al. Screening for neurocysticercosis in internationally adopted children: yield, cost and performance of serological tests, Italy, 2001 to 2016. *Euro Surveill*. 2018;23(40).
 69. Garcia HH, Martinez M, Gilman R, Herrera G, Tsang VC, Pilcher JB, et al. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Lancet*. 1991;338(8766):549-51.
 70. Atluri SRV, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Neurocysticercosis immunodiagnosis using *Taenia solium* cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children. *Acta Trop*. 2009;110(1):22-7.
 71. Ayala-Sulca E, Miranda-Ulloa E. [Evaluation of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test using purified native antigen mix from cisticercus fluid of *Taenia solium* for diagnosis of human cysticercosis]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(3):485-91.
 72. Escalante H, Miranda E, Lorca M, Verástegui M. La Técnica de «Western blot» con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus cellulosae*. *Bol Per Parasitol*. 1995;v11(1):26-31.
 73. Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY, et al. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(2):291-4.
 74. Sahu PS, Parija SC, Jayachandran S. Antibody specific to 43kDa excretory-secretory antigenic peptide of *Taenia solium* metacestode as a potential diagnostic marker in human neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2010;115(3):257-61.

75. Shiguekawa KY, Mineo JR, de Moura LP, Costa-Cruz JM. ELISA and western blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. *Trop Med Int Health*. 2000;5(6):443-9.
76. Zimic M, Pajuelo M, Rueda D, López C, Arana Y, Castillo Y, et al. Utility of a protein fraction with cathepsin L-Like activity purified from cysticercus fluid of *Taenia solium* in the diagnosis of human cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(6):964-70.
77. Bae Y-A, Jeong Y-T, Chung J-Y, Kin S-H, Mahanta J, Feng Z, et al. A recombinant chimeric antigen toward a standardized serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2:1596-1610
78. Bae Y-A, Yeom J-S, Wang H, Kim S-H, Ahn C-S, Kim J-T, et al. *Taenia solium* metacestode fasciclin-like protein is reactive with sera of chronic neurocysticercosis. *Trop Med Int Health*. 2014;19(6):719-25.
79. Chung JY, Bahk YY, Huh S, Kang SY, Kong Y, Cho SY. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *J Infect Dis*. 1999;180(4):1307-15.
80. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, et al. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2004;133(1):115-24.
81. Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;147(1):109-17.
82. Hernández-González A, Noh J, Perteguer MJ, Gárate T, Handali S. Comparison of T24H-his, GST-T24H and GST-Ts8B2 recombinant antigens in western blot, ELISA and multiplex bead-based assay for diagnosis of neurocysticercosis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):237.
83. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, et al. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;180(2):115-9.
84. Scheel CM, Khan A, Hancock K, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, et al. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(4):771-6.
85. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LDR, Livramento J, Mielle SR. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *J. Clin. Microbiol*. 2000;38(1):146-51.

86. Bueno EC, Snege M, Vaz AJ, Leser PG. Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(6):1140-4.
87. da Silva GB, Nunes DS, de Sousa JEN, Gonçalves-Pires M do RF, Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Antigenic fractions from *Taenia crassiceps* metacestodes obtained by hydrophobicity for the immunodiagnosis of active and inactive forms of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid samples. *Parasitol Int.* 2017;66(2):134-8.
88. Gonçalves F de A, Machado GA, Oliveira HB, Rezende MTNP, Mineo JR, Costa-Cruz JM. Hydrophobic fraction of *Taenia saginata* metacestodes, rather than hydrophilic fraction, contains immunodominant markers for diagnosing human neurocysticercosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(3):254-9.
89. da Silva Nunes D, da Silva Ribeiro V, Manhani MN, Costa-Cruz JM. Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68(3):259-64.
90. Oliveira HB, Machado GA, Cabral DD, Costa-Cruz JM. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitol Res.* 2007;101(4):1007-13.
91. Arora N, Kaur R, Rawat SS, Kumar A, Singh AK, Tripathi S, et al. Evaluation of *Taenia solium* cyst fluid-based enzyme linked immunoelectro transfer blot for Neurocysticercosis diagnosis in urban and highly endemic rural population of North India. *Clin Chim Acta.* 2020;508:16-21.
92. Ponce R, León-Janampa N, Gilman RH, Liendo R, Roncal E, Luis S, et al. A novel enolase from *Taenia solium* metacestodes and its evaluation as an immunodiagnostic antigen for porcine cysticercosis. *Exp parasitol.* 2018;191:44-54.
93. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ.* 2009;339:b2535.
94. Aguilar-Rebolledo F, Meza-Lucas A, Torres J, Cedillo-Rivera R, Enciso A, Garcia RC, et al. Evaluation of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of neurocysticercosis in children. *J Child Neurol.* 2002;17(6):416-20.
95. Proaño-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, García-Jerónimo RC, Correa D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2115-8.

96. Hernández M, Astudillo O-G, Diego G, de-la-Rosa-Arana J-L, Meza-Lucas A, García-Rodea R, et al. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: comparative performance of serum diagnostic tests in Mexico. *Parasitol Res.* 2019;118(10):2891-9.
97. Dermauw V, Carabin H, Cissé A, Millogo A, Tarnagda Z, Ganaba R, et al. Evaluating the Recombinant T24H Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot Assay for the Diagnosis of Neurocysticercosis in a Panel of Samples from a Large Community-Based Randomized Control Trial in 60 Villages in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(2):565-9.
98. Prabhakaran V, Rajshekhar V, Murrell KD, Oommen A. *Taenia solium* metacestode glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(8):478-84.
99. Noh J, Rodriguez S, Lee Y-M, Handali S, Gonzalez AE, Gilman RH, et al. Recombinant protein- and synthetic peptide-based immunoblot test for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1429-34.
100. Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med.* 2011;155(8):529-36.
101. Macaskill P, Gatsonis C, Deeks J, Harbord R, Takwoingi Y. Chapter 10: Analysing and Presenting Results. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy.* Cochrane Collaboration. 2010;(Version 1.0):61.
102. Lee J, Kim KW, Choi SH, Huh J, Park SH. Systematic Review and Meta-Analysis of Studies Evaluating Diagnostic Test Accuracy: A Practical Review for Clinical Researchers-Part II. *Statistical Methods of Meta-Analysis.* Korean Journal of Radiology. 2015;16(6):1188-96.
103. Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AWS, Scholten RJPM, Bossuyt PM, Zwinderman AH. Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. *J. Clin. Epidemiol.* 2005;58(10):982-90.
104. Rutter CM, Gatsonis CA. Regression methods for meta-analysis of diagnostic test data. *Academic Radiology.* 1995;2 Suppl 1:S48-56; discussion S65-67, S70-71 pas.
105. Harbord RM, Deeks JJ, Egger M, Whiting P, Sterne JAC. A unification of models for meta-analysis of diagnostic accuracy studies. *Biostatistics.* 2007;8(2):239-51.

106. Zamora J, Abraira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med. Res. Methodol.* 2006;6(1):31.
107. Harbord RM, Whiting P. Metandi: Meta-analysis of Diagnostic Accuracy Using Hierarchical Logistic Regression. *The Stata Journal.* 2009;9(2):211-29.
108. Mayta H, Talley A, Gilman RH, Jimenez J, Verastegui M, Ruiz M, et al. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):133-7.
109. Desjardins P, Hansen JB, Allen M. Microvolume Protein Concentration Determination using the NanoDrop 2000c Spectrophotometer. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2009;(33):e1610.
110. GE Healthcare. 2-D Electrophoresis Principles and Methods. 2004;162.
111. Bolt BJ, Rodgers FH, Shafie M, Kersey PJ, Berriman M, Howe KL. Using WormBase ParaSite: An Integrated Platform for Exploring Helminth Genomic Data. *Methods Mol Biol.* 2018;1757:471-91.
112. Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol.* 2019;37(4):420-3.
113. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel.* 2004;17(4):349-56.
114. Blum M, Chang H-Y, Chuguransky S, Grego T, Kandasaamy S, Mitchell A, et al. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic Acids Research.* 2021;49(D1):D344-54.
115. Almagro Armenteros JJ, Sønderby CK, Sønderby SK, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics.* 2017;33(21):3387-95.
116. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [citado 10 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
117. OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator [Internet]. [citado 10 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
118. NEB Tm Calculator [Internet]. [citado 10 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>

119. PCR Test [Internet]. [citado 10 de mayo de 2021]. Disponible en: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html
120. Webcutter 2.0 [Internet]. [citado 10 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://heimanlab.com/cut2.html>
121. Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y; 1982.
122. Istvan Lazar Jr, Istvan Lazar Sr. GelAnalyzer [Internet]. [citado 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: <http://www.gelanalyzer.com/?i=2>
123. Schoonjans F. MedCalc's Diagnostic test evaluation calculator [Internet]. MedCalc. [citado 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php
124. Thamilselvan P, Muthuraman KR, Thasan SA, Kasinathan G, Mandal J, Parija SC. A Stratified Analysis of Clinical Manifestations and Different Diagnostic Methods of Neurocysticercosis-Suspected TAMILIAN Population Residing in and Around Puducherry. *J Clin Diagn Res.* 2017;11(5):DC10-5.
125. Atluri VSR, Singhi PD, Khandelwal N, Malla N. 2D-PAGE analysis of *Taenia solium* metacestode 10-30 kDa antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. *Acta Trop.* 2011;118(2):165-9.
126. Villota GE, Gomez DI, Volcy M, Franco AF, Cardona EA, Isaza R, et al. Similar diagnostic performance for neurocysticercosis of three glycoprotein preparations from *Taenia solium* metacestodes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(3):276-80.
127. Barcelos IS da C, Moura LP de, Costa VP da, Ferreira MS, Costa-Cruz JM. *Taenia solium* metacestode immunodominant peptides recognized by IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum paired samples from patients with active and inactive neurocysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(6):713-7.
128. Lee E-G, Bae Y-A, Jeong Y-T, Chung J-Y, Je E-Y, Kim S-H, et al. Proteomic analysis of a 120 kDa protein complex in cyst fluid of *Taenia solium* metacestode and preliminary evaluation of its value for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Parasitology.* 2005;131(Pt 6):867-79.
129. Feldman M, Plancarte A, Sandoval M, Wilson M, Flisser A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(4):559-62.
130. Rodriguez-Canul R, Allan JC, Fletes C, Sutisna IP, Kapti IN, Craig PS. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4(5):579-82.

131. Yang HJ, Chung JY, Yun D, Kong Y, Ito A, Ma L, et al. Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol.* 1998;20(10):483-8.
132. Greene RM, Wilkins PP, Tsang VCW. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999;99(2):257-61.
133. Gekeler F, Eichenlaub S, Mendoza EG, Sotelo J, Hoelscher M, Löscher T. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21(3):227-9.
134. Salazar-Anton F, Lindh J. *Taenia solium*: a two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol.* 2011;128(4):371-6.
135. Nhancupe N, Noormahomed EV, Afonso S, Falk KI, Lindh J. Performance of Tsol-p27 antigen for the serological diagnosis of cysticercosis in Mozambique. *Journal of Helminthology.* 2016;90(5):630-3.
136. Zhang Y, Bae Y-A, Zong H-Y, Kong Y, Cai G-B. Functionally Expression of Metalloproteinase in *Taenia solium* Metacestode and Its Evaluation for Serodiagnosis of Cysticercosis. *Iran J Parasitol.* 2016;11(1):35-45.
137. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* 2014;13(12):1202-15.
138. World Health Organization. Landscape analysis: management of neurocysticercosis with an emphasis on low- and middle-income countries [Internet]. World Health Organization; 2015. Report No.: WHO/HTM/NTD/NZD/2015.05. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152896>
139. Kiroglu Y, Calli C, Karabulut N, Cagatay O. Intracranial calcifications on computed tomography: pictorial essay. *Diagnostic and Interventional Radiology.* 2009; Disponible en: <https://www.dirjournal.org/en/intracranial-calcifications-on-ct-13472>
140. Kojic EM, White AC. A positive enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay result for a patient without evidence of cysticercosis. *Clin Infect Dis.* 2003;36(1):e7-9.
141. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol.* 2009;167(1-9):1-11.
142. Sulima A, Savijoki K, Bień J, Näreaho A, Salamatin R, Conn DB, et al. Comparative Proteomic Analysis of *Hymenolepis diminuta* Cysticercoid and Adult Stages. *Front Microbiol.* 2018;8.

143. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunological memory. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th edition [Internet]. 2001; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27158/>
144. Garcia HH, Gilman RH, Catacora M, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VC. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. Cysticercosis Working Group in Peru. *J Infect Dis.* 1997;175(2):486-9.
145. Wu Z, Wang L, Li J, Wang L, Wu Z, Sun X. Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. *Front Immunol.* 2019;9.
146. Wang L-Q, Liu T-L, Liang P-H, Zhang S-H, Li T-S, Li Y-P, et al. Characterization of exosome-like vesicles derived from *Taenia pisiformis* cysticercus and their immunoregulatory role on macrophages. *Parasites & Vectors.* 2020;13(1):318.
147. Ponce Almerí R. Caracterización enzimática de una enolasa recombinante de *T. solium* y su potencial uso como antígeno inmunodiagnóstico de neurocysticercosis. Universidad Peruana Cayetano Heredia [Internet]. 2017; Disponible en: <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/633>
148. Riis B, Rattan SI, Clark BF, Merrick WC. Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(11):420-4.
149. Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. The Many Roles of the Eukaryotic Elongation Factor 1 Complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(4):543-55.
150. Ehsan M, Gadahi JA, Lu M, Yan R, Xu L, Song X, et al. Recombinant elongation factor 1 alpha of *Haemonchus contortus* affects the functions of goat PBMCs. *Parasite Immunology.* 2020;42(5).
151. Virginio VG, Monteiro KM, Drumond F, de Carvalho MO, Vargas DM, Zaha A, et al. Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Mol Biochem Parasitol.* 2012;183(1):15-22.
152. Skarin H, Ringqvist E, Hellman U, Svärd SG. Elongation factor 1-alpha is released into the culture medium during growth of *Giardia intestinalis* trophozoites. *Exp Parasitol.* 2011;127(4):804-10.
153. Demarta-Gatsi C, Rivkin A, Di Bartolo V, Peronet R, Ding S, Commere P-H, et al. Histamine releasing factor and elongation factor 1 alpha secreted via malaria parasites extracellular vesicles promote immune evasion by inhibiting specific T cell responses. *Cell Microbiol.* 2019;21(7):e13021.
154. Inomata A, Murakoshi F, Ishiwa A, Takano R, Takemae H, Sugi T, et al. Heparin interacts with elongation factor 1 α of *Cryptosporidium parvum* and inhibits invasion. *Sci Rep.* 2015;5.

155. Wang S, Zhang Z, Wang Y, Gadahi JA, Xu L, Yan R, et al. Toxoplasma gondii Elongation Factor 1-Alpha (TgEF-1 α) Is a Novel Vaccine Candidate Antigen against Toxoplasmosis. *Front Microbiol.* 2017;8.
156. Methods and compositions for detecting larval Taenia solium with a cloned diagnostic antigen - Abstract - Europe PMC. Disponible en: <https://europepmc.org/article/PAT/EP1282822#full-text-links>
157. Cruz-Rivera M, Torres J, Carrillo-Farga J, Wilkins PP, Flisser A, Mendlovic F. Distribution of Taenia solium Diagnostic Glycoproteins in the Different Developmental Stages of the Parasite. *J Parasitol.* 2019;105(4):642-50.
158. Díaz-Ramos À, Roig-Borrellas A, García-Melero A, López-Alemany R. α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012.
159. Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Espitia C, García-Varela M, Soberón X, Rosas G, et al. Identification and characterization of Taenia solium enolase as a plasminogen-binding protein. *Acta Trop.* 2018;182:69-79.
160. Figuera L, Gómez-Arreaza A, Avilán L. Parasitism in optima forma: exploiting the host fibrinolytic system for invasion. *Acta Trop.* 2013;128(1):116-23.
161. Chen N, Yuan Z-G, Xu M-J, Zhou D-H, Zhang X-X, Zhang Y-Z, et al. Ascaris suum enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine.* 2012;30(23):3478-82.
162. Ayón-Núñez DA, Fragoso G, Bobes RJ, Laclette JP. Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Biosci Rep.* 2018;38(5).
163. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 1999;344 Pt 2:281-92.
164. Jiang Y, Dey S, Matsunami H. Calreticulin: Roles in Cell-Surface Protein Expression. *Membranes (Basel).* 2014;4(3):630-41.
165. Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramírez G, et al. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol.* 2004;40(17):1279-91.
166. Ramírez-Toloza G, Aguilar-Guzmán L, Valck C, Ferreira VP, Ferreira A. The Interactions of Parasite Calreticulin With Initial Complement Components: Consequences in Immunity and Virulence. *Frontiers in Immunology.* 2020;11:1561.
167. Mendlovic F, Carrillo-Farga J, Torres J, Laclette JP, Flisser A. Differential expression of calreticulin in developmental stages of Taenia solium. 2006;92(4):789-95.

168. Cantacessi C, Seddon JM, Miller TL, Leow CY, Thomas L, Mason L, et al. A genome-wide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors. *Sci Rep*. 2013;3.
169. Hongli Y, Shuhan S, Ruiwen C, Yingjun G. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;119(1):1-5.
170. Lu Y-M, Wang N, Wang J-J, Wang K-H, Sun S-H. Expression, purification, and characterization of a novel Ca²⁺- and phospholipid-binding protein annexin B2. *Mol Biol Rep*. 2010;37(3):1591-6.
171. Zhang Y, Wang K-H, Guo Y-J, Lu Y-M, Yan H-L, Song Y-L, et al. Annexin B1 from *Taenia solium* metacestodes is a newly characterized member of the annexin family. 2007;388(6):601-10.
172. Gao Y-J, Yan H-L, Ding F-X, Lu Y-M, Sun S-H. Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction. *Acta Trop*. 2007;101(3):192-9.
173. Yan H-L, Xue G, Mei Q, Ding F-X, Wang Y-Z, Sun S-H. Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: a novel strategy to prevent host immune response. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(10):2151-63.
174. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*. 2008;307(1-2):249-64.
175. Hammarström M, Hellgren N, van den Berg S, Berglund H, Härd T. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci*. 2002;11(2):313-21.
176. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*. 2015;14:41.
177. Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in Cell Biology*. 1997;7(5):193-200.
178. Alvarez JI, Rivera J, Teale JM. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(4):e218.
179. Hofmann A, Osman A, Leow CY, Driguez P, McManus DP, Jones MK. Parasite annexins – New molecules with potential for drug and vaccine development. *BioEssays*. 2010;32(11):967-76.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Datos suplementarios del primer estudio: Revisión sistemática y metaanálisis de la sensibilidad y especificidad del western blot para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis.

Anexo 1.1. Palabras claves usadas para la búsqueda de artículos para la revisión sistemática.

Base de datos	Palabra clave	No. de artículos encontrados	Total
PubMed (PubMed Advances Search Builder)	(Diagnosis) AND neurocysticercosis EITB[All Fields] AND ("taenia solium"[MeSH Terms] OR ("taenia"[All Fields] AND "solium"[All Fields]) OR "taenia solium"[All Fields])	2252 92	2344
Scopus (Advanced Search)	TITLE-ABS-KEY (diagnosis AND neurocysticercosis)	1645	1645
Google scholar (Advanced Search)	Diagnosis AND Neurocysticercosis AND immunoblot AND western blot AND EITB	433	433
Reference checking		1	1

Anexo 1.2. Características de los estudios incluidos en la revisión sistemática

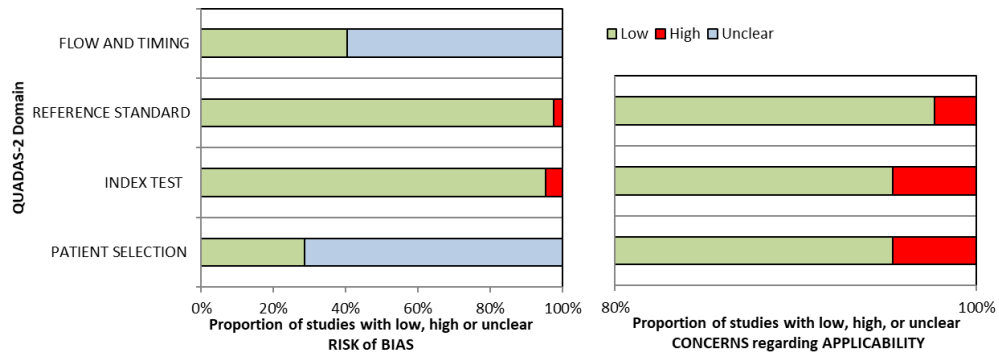
Autor	Año	Tipo de estudio	Tipo de antígeno	Nombre del antígeno	Procedencia de las muestras	Casos	Controles
Garcia	1991	Epidemiológico	Glicoproteína-CDC	LLGP	Perú	14	42
Palacio	1998	Epidemiológico	Glicoproteína-CDC	LLGP	Colombia	116	357
Cruz	1999	Epidemiológico	Glicoproteína-CDC	LLGP	Ecuador	14	12
Goodman	1999	Epidemiológico	Glicoproteína-comercial	LLGP	Ecuador	27	14
Sanchez	1999	Epidemiológico	Glicoproteína-comercial	LLGP	Honduras	46	13
Rajshekhhar	2006	Epidemiológico	Glicoproteína-in house	LLGP	India	46	116
Blocher	2011	Epidemiológico	Glicoproteína-CDC	LLGP	Tanzania	35	46
Mwape	2015	Epidemiológico	Glicoproteína-comercial	LLGP	Zambia	20	29
Moyano	2016	Epidemiológico	Glicoproteína-CDC	LLGP	Perú	47	202
Thamilselvan	2017	Epidemiológico	Glicoproteína-in house	Glicoproteínas	India	93	26
Zammarchi	2018	Epidemiológico	Glicoproteína-comercial *	LLGP	Varios países	11	2426
Tsang ^{&}	1989	Laboratorio	Glicoproteína-CDC	LLGP	No menciona	35	76
Feldman	1990	Laboratorio	Glicoproteína-CDC	LLGP	No menciona	21	27
Rodriguez-Canul	1997	Laboratorio	Glicoproteína-in house	LLGP	Varios países	57	103
Greene	1999	Laboratorio	Glicoproteína-in house	LLGP (14 y 18 kDa)	No menciona	72	55
Proaño-Narvaez	2002	Laboratorio	Glicoproteína-CDC	LLGP	México	100	70
Aguilar-Rebolledo	2002	Laboratorio	Glicoproteína-comercial	LLGP	México	25	50
Gekeler	2002	Laboratorio	Glicoproteína-in house	Glicoproteínas purificadas	Varios países [§]	24	144
Villota	2003	Laboratorio	Glicoproteína-comercial	LLGP	Varios países	62	55
Prabhakaran	2004	Laboratorio	Glicoproteína-in house	LLGP	India	150	150
Noh	2014	Laboratorio	Glicoproteína-CDC	LLGP	Perú [§]	159	401
Ayala-Sulca	2015	Laboratorio	Glicoproteína-in house	LLGP	No menciona [§]	50	50

Dermauw	2018	Laboratorio	Glicoproteína-CDC	LLGP	Burkina Faso	28	113
Hernandez,	2019	Laboratorio	Glicoproteína-in house	LLGP	México	58	41
Chung	1999	Laboratorio	Recombinante	r10kDa	No menciona	219	180
Scheel	2005	Laboratorio	Recombinante	TSRS1	Perú ^{\$}	307	308
Hanckok	2006	Laboratorio	Recombinante	rT24H	Perú ^{\$}	301	290
Bae	2008	Laboratorio	Recombinante	Antígeno quimérico	No menciona	200	271
Rueda	2011	Laboratorio	Recombinante	TsAg5	Perú ^{\$}	165	196
Bae	2014	Laboratorio	Recombinante	rTsMFas1	No menciona	100	299
Noh (b)	2014	Laboratorio	Recombinante	rLLGP	Perú ^{\$}	159	401
Hernandez-Gonzalez	2017	Laboratorio	Recombinante	rT24H-his	Perú ^{\$}	149	171
Dermauw (b)	2018	Laboratorio	Recombinante	rT24H	Burkina Faso	28	113
Escalante	1995	Laboratorio	Otras proteínas nativas	FV (8 bandas)	No menciona ^{\$}	35	76
Rodriguez-Canul (b)	1997	Laboratorio	Otras proteínas nativas	TSE	Varios países	57	103
Yang	1998	Laboratorio	Otras proteínas nativas	FV (10 kDa)	No menciona	247	125
Ito	1998	Laboratorio	Otras proteínas nativas	FV (10 a 26 kDa)	Varios países	53	206
Shiguekawa	2000	Laboratorio	Otras proteínas nativas	TSE	Brasil	20	40
Villota (b)	2003	Laboratorio	Otras proteínas nativas	FV (12-28 kDa)	Varios países	62	55
Lee	2005	Laboratorio	Otras proteínas nativas	FV (120 kDa)	No menciona	50	30
Barcelo	2007	Laboratorio	Otras proteínas nativas	TSE (12-70 kDa)	Brasil	20	10
Atluri	2009	Laboratorio	Otras proteínas nativas	ES (10-30 kDa)	India	125	125
Zimic,	2009	Laboratorio	Otras proteínas nativas	Catepsina L (53kDa)	Perú ^{\$}	100	157
Sahu	2010	Laboratorio	Otras proteínas nativas	ES (42 kDa)	No menciona	34	198
Atluri, 2011	2011	Laboratorio	Otras proteínas nativas	LMM (10-30 kDa)	India	38	25
Arora 2020	2020	Epidemiológico	Otras proteínas nativas	FV (15 kDa band)	India	119	287

LLGP= glicoproteínas purificadas con Lentil Lectin; ES= Excretorio secretorio, FV= fluido vesicular o liquido del cisticercos; LMM= proteínas de cisticercos de bajo peso molecular; TSE= extracto salino total del cisticercos. * también usaron el kit comercial de la marca LDBIO Diagnostic (Lyon, France); \$= los controles provienen de zonas no endémicas. &= las muestras son tanto de suero como de LCR

Anexo 1.3. Calidad de los estudios de acuerdo con la herramienta QUADAS-

2.



	RISK OF BIAS				APPLICABILITY CONCERN		
	PATIENT SELECTION	INDEX TEST	REFERENCE STANDARD	FLOW AND TIMING	PATIENT SELECTION	INDEX TEST	REFERENCE STANDARD
Estudio 1	Unclear	Low	Low	Unclear	High	Low	Low
Estudio 2	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 3	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 4	Unclear	High	High	Unclear	High	High	High
Estudio 5	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 6	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 7	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 8	Unclear	High	Low	Unclear	Low	High	Low
Estudio 9	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 10	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 11	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 12	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 13	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 14	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 15	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 16	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 17	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 18	Low	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 19	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 20	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 21	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 22	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low
Estudio 23	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 24	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 25	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 26	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low
Estudio 27	Unclear	Low	Low	Unclear	Low	Low	Low

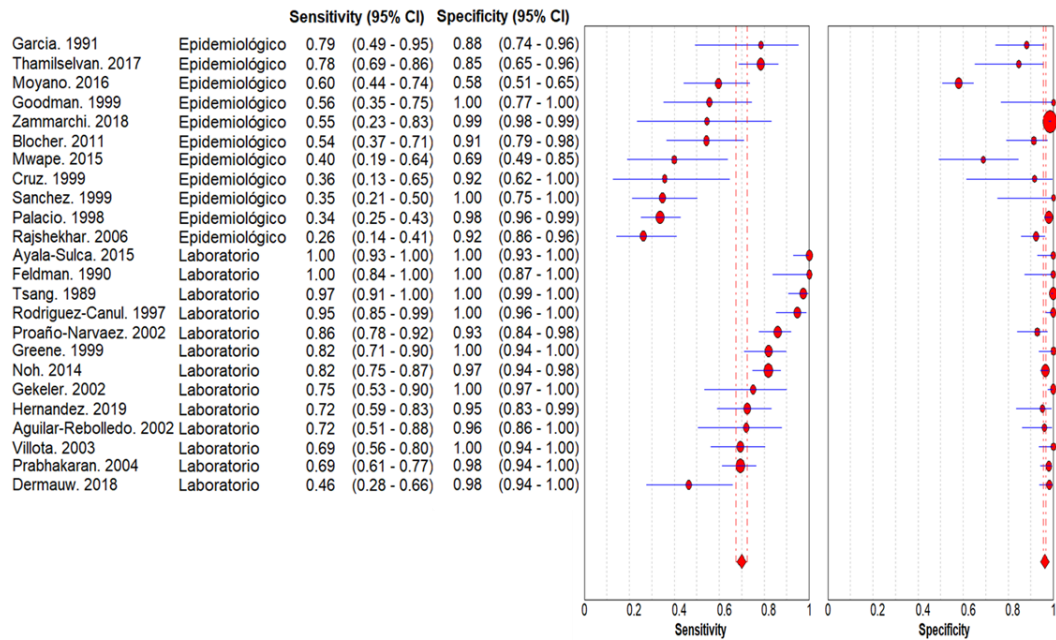
Estudio 28								
Estudio 29								
Estudio 30								
Estudio 31								
Estudio 32								
Estudio 33								
Estudio 34								
Estudio 35								
Estudio 36								
Estudio 37								
Estudio 38								
Estudio 39								
Estudio 40								
Estudio 41								
Estudio 42								

Verde: Riesgo bajo de sesgo o concerniente a la aplicabilidad; Rojo: Riesgo alto de sesgo o concerniente a la aplicabilidad; Celeste: "unclear" no está claro.

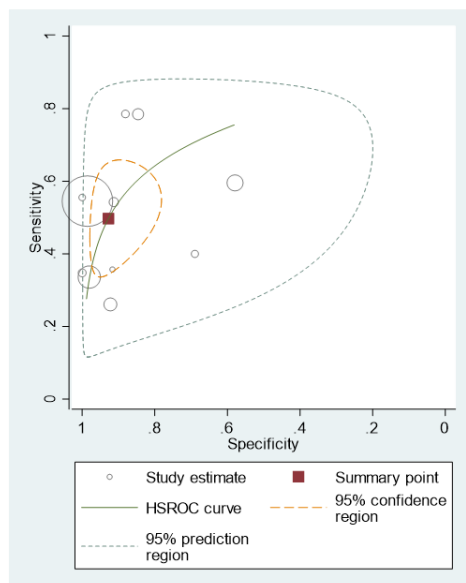
Los 42 estudios incluidos cumplen la mayoría de los criterios de calidad, sin embargo, la información de la selección de pacientes y el intervalo de tiempo apropiado para el procesamiento de la prueba y el estándar de referencia no es claro (unclear), los cuales podrían inducir sesgo.

Anexo 1.4. Gráficos que muestran la sensibilidad y especificidad resumen del EITB que usa glicoproteínas, analizados de acuerdo con el tipo de estudio.

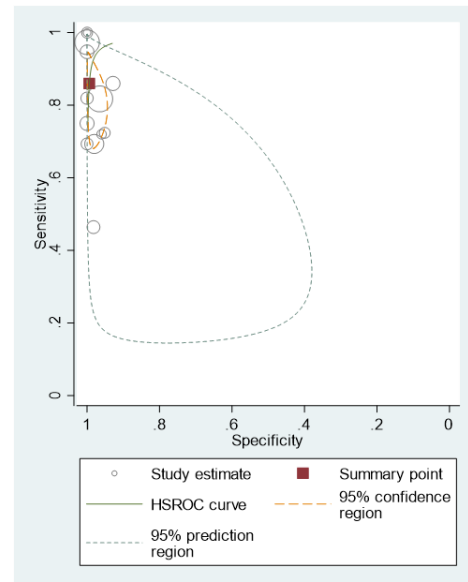
A)



B) Epidemiológico



C) Laboratorio

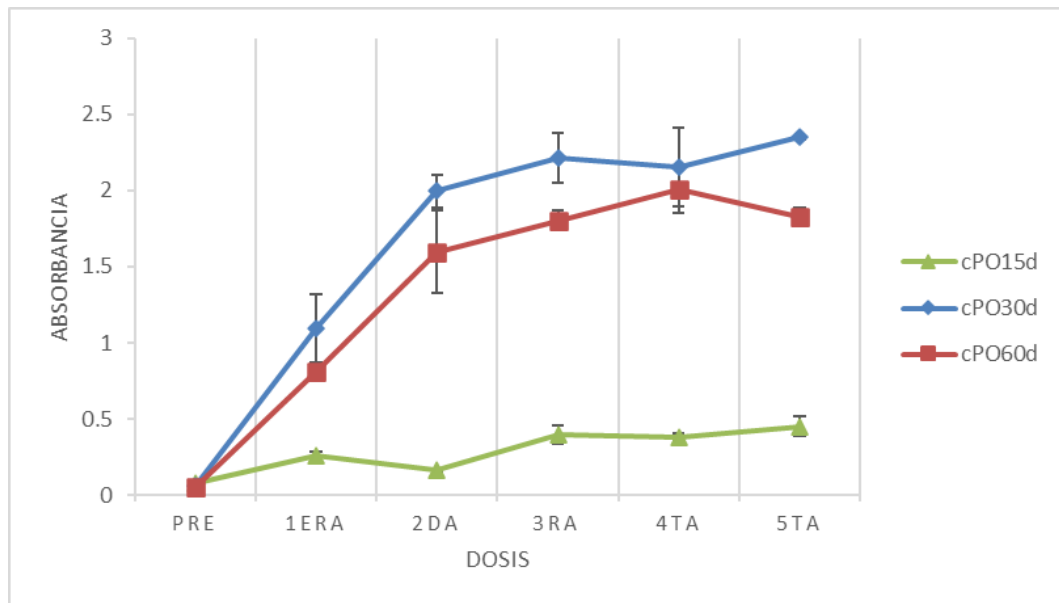


A) Forestplot que muestra la sensibilidad y especificidad de los estudios que usaron el EITB con glicoproteínas. Curva HSROC que muestra la sensibilidad y especificidad resumen de la prueba en estudios epidemiológicos (B) y de laboratorio (C).

Anexo 2. Calendario de toma de muestras e inmunización de conejos

	Día 1	Día 15	Día 22	Día 29	Día 35	Día 41
Sangrado	Suero pre-inmune	Suero post inmune de la primera dosis	Suero post inmune de la segunda dosis	Suero post inmune de la tercera dosis	Suero post inmune de la cuarta dosis	Sangrado total
Inmunización	1era dosis: Antígeno + Adyuvante completo de Freund	2da dosis: Antígeno + Adyuvante incompleto de Freund	3era dosis: Antígeno + Adyuvante incompleto de Freund	4ta dosis: Antígeno + Adyuvante incompleto de Freund		

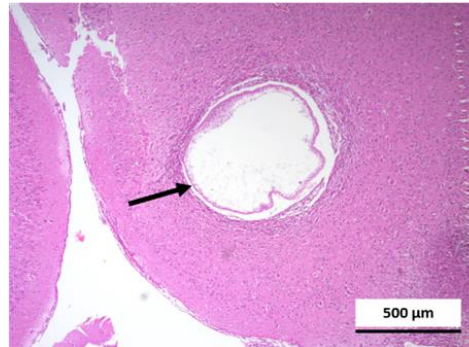
Anexo 3. Resultados del ELISA para evaluar la formación de anticuerpos policlonales anti- postoncosferas en conejos inmunizados con proteínas de postoncosferas de *T. solium*



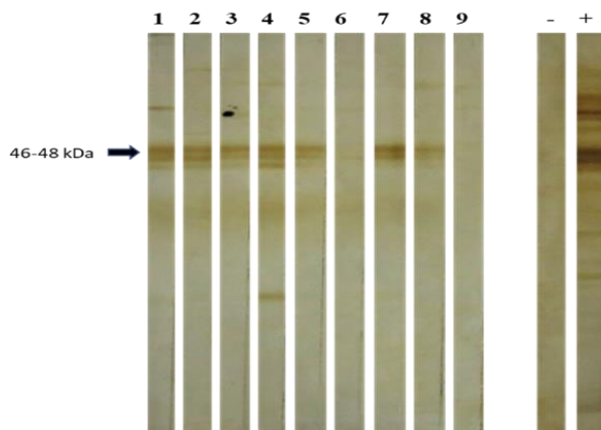
Leyenda: PRE= suero colectado antes de la inmunización; 1ERA= suero colectado 15 días después de la primera inmunización; 2DA= suero colectado a los 7 días después de la segunda inmunización; 3RA= suero colectado 7 días después de la tercera inmunización; 4TA= suero colectado 7 días después de la cuarta inmunización; 5TA= suero de conejo colectado 7 días después de la quinta inmunización. cPO15d= conejos inmunizados con proteínas de PO15d; cPO30d= conejos inmunizados con proteínas de PO30d; cPO60d= conejos inmunizados con proteínas de PO60d.

Anexo 4. Resultados de la evaluación de la formación de anticuerpos anti-postoncosfera en ratas infectadas con postoncosferas de 15 días.

A)

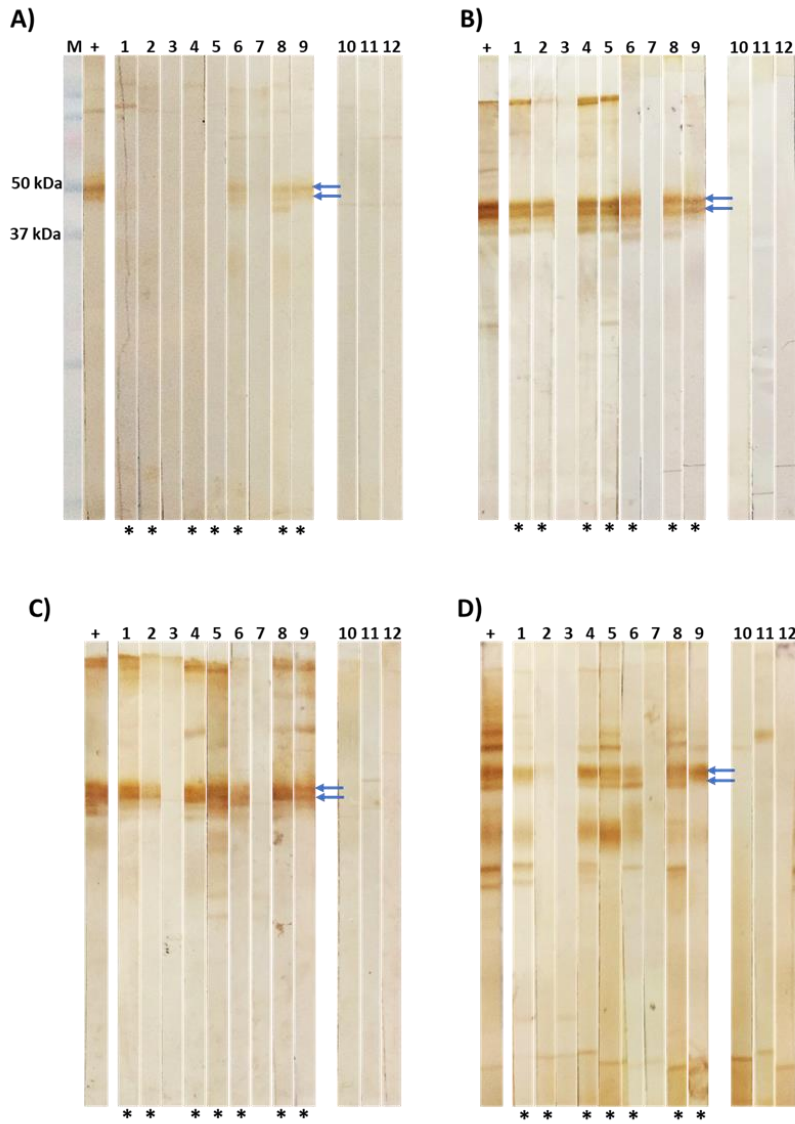


B)



A) Corte coronal de cerebro de rata infectada, teñido con hematoxilina y eosina, se señala una postoncosfera de *T. solium* en el parénquima cerebral. B) Western blot de proteínas solubles totales de postoncosfera incubadas con suero de ratas. Carril 1-8= suero de ratas infectadas con postoncosferas, carril 9= suero de rata no infectada. Carril - = control negativo (suero de conejo pre inmune), Carril + = control positivo (suero de conejo anti-postoncosfera).

Anexo 5. Resultados del western blot para evaluar la formación de anticuerpos anti-postoncosfera en suero de ratas infectadas con oncósferas de *T. solium*



Western blot de proteínas solubles totales de postoncosferas de 30 días de cultivo incubados con suero de ratas a diferentes tiempos post infección con oncósferas activadas. Suero de ratas al mes (A), 2 meses (B), 4 meses (C), y 6 meses (D) post infección (carril 1-9). Carril 10-12: Suero de ratas no infectadas; M: marcador de peso molecular; la flecha señala la banda de 46.48 kDa; (+) = control positivo; el asterisco indica las ratas que desarrollaron NCC.

Anexo 6. Proteínas identificadas por LC-MS/MS en la banda de 46 y 48 kDa de las proteínas solubles totales de postoncosferas de 30 días de cultivo, usando la base de datos de proteínas de *T. solium*

#	No. de acceso	Nombre de la proteína	emPAI
1	gi 269935947	Factor de elongación 1 alfa, parcial	9.99
2	gi 161650	Actina	7.65
3	gi 563425937	Enolasa	3.52
4	gi 14029538	Precursor de proteína de unión a calcio	1.16
5	gi 17901098	Producto proteico sin nombre, parcial*	1.54
6	gi 34368418	Proteína H17g, parcial	0.37
7	gi 18252397	Cu/Zn-SOD citosólica	0.37
8	gi 149364041	GA3P deshidrogenasa	0.51
9	gi 318054471	Lactato deshidrogenasa A	0.76
10	gi 62868630	Anexina B2	0.28
11	gi 4803713	Proteína inmunogénica	0.88
12	gi 158519654	Peroxiredoxina 2-Cys	0.26
13	gi 170783723	Proteína Ts5, parcial	0.17
14	gi 576902497	Fasciclina-1	0.06

*Los péptidos identificados también hicieron match con el antígeno de diagnóstico GP50 (gi|37787345, gi|37787347, gi|37787357, gi|37789875 and gi|37789877). emPAI= cuantificación relativa de proteínas en una mezcla; MW= Peso molecular; SOD= superóxido dismutasa; GA3P= Gliceraldehido-3-fosfato.

Anexo 7. Proteínas identificadas por LC-MS/MS en la banda de 46-48 kDa de las proteínas excretorio secretorio de postoncosferas de 30 días de cultivo, usando la base de datos de proteínas de *T. solium*

Nro.	No. de acceso	Nombre de la proteína	emPAI
1	gi 17901098	Producto proteico sin nombre, parcial*	8.78
2	gi 563425937	Enolasa	1.58
3	gi 161650	Actina	0.26
4	gi 269935947	Factor de elongación 1 alfa, parcial	0.14
5	gi 37547392	Proteína de diagnóstico TSES38	0.17
6	gi 283466482	PEPCK, parcial	0.09

*Los péptidos identificados también hicieron match con el antígeno de diagnóstico GP50 (gi|37787345, gi|37787347, gi|37787357, gi|37789875 and gi|37789877). emPAI= cuantificación relativa de proteínas en una mezcla; MW= Peso molecular; PEPCK=fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

Anexo 8. Proteínas identificadas por LC-MS/MS a partir de la banda de 46-48 kDa de las proteínas solubles totales de postoncosferas de *T. solium*, la identificación se realizó usando la base de datos de proteínas de *E. granulosus*

Rank	Accession No.	Protein Name	emPAI
1	gi 148717323	Elongation factor 1 alpha	12.00
2	gi 576690717	Actin	5.81
3	gi 674567518	Tubulin beta 2C chain	3.09
4	gi 576693212	Actin, cytoplasmic 2	4.33
5	gi 576701165	Tubulin alpha-1C chain	1.23
6	gi 576692431	Actin-1	1.94
7	gi 576693973	Tubulin beta chain	1.73
8	gi 290399	Actin 2	1.60
9	gi 674561833	Tubulin alpha 1C chain	1.22
10	gi 576697602	Tubulin beta-3 chain	0.58
11	gi 576693841	Enolase	0.48
12	gi 674561755	Tubulin alpha 3 chain	0.65
13	gi 674561756	Tubulin alpha 1C chain	0.65
14	gi 12641923	Actin-filament fragmenting protein	0.61
15	gi 674561754	Tubulin alpha 3 chain	0.49
16	gi 576699737	26S protease regulatory subunit 6B	0.38
17	gi 237770567	Beta-tubulin isoform 3, partial	4.39
18	gi 576693855	Aldehyde dehydrogenase family 1 member A3	0.47
19	gi 62178026	Putative calreticulin, partial	0.13
20	gi 576696158	Adenosylhomocysteinase A	0.19
21	gi 576697601	Tubulin beta-1 chain	0.99
22	gi 576693390	DnaJ subfamily A member	0.76
23	gi 576694655	Histone-binding protein RBBP4	0.23
24	gi 576698640	Ornithine aminotransferase	0.24
25	gi 576698586	26S protease regulatory subunit 6A	0.64
26	gi 576700018	60S ribosomal protein L4	0.65
27	gi 576699936	RuvB-like protein	0.10
28	gi 576697808	ATP synthase subunit beta	0.71
29	gi 576698857	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	0.43
30	gi 576699603	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.30
31	gi 576692380	Methionine aminopeptidase	0.21
32	gi 576696293	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.15
33	gi 674564130	Splicing factor arginine:serine rich 4	0.63
34	gi 576693487	Alanine aminotransferase 2	0.29
35	gi 576701512	Proliferation-associated protein 2G4	0.25
36	gi 576700988	Fructose-bisphosphate aldolase	0.29
37	gi 576696602	T-complex protein 1 subunit eta	0.03
38	gi 576699122	ATP-dependent RNA helicase Ddx1	0.10
39	gi 576701206	Tubulin beta-4 chain	0.35

40	gi 576696439	Tubulin beta-1 chain	0.08
41	gi 576689886	Ubiquitin	0.64
42	gi 576700100	Dihydrolipoyl dehydrogenase	0.10
43	gi 576693238	Sj-Ts4 protein	0.34
44	gi 576696761	Sarcoplasmic calcium-binding protein	0.12
45	gi 509760	EG10	0.17
46	gi 576700570	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit	0.22
47	gi 674565030	Tubulin beta 4A class Iva	0.07
48	gi 576692646	4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase	0.10
49	gi 576695686	Hexokinase	0.34
50	gi 576693940	Galactokinase	0.21
51	gi 576699121	RNA-binding protein Rsf1	0.20
52	gi 674568550	Phosphoglycerate kinase 1	0.24
53	gi 576693001	Major vault protein	0.42
54	gi 576694207	Glutamate dehydrogenase 2	0.09
55	gi 60459970	Tegumental protein, partial	0.50
56	gi 674561667	Major vault protein	0.05
57	gi 576696606	Hypothetical protein EGR_05011	0.17
58	gi 576696962	Polyadenylate-binding protein	0.13
59	gi 576690038	L-lactate dehydrogenase A chain	0.13
60	gi 300519104	Lactate dehydrogenase	0.15
61	gi 576694535	Eukaryotic translation initiation factor 5	0.11
62	gi 674563254	Neurogenic locus notch protein	0.02
63	gi 576694080	Actin-related protein 3B	0.11
64	gi 674565768	Adenylyltransferase and sulfurtransferasa	0.11
65	gi 674568481	Pseudouridine metabolizing bifunctional protein	0.07
66	gi 576701340	Eukaryotic peptide chain release factor subunit	0.11
67	gi 674568053	Hypothetical protein EgrG_000990300	0.03
68	gi 576694570	Hypothetical protein EGR_06985	0.06
69	gi 576694425	Intraflagellar transport protein	0.07
70	gi 576700901	Beta-centractin	0.12
71	gi 576694030	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	0.11
72	gi 576697981	60S ribosomal protein L3	0.05
73	gi 576693827	Protein farnesyltransferase subunit beta	0.10

Anexo 9. Proteínas identificadas por LC-MS/MS a partir de la banda de 46-48 kDa de las proteínas excretorio secretorio de postoncosferas de *T. solium*, la identificación se realizó usando la base de datos de proteínas de *E. granulosus*

Rank	Accession No.	Protein Name	emPAI
1	gi 262192839	Enolase	0.69
2	gi 576693212	Actin, cytoplasmic 2	0.26
3	gi 674561213	Annexin	0.22
4	gi 576695835	Phosphoglycerate kinase	0.25
5	gi 576696606	Hypothetical protein EGR_05011	0.16
6	gi 576697075	Kinesin heavy chain	0.24
7	gi 576696835	Coiled-coil domain-containing protein 6	0.08
8	gi 576697203	Fatty-acid amide hydrolase	0.08
9	gi 576697354	Splicing factor, arginine/serine-rich 17a	0.08
10	gi 674569074	Protein piccolo	0.02
11	gi 576691028	Glutamate receptor, ionotropic kainite	0.02
12	gi 576697916	Hypothetical protein EGR_03744	0.24
13	gi 674566783	Translation initiation factor eIF 2B subunit	0.09
14	gi 148717323	Elongation factor 1 alpha	0.11
15	gi 674568309	Expressed conserved protein	0.18
16	gi 576689886	Ubiquitin	0.62
17	gi 576700572	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme	0.04
18	gi 576699607	Hypothetical protein EGR_01937	0.06
19	gi 674568160	Tegumental antigen	0.23
20	gi 576701335	Splicing factor, arginine/serine-rich	0.21

Anexo 10. Proteínas identificadas por LC-MS/MS en la banda de 46-48 kDa de postoncosferas de *T. solium*, ordenados por peso molecular

No.	Nombre de la proteína	Especie	Tipo	No. de acceso*	MW kDa
1	Proteína inmunogénica	T. sol	ST	gi 4803713	7.5
2	Proteína tegumental	E. gran	ST	TsM_001096900	11.5
3	Ubiquitina	E. gran	ST, ES	TsM_000015500	14.7
4	Cu/Zn-SOD citosólica	T. sol	ST	gi 18252397	15.5
5	Factor <i>Splicing</i> , rico en arginina/serina	E. gran	ES	TsM_000924800	20.5
6	Antígeno tegumental	E. gran	ES	TsM_000884000	20.8
7	Peroxiredoxina 2-Cys	T. sol	ST	gi 158519654	21.5
8	Proteína hipotética EGR_03744	E. gran	ES	gi 576697916	22.4
9	Ornitina aminotransferasa	E. gran	ST	TsM_000860800	26.9
10	Proteína conservada expresada	E. gran	ES	TsM_000848700	27.3
11	Proteína Sj-Ts4	E. gran	ST	TsM_000707000	29.3
12	Proteína Rsf1 de unión a RNA	E. gran	ST	TsM_001215900	29.6
13	Proteína de diagnóstico TSES38	T. sol	ES	gi 37547392	30.5
14	Proteína hipotética EGR_05011	E. gran	ST, ES	gi 576696606	32.5
15	Producto proteico sin nombre, P	T. sol	ST, ES	TsM_000313800	32.9
16	Proteína Ts5, P	T. sol	ST	TsM_000634600	34.7
17	Lactato deshidrogenasa A	T. sol	ST	gi 318054471	35.4
18	GA3P deshidrogenasa	T. sol	ST	gi 149364041	36.2
19	Fructosa-difosfato aldolasa	E. gran	ST	TsM_000467100	39.6
20	Anexina B2	T. sol	ST	gi 62868630	40.1
21	Factor <i>splicing</i> rico en arginina:serina 4	E. gran	ST	TsM_001145100	41.0
22	Proteína fragmentadora de actina F	E. gran	ST	TsM_000982900	41.5
23	Actina	T. sol	ST, ES	gi 161650	41.7
24	Beta-centractina	E. gran	ST	TsM_000042800	41.9
25	Fosfoglicerato quinasa	E. gran	ST, ES	TsM_000796500	42.3
26	SU 2 del factor iniciador de la traducción	E. gran	ST	TsM_000901400	42.3
27	Miembro A de la subfamilia DnaJ	E. gran	ST	TsM_000711700	44.0
28	Proteína 3B relacionado a actina	E. gran	ST	TsM_000021200	45.2
29	Metionina aminopeptidasa	E. gran	ST	TsM_001067900	45.4
30	Precursor de proteína de unión a calcio	T. sol	ST	gi 14029538	45.5
31	Enolasa	T. sol	ST, ES	gi 563425937	46.5
32	Proteína hipotética EGR_06985	E. gran	ST	TsM_000276900	46.6
33	SU 6B reguladora de proteasa 26S	E. gran	ST	TsM_000506400	46.6
34	Proteína L4 ribosomal 60S	E. gran	ST	TsM_001179700	46.9
35	Proteína 2G4 asociada a proliferación	E. gran	ST	TsM_000488200	47.0
36	Anexina	E. gran	ES	TsM_000511100	47.4
37	Proteína L3 ribosomal 60S	E. gran	ST	TsM_000850600	47.6
38	SU 6A reguladora de la proteasa 26S	E. gran	ST	TsM_000546900	47.9
39	Proteína de unión a histona RBBP4	E. gran	ST	TsM_000275100	48.4
40	Factor de elongación 1 alfa,	T. sol	ST, ES	TsM_000233800	48.8

41	Galactoquinasa	E. gran	ST	TsM_000027400	49.1
42	SU del factor de liberación de la cadena peptídica eucariota	E. gran	ST	TsM_000736100	49.6
43	Cadena beta 2C de Tubulina	E. gran	ST	TsM_001072900	49.8
44	Dihidrolipoil deshidrogenasa	E. gran	ST	TsM_000008100	50.1
45	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	E. gran	ST	TsM_000761500	50.2
46	Proteína similar a RuvB	E. gran	ST	TsM_001063200	50.5
47	Adeniltransferasa y sulfurtransferasa	E. gran	ST	TsM_000203600	50.7
48	Adenosilhomocisteinasa A	E. gran	ST	TsM_000665600	51.4
49	Miembro A3 de familia 1 de ALDH2	E. gran	ST	TsM_000803900	52.3
50	Hexoquinasa	E. gran	ST	TsM_000818100	52.4
51	4-hidroxiubutirato coenzima A transferasa	E. gran	ST	TsM_000154800	53.1
52	Alanina aminotransferasa 2	E. gran	ST	TsM_000574000	53.7
53	SU B de proteína farnesiltransferasa	E. gran	ST	TsM_000758600	53.7
54	Cadena alfa 1C de Tubulina	E. gran	ST	TsM_000455000	54.1
55	SU beta de la ATP sintasa	E. gran	ST	TsM_000805000	55.7
56	Enzima activadora del modificador similar a ubiquitina	E. gran	ES	TsM_000950000	56.3
57	Glutamato deshidrogenasa 2	E. gran	ST	TsM_000572800	58
58	SU eta 1 de proteína complejo – T	E. gran	ST	TsM_000034600	59.1
59	Factor iniciador de la traducción eIF2B	E. gran	ES	TsM_000602000	62.1
60	Proteína de unión a poliadenilato	E. gran	ST	TsM_000856300	62.8
61	Proteína 6 con dominio <i>Coiled-coil</i>	E. gran	ES	TsM_000747700	64.1
61	Amida hidrolasa de ácidos grasos	E. gran	ES	TsM_000650400	65.1
63	Proteína H17g	T. sol	ST	TsM_000841100	67.8
64	EG10	E. gran	ST	TsM_000841100	67.8
65	Kinesina cadena pesada	E. gran	ES	TsM_000661100	69.4
66	PEPCK	T. sol	ES	TsM_000763700	70.2
67	Proteína de transporte intrafagelar	E. gran	ST	TsM_001197500	70.9
68	Proteína bifuncional metabolizadora de pseudouridina	E. gran	ST	TsM_001016100	74.6
69	Fasciclina-1	T. sol	ST	gi 576902497	86.9
70	Proteína hipotética EGR_01937	E. gran	ES	TsM_000952600	91.1
71	Receptor de Glutamato, ionotrópico Kainato	E. gran	ES	TsM_000736700	95.8
72	Proteína Major vault	E. gran	ST	TsM_000555100	97.1
73	Proteína hipotética EgrG_000990300	E. gran	ST	TsM_000766200	142.1
74	RNA Helicasa Ddx1 dependiente de ATP	E. gran	ST	TsM_000355600	145.1
75	Proteína Piccolo	E. gran	ES	TsM_000137400	170.2
76	Proteína notch neurogenic locus	E. gran	ST	TsM_001015200	342.6

*Código de la base de datos de proteínas (NCBI) o código del genoma de *T. solium* (WormBase Parasite); ST= proteínas solubles totales; ES= proteínas excretorio secretorio; T sol= *Taenia solium*; E. gran= *Echinococcus granulosus*; SU= subunidad; ALDH2= aldehído deshidrogenasa; PEPCK0= fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; SOD= superóxido dismutasa; GA3P= Gliceraldehído-3-fosfato. MW= Peso molecular;

Anexo 11. Alineamiento de la secuencia completa del factor de elongación nuclear (TsM_000233800) con la secuencia parcial (gi|269935947). Las regiones de color rojo muestran la secuencia de los péptidos encontrados por LC-MS/MS.

TsM_000233800	1	MGKEKTHINLIVIGHVDSGKSTSTGHLLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAAEMG	50
gi 269935947	1	-----MG	2
TsM_000233800	51	KSSFKYAWVLDKDKAERERGITIDIALWKFETPKYLVTTIIDAPGHRDFIK	100
gi 269935947	3	KSSFKYAWVLDKDKAERERGITIDIALWKFETPKYLVTTIIDAPGHRDFIK	52
TsM_000233800	101	NMITGTSQADCAILVVAAGTGEFEAGISKNQGQTRHALLAFTLVGKKLI	150
gi 269935947	53	NMITGTSQADCAILVVAAGTGEFEAGISKNQGQTRHALLAFTLVGKKLI	102
TsM_000233800	151	AVNKMDAVDYSEKRFQEISSEMKA YIKKVGYNPDTVNI VPI SGWVGDNML	200
gi 269935947	103	AVNKMDAVDYSEKRFQEISSEMKA YIKKVGYNPDTVNI VPI SGWVGDNML	152
TsM_000233800	201	EPSPNMPWYKGPTLLASIDLVEPPTRPVDPKPLRLPLQDVFKISGIGTVPV	250
gi 269935947	153	EPSPNMPWYKGPTLLASIDLVEPPTRPVDPKPLRLPLQDVFKISGIGTVPV	202
TsM_000233800	251	GRVETGIMKPGMIVTFAPVGISTEVKSIEMHHEALAEAVPGDNVGFNVKN	300
gi 269935947	203	GRVETGIMKPGMIVTFAPVGISTEVKSIEMHHEALAEAVPGDNVGFNVKN	252
TsM_000233800	301	ISVKDVRGNVAGDSKNHPPREAGEFTAQVIVLNHPGEIGAGYTPVLDCH	350
gi 269935947	253	ISVKDVRGNVAGDSKNHPPREAGEFTAQVIVLNHPGEIGAGYTPVLDCH	302
TsM_000233800	351	TAHIACKFAELKEKIDRRTGQVKETNPAAIKSGDAAIVRMVPSKPMCVEV	400
gi 269935947	303	TAHIACKFAELKEKIDRRTGQVKETNPAAIKSGDAAIVRMVPS-----	345
TsM_000233800	401	FSEFPPLGRFAVRDMRSTVAVGVKAVIFKDKEAKATKSAQKAAKAKK	448
gi 269935947	346	-----	345

Anexo 13. Alineamiento de la secuencia completa de la proteína GP50 reportada en el genoma de *T. solium* (TsM_000313800) con las secuencias encontradas en el análisis proteómico de los péptidos identificados por espectrometría de masa

TsM_000313800	MLALTAVLIFVVSTSSSENAPKMWGSRVIGKPSGSPDTMSYEYNDNYRTVLINDSVLGTMS	60
PSN (gi 17901098)	-----IFVVSTSSSENAPKMWGSRVIGKPSGSPDTMSYEYNDNYRTVLINDSVLGTMS	52
GP50a	MLALTAVLIFVVSTSSSENAPKMWGSRVIGKPSGSPDTMSYEYNDNYRTVLINDSVLGTMS	60
GP50 parcial	-----WGSRVIGKPSGSPDTMSYEYNDNYRTVLINDSVLGTMS	38
PSN (gi 17901102)	-----SENAPKMWGSRVIGKPSGSPDTMSYEYNDNYRTVLINDSVLGTMS	45
GP50c	MLALTAVLIFVVSTSSSENAPKMWGSRVIGKPSGSPDTMSYEYNDNYRTVLINDSVLGTMS	60

TsM_000313800	IKRNQCMLWETKWPGEPCNIFPGYVNI TLNNVTAQKIMEMDEITARPRVASTTFFVPHCN	120
PSN (gi 17901098)	IKRNQCMLWETKWPGEPCNIFPGYVNI TLNNVTAQKIMEMDEITARPRVASTTFFVPHCN	112
GP50a	IKRNQCMLWETKWPGEPCNIFPGYVNI TLNNVTAQKIMEMDEITARPRVASTTFFVPHCN	120
GP50 parcial	IKRNQCMLWETKWPGEPCNIFPGYVNI TLNNVTAQKIMEMDEITARPRVASTTFFVPHCN	98
PSN (gi 17901102)	IKRNQCMLWETKWPGEPCNIFPGYVNI TLNNVTAQKIMEMDEITARPRVASTTFFVPHCN	105
GP50c	IKRNQCMLWETKWPGEPCNIFPGYVNI TLNNVTAQKIMEMDEITARPRVASTTFFVPHCN	120

TsM_000313800	FTKPAPGEVDVWTSFPLSRFVKDTPWFRVDFAVGGANYDSTATFDINATSLCFWRGTLL	180
PSN (gi 17901098)	FTKPAPGEVDVWTSFPLSRFVKDTPWFRVDFAVGGANYDSTATFDINATSLCFWRGTLL	172
GP50a	FTKPAPGEVDVWTSFPLSRFVKDTPWFRVDFAVGGANYDSTATFDINATSLCFWRGTLL	180
GP50 parcial	FTKPAPGEVDVWTSFPLSRFVKDTPWFRVDFAVGGANYDSTATFDINATSLCFWRGTLL	158
PSN (gi 17901102)	FTKPAPGEVDVWTSFPLSRFVKDTPWFRVDFAVGGANYDSTATFDINATSLCFWRGTLL	165
GP50c	FTKPAPGEVDVWTSFPLSRFVKDTPWFRVDFAVGGANYDSTATFDINATSLCFWRGTLL	180
	*****;	
TsM_000313800	YKGAEFCTDMVKDESADLRVFRGVFPRKTNISRESFAFAGLKTALTVSIDYSQSGISPEV	240
PSN (gi 17901098)	HKGAEFCTDMVKDESADLRVFRGVFPRKTNISRESFAFAGLKTALTVSIDYSQSGISPEV	232
GP50a	HKGAEFCTDMVKDESADLRVFRGVFPRKTNISRESFAFAGLKTALTVSIDYSQSGISPEV	240
GP50 parcial	HKGAEFCTDMVKDESADLRVFRGVFPRKTNISRESFAFAGLKTALTVSIDYSQSGISPEV	218
PSN (gi 17901102)	HKGAEFCTDMVKDESADLRVFRGVFPRKTNISRESFAFAGLKTALTVSIDYSQSGISPEV	225
GP50c	HKGAEFCTDMVKDESADLRVFRGVFPRKTNISRESFAFAGLKTALTVSIDYSQSGISPEV	240

TsM_000313800	ADCKQYAKVKDLSTLVATMPAYATKTSTRNNSKTTSSGFASMHTCRAIIALLLIPMVL	298
PSN (gi 17901098)	ADCKQYAKVKDLSTLVATMPAYATKTSTRNNSKTTSSGFASMHTCRAIIALLLIPMVL	290
GP50a	ADCKQYAKVKDLSTLVATMPAYATKTSTRNNSKTTSSGFASMHTCRAIIALLLIPMVL	298
GP50 parcial	ADCKQYAKVKDLSTLVATMPAYATKTSTRNNSKTTSSGFASMHTCRAIIA-----	268
PSN (gi 17901102)	ADCKQYAKVKDLSTLVATMPAYATKTSTGNNSKTTSSGFASMHTCRAIIALLLIPMVL	283
GP50c	ADCKQYAKVKDLSTLVATMPAYATKTSTGNNSKTTSSGFASMHTCRAIIALLLIPMVL	298
	;**	

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: TsM_000313800	100.00	98.97	98.99	98.88	98.59	98.66
2: PSN (gi 17901098)	98.97	100.00	100.00	100.00	99.65	99.66
3: GP50a (gi 37787345)	98.99	100.00	100.00	100.00	99.65	99.66
4: GP50 (gi 37789875)	98.88	100.00	100.00	100.00	99.63	99.63
5: PSN (gi 17901102)	98.59	99.65	99.65	99.63	100.00	100.00
6: GP50c (gi 37787357)	98.66	99.66	99.66	99.63	100.00	100.00

Las regiones de color rojo muestran la secuencia de los péptidos encontrados por LC-MS/MS; las regiones de color azul muestran los péptidos encontrados por MALDI-TOF/TOF; y las regiones de color violeta muestran los péptidos encontrados por ambos métodos. PSN= Producto proteico sin nombre (secuencia parcial), Gp50a=Precursor del antígeno de diagnóstico Gp50a (gi|37787345), GP50c= antígeno de diagnóstico GP50c (gi|37787357), GP50= secuencia parcial del antígeno de diagnóstico GP50 (gi|37789875).

Anexo 14. Alineamiento de la secuencia completa del precursor de la proteína de unión a calcio (gi|14029538) con los péptidos identificados por espectrometría de masa.

gi 14029538	1	MAVPAFLIALLFVVNTRAEVYFEDRFIESNIDKWE	KSKYDESNLGLCEYA	50
Péptidos	1	-----	KSKYDESNLGLCEYA	15
gi 14029538	51	KPKGDFDDKEDGGMRTIQDARFYRYSAPFNKPLSNKDKIMCVQFTV	KHEQ	100
Péptidos	16	KPKGDFDDKEDGGMRT-----RYSAPFNKPLSNKDK-----	KHEQ	50
gi 14029538	101	NIDCGGGYVKL	LLGESFKPDDFHGESPYEIMFGPDICGYDKKIVHVIFSYK	150
Péptidos	51	NIDCGGGYVKL-----	IVHVIFSYK	70
gi 14029538	151	GKNYLVKRDIPCKSDTLHLTYTLIVRPDNTFEVLIDN	KTAETGSLVADFD	200
Péptidos	71	-----	KTAETGSLVADFD	83
gi 14029538	201	MIPPRTIDDPDAK	KPEDWVDEAEIPDPDDKKPDDWDQPKTIVDTNAKQPE	250
LC-MS/MS	84	MIPPRTIDDPDAK-----		96
gi 14029538	251	DWNEETDGEWTAPMIDNPYKGEWHP	KMIPNPAYRGEWKPPQIPNPDHFE	300
Péptidos	97	-----	KMIPNPAYRGEWKPPQIPNPDHFE	120
gi 14029538	301	DSELYARTFAYIGLDLWQVKS	GTIFDNFIVSDNVSECQAHAEYWQKRF	350
Péptidos	121	DSELYARTFAYIGLDLWQVKS	GTIFDNFIVSDNVSECQAHAEYWQKRF---	167
gi 14029538	351	EEEEKKSFE	EKDKESS	395
Péptidos	168	-----		167

Las regiones de color rojo muestran la secuencia de los péptidos encontrados por LC-MS/MS. Las regiones de color azul muestran la secuencia de los péptidos identificados por MALDI-TOF/TOF; y las regiones de color violeta muestran los péptidos identificados por ambos métodos.

Anexo 15. Alineamiento de la secuencia de TsM_000511100 DE *T. solium* con la secuencia de anexina de *E. granulosus* (gi|674561213)

```

# Aligned sequences: 2
# 1: E. granulosus
# 2: T. solium
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 451
# Identity:      382/451 (84.7%)
# Similarity:    404/451 (89.6%)
# Gaps:          8/451 ( 1.8%)
# Score: 1979.5
##=====

E. granulosus    1  MAGYPPPVGFNTNLDAPAGYPPQGPMPGFPQGGYPPQGGQMGYPPQGMG    50
      |||||||||.|.|||||||||||:|||||.:|||    |||
T. solium       1  MAGYPPPVGFNINPDAPAGYPPQGPMPGYPPQGVHPPQG-----GQMG    42

E. granulosus   51  YPPQGMGYPPQGPMPQLPPQGMGYPPYGGQPGYGGAPPPQGGYTNVSG    100
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||.||||.||||.
T. solium       43  YPPQGMGYPPQGPMPQLPPQGMGYPPYGGQPGYGGAPLPQGGPTNVPG    92

E. granulosus  101 YGPPQPMGLGYGAGAVAGPSGSCGGAAMGFLSIYYSGRPTVVPMPCFNP    150
      |||.||||.|||||:..|||.|||||:|..|.|||||||.|||
T. solium      93  YGVSQPMGSGYGAGALGDPSPGYGGAAVGSFSAYYSGRPTVVPMPNFNP    142

E. granulosus  151 CDDAENLRKAMRGLGTDEGCI IAVLSKRTCGQRSEIAKKYKASFGKDLDK    200
      ..|||:|||||:|||||.||.|||||.|||||||.|||||:|
T. solium     143  GQDAEDLRKAMRGMGTDEGRIIGVLSKRTSNQRSEIAKKYKASFGKDLK    192

E. granulosus  201 HLKSELVSGFEELVLLSLETLPEMLATTMYDAMKGAGTDERLLIQALVPY    250
      |||||||||:|||||:|.|||||:|.:.|||:|||||||
T. solium     193  HLKSELVSGKFEDLVLLSLESLPGMLATTIYQAVKGVGTDEQLLIQALVPY    242

E. granulosus  251 SNAIVGEIPKAYNRKYGRDIIADVRSDTSGDFEKILVALLQAQREEGTPV    300
      .|:|||||.|||:..|||||:..|||||||||||||||||.|||
T. solium     243  PNSIVGEISKAYHTKYGRDVVEDVRSDTSGDFEKILVALLQAQREERTPV    292

E. granulosus  301 SVNCAADA AEALYKAGEKRLGTEEA VFTRILTQRSFEQIKAICQCYQQKY    350
      |||.|||||||||||.|||||||||||||||||.|||
T. solium     293  SVNGAAADA AEALYKAGENRLGTEEA VFTRILTQRSFEQIKAI AQSYQQKY    342

E. granulosus  351 GKSLETAIKKETS GDYRDTMVSIVRYAEDKNALLATWFYESMVGIGTRDK    400
      |:|:|:|||||:|:|.|||||||||||||.|.|||||:|||||
T. solium     343  GRSLESAIKKETS GNYKDAMVSIVRYAEDKNALLAAWLYESMVGMGTRDK    392

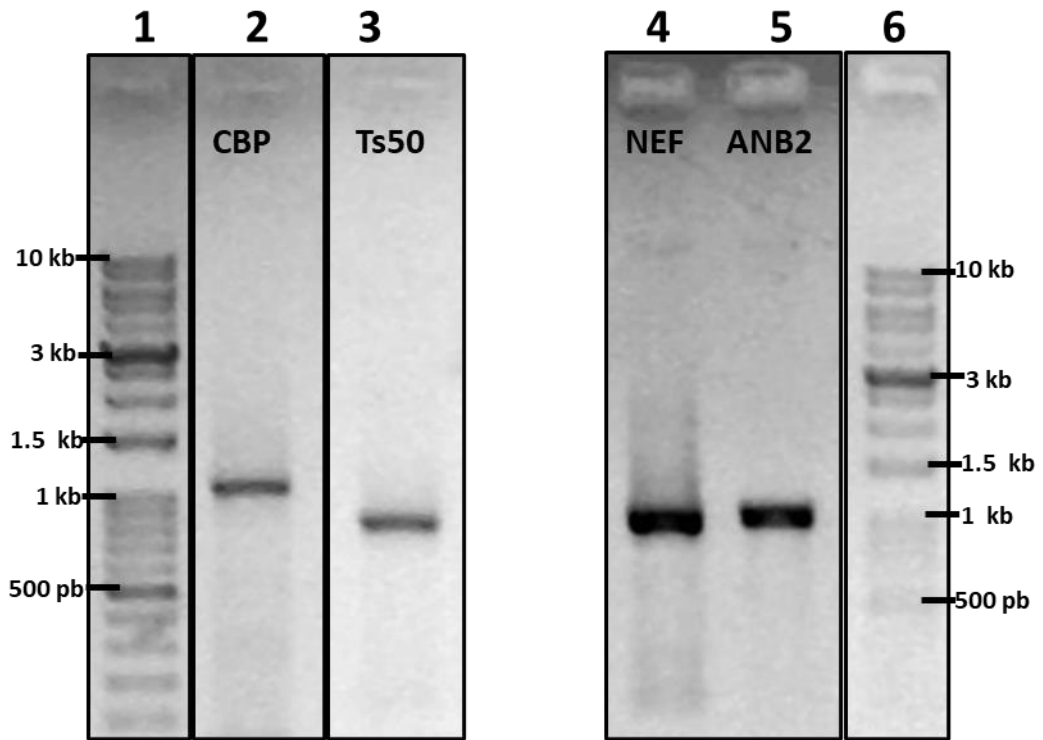
E. granulosus  401 ALMQLVLRCEEIDLQDVKEAYQRKYGKCLVKAIENDTSGDYKRMLLVALVG    450
      :|||||||||||||||||.|||||||||||||||
T. solium     393  SLMQLVLRCEEIDLQDVKEAYQRKYGKSLVKAIENDTSGDYKRMLLVALVG    442

E. granulosus  451 P      451
      |
T. solium     443 P      443

```

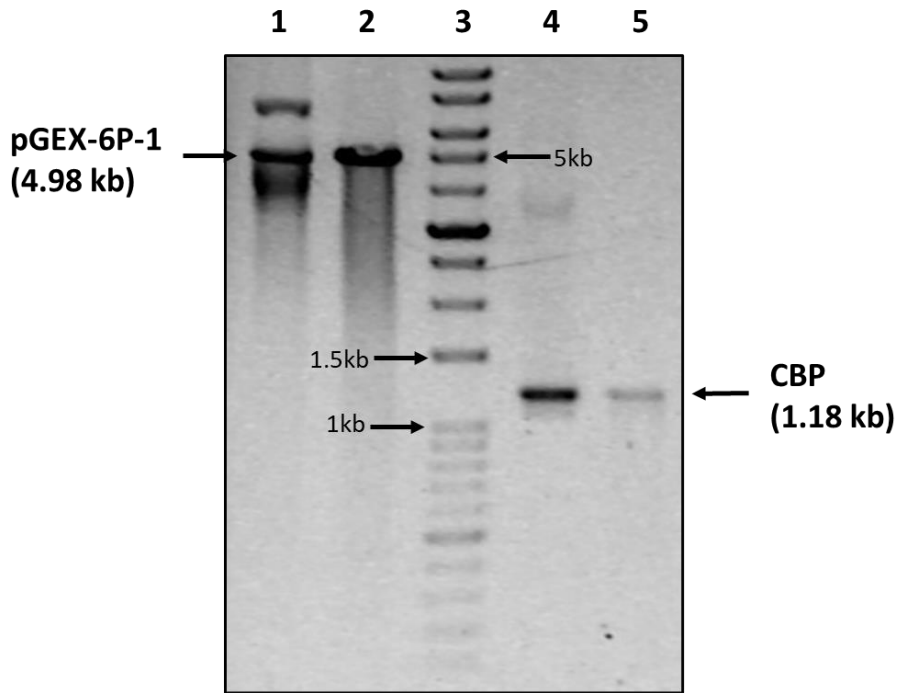
Las regiones de color rojo muestran la secuencia de los péptidos encontrados por LC-MS/MS.

Anexo 16. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los productos de amplificación por RT-PCR usando los cebadores diseñados.



Los productos de amplificación son las secuencias codificantes para la síntesis de las proteínas: precursor de proteína de unión a calcio (pozo 2), proteína G50 (pozo 3), factor de elongación (pozo 4) y anexina B2 (pozo 5). En el pozo 1 y 6 se corrió el marcador de pares de bases (*DNA 1kb Opti-DNA Marker, ABM*).

Anexo 17: Resultado de la digestión del plásmido pGEX-6P-1 y del producto de amplificación para el precursor de la proteína de unión a calcio (CBP) con las enzimas de restricción BamHI y Sall.



Plásmido sin digerir (pozo 1) y digerido (pozo 2); producto de amplificación sin digerir (pozo 4) y digerido (pozo 5); pozo 3= Marcador de pares de bases (*DNA 1kb, Opti-DNA Marker, ABM*).

Anexo 18. Resultados del secuenciamiento de plásmido que contiene la secuencia codificante para la proteína de unión a calcio de postoncosfera de *T. solium*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

pGEX_R	-----	0
AF340232.1	-----ATGGCTGTTCTGCGTTTCTTA	22
pGEX_F	TCGGATCTGGAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCATGGCTGTTCTGCGTTTCTTA	60
pGEX_R	-----	0
AF340232.1	TTGCATGTTATTCGTTGTGAATACGCGTGCCTGAAGTTTACTTCGAGGACAGGTTTATTG	82
pGEX_F	TTGCATTGTTATTCGTTGTGAATACGCGTGCCTGAAGTTTACTTCGAGGACAGGTTTATTG	120
pGEX_R	-----	0
AF340232.1	AGAGCAACATCGATAAGTGGGAAAAGTCCAAATATGACGAAAGCAACTTGGGTCTCTGCG	142
pGEX_F	AGAGCAACATCGATAAGTGGGAAAAGTCCAAATATGACGAAAGCAACTTGGGTCTCTGCG	180
pGEX_R	-----	0
AF340232.1	AATATGCAAAGCCAAAGGGTGATTTTCGATGATAAAGAAGACGGTGGGATGAGAACAACAC	202
pGEX_F	AATATGCAAAGCCAAAGGGTGATTTTCGATGATAAAGAAGACGGTGGGATGAGAACAACAC	240
pGEX_R	-----	0
AF340232.1	AAGATGCCCGGTTTTACCGTTACTCAGCACCATTTAATAAACCCTTGTCAAATAAGGACA	262
pGEX_F	AAGATGCCCGGTTTTACCGTTACTCAGCACCATTTAATAAACCCTTGTCAAATAAGGACA	300
pGEX_R	-----	0
AF340232.1	AAATCATGTGTGTGCAATTACCGTAAAGCACGAGCAAAATATGACTGCGGTGGTGGGT	322
pGEX_F	AAATCATGTGTGTGCAATTACCGTAAAGCACGAGCAAAATATGACTGCGGTGGTGGGT	360
pGEX_R	-----GATGATTTTCATGGCGAAAGTCCTTATG	28
AF340232.1	ACGTGAAATTGCTGGGAGAATCTTTCAAACCAGATGATTTTCATGGCGAAAGTCCTTATG	382
pGEX_F	ACGTGAAATTGCTGGGAGAATCTTTCAAACCAGATGATTTTCATGGCGAAAGTCCTTATG *****	420
pGEX_R	AGATCATGTTTGGTCCCGATATTTGTGGTTATGACAAGAAAATTGTCCACGTTATTTTCT	88
AF340232.1	AGATCATGTTTGGTCCCGATATTTGTGGTTATGACAAGAAAATTGTCCACGTTATTTTCT	442
pGEX_F	AGATCATGTTTGGTCCCGATATTTGTGGTTATGACAAGAAAATTGTCCACGTTATTTTCT *****	480
pGEX_R	CCTATAAGGGCAAAAATTATCTTGTGAAAAGGGATATTCCTGCAAAATCGGACACACTTA	148
AF340232.1	CCTATAAGGGCAAAAATTATCTTGTGAAAAGGGATATTCCTGCAAAATCGGACACACTTA	502
pGEX_F	CCTATAAGGGCAAAAATTATCTTGTGAAAAGGGATATTCCTGCAAAATCGGACACACTTA *****	540
pGEX_R	CCCATTGTACACGCTCATCGTCCGACCTGATAATACATTCGAAGTCTTGATTGATAACA	208
AF340232.1	CCCATTGTACACGCTCATCGTCCGACCTGATAATACATTCGAAGTCTTGATTGATAACA	562
pGEX_F	CCCATTGTACACGCTCATCGTCCGACCTGATAATACATTCGAAGTCTTGATTGATAACA *****	600
pGEX_R	AAACTGCCGAAACCGGCTCGCTCGTTGCCGACTTCGATATGATCCCCCAAGAACAATTG	268
AF340232.1	AAACTGCCGAAACCGGCTCGCTCGTTGCCGACTTCGATATGATCCCCCAAGAACAATTG	622
pGEX_F	AAACTGCCGAAACCGGCTCGCTCGTTGCCGACTTCGATATGATCCCCCAAGAACAATTG *****	660
pGEX_R	ATGATCCCGATGCCAAAAACCAGAAGATTGGGTAGATGAGGCCGAAATCCCCGACCCAG	328
AF340232.1	ATGATCCCGATGCCAAAAACCAGAAGATTGGGTAGATGAGGCCGAAATCCCCGACCCAG	682
pGEX_F	ATGATCCCGATGCCAAAAACCAGAAGATTGGGTAGATGAGGCCGAAATCCCCGACCCAG *****	720
pGEX_R	ACGATAAGAAACCTGATGACTGGGATCAGCCCAAGACTATCGTAGATACGAATGCCAAC	388
AF340232.1	ACGATAAGAAACCTGATGACTGGGATCAGCCCAAGACTATCGTAGATACGAATGCCAAC	742

pGEX_F	ACGATAAGAAACCTGATGACTGGGATCAGCCCAAGACTATCGTAGATACGAATGCCAAAC *****	780
pGEX_R	AACCGGAGGACTGGAACGAAGAAACAGATGGCGAGTGGACGGCCCCCATGATAGATAACC	448
AF340232.1	AACCGGAGGACTGGAACGAAGAAACAGATGGCGAGTGGACGGCCCCCATGATAGATAACC	802
pGEX_F	AACCGGAGGACTGGAACGAAGAAACAGATGGCGAGTGGACGGCCCCCATGATAGATAACC *****	840
pGEX_R	CCGATTACAAGGGTGAATGGCATCCCAAGATGATACCAAACCCCTGCCTACAGGGGAGAGT	508
AF340232.1	CCGATTACAAGGGTGAATGGCATCCCAAGATGATACCAAACCCCTGCCTACAGGGGAGAGT	862
pGEX_F	CCGATTACAAGGGTGAATGGCATCCCAAGATGATACCAAACCCCTGCCTACA----- *****	891
pGEX_R	GGAAACCGCCACAGATTCCCAATCCAGACCACCTTTGAGGACAGTGAACTCTATGCTCGCA	568
AF340232.1	GGAAACCGCCACAGATTCCCAATCCAGACCACCTTTGAGGACAGTGAACTCTATGCTCGCA	922
pGEX_F	-----	891
pGEX_R	CCTTTGCTTACATTGGTCTTGATCTCTGGCAGGTGAAATCTGGGACGATTTTCGACAAC	628
AF340232.1	CCTTTGCTTACATTGGTCTTGATCTCTGGCAGGTGAAATCTGGGACGATTTTCGACAAC	982
pGEX_F	-----	891
pGEX_R	TTATCGTTTCAGACAATGTATCCGAGTGTCAAGCTCACGCCGAGTACTGGCAAAAACGAT	688
AF340232.1	TTATCGTTTCAGACAATGTATCCGAGTGTCAAGCTCACGCCGAGTACTGGCAAAAACGAT	1042
pGEX_F	-----	891
pGEX_R	TTGCATTTGAGGAGGAGGAAGAGAAGAAGAGTTTTGAGGAGAAGGATAAGGAATCTTCCA	748
AF340232.1	TTGCATTTGAGGAGGAGGAAGAGAAGAAGAGTTTTGAGGAGAAGGATAAGGAATCTTCCA	1102
pGEX_F	-----	891
pGEX_R	CCACCGATAATGTACCAGACGAGAGTGAAGGACGAGGAAGTGGATCTCGAGGAAGGAGGTG	808
AF340232.1	CCACCGATAATGTACCAGACGAGAGTGAAGGACGAGGAAGTGGATCTCGAGGAAGGAGGTG	1162
pGEX_F	-----	891
pGEX_R	ATGCTTCCTCGAAGGATGAATTGTAGGTCGACTCGAGCGCCGCATCGTGACTGACTGAC	868
AF340232.1	ATGCTTCCTCGAAGGATGAATTGTAGGTCGACTCGAGCGCCGCATCGTGACTGACTGAC	1188
pGEX_F	-----	891
pGEX_R	GATCTGCCTCGCG	881
AF340232.1	-----	1188
pGEX_F	-----	891

Alineamiento de la secuencia de nucleótidos que codifica para el precursor de la proteína de unión a calcio (GENBANK: AF340232.1) con las secuencias obtenidas del secuenciamiento del plásmido pgex-6p-1 + inserto CBP (MACROGEN, USA). pGEX_F= cebador forward para el plásmido, pGEX_R= cebador reverse para el plásmido

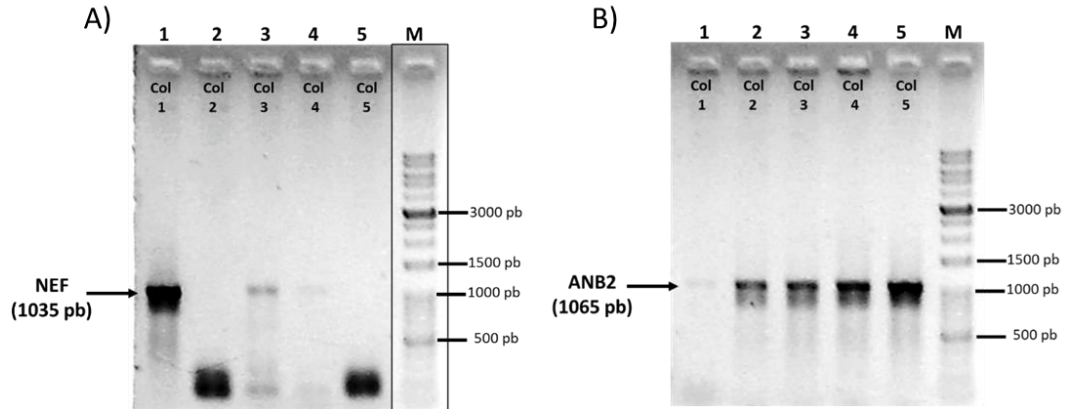

```

1 ATGGCTG TTC CTGCGTTTCT TATTGCATTG TTATTCGTTG
41 TGAATACGCG TGCTGAAGTT TACTTCGAGG ACAGGTTTAT
81 TGAGAGCAAC ATCGATAAGT GGGAAAAGTC CAAATATGAC
121 GAAAGCAACT TGGGTCTCTG CGAATATGCA AAGCCAAAGG
161 GTGATTTT CGA TGATAAAGAA GACGGTGGGA TGAGAACAAC
201 ACAAGATGCC CGGTTTTACC GTTACTCAGC ACCATTTAAT
241 AAACCCTTGT CAAATAAGGA CAAAATCATG TGTGTGCAAT
281 TCACGGTAAA GCACGAGCAA AATATTGACT GCGGTGGTGG
321 GTACGTGAAA TTGCTGGGAG AATCTTTCAA ACCAGATGAT
361 TTTCATGGCG AAAGTCCTTA TGAGATCATG TTTGGTCCCCG
401 ATATTTGTGG TTATGACAAG AAAATTGTCC ACGTTATTTT
441 CTCCTATAAG GGCAAAAATT ATCTTGTGAA AAGGGATATT
481 CCCTGCAAAAT CGGACACACT TACCCATTTG TACACGCTCA
521 TCGTCCGACC TGATAATACA TTCGAAGTCT TGATTGATAA
561 CAAAAC TGCC GAAACCGGCT CGCTCGTTGC CGACTTCGAT
601 ATGATCCCCC CAAGAACAAT TGATGATCCC GATGCCAAAA
641 AACCAGAAGA TTGGGTAGAT GAGGCCGAAA TCCCCGACCC
681 AGACGATAAG AAACCTGATG ACTGGGATCA GCCCAAGACT
721 ATCGTAGATA CGAATGCCAA ACAACCGGAG GACTGGAACG
761 AAGAAACAGA TGGCGAGTGG ACGGCCCCCA TGATAGATAA
801 CCCCATTAC AAGGGTGAAT GGCATCCCAA GATGATACCA
841 AACCTGCCT ACAGGGGAGA GTGGAAACCG CCACAGATTC
881 CCAATCCAGA CCACTTTGAG GACAGTGAAC TCTATGCTCG
921 CACCTTTGCT TACATTGGTC TTGATCTCTG GCAGGTGAAA
961 TCTGGGACGA TTTTCGACAA CTTTATCGTT TCAGACAATG
1001 TATCCGAGTG TCAAGCTCAC GCCGAGTACT GGCAAAAACG
1041 ATTTGCATTT GAGGAGGAGG AAGAGAAGAA GAGTTTTGAG
1081 GAGAAGGATA AGGAATCTTC CACCACCGAT AATGTACCAG
1121 ACGAGAGTGA GGACGAGGAA GTGGATCTCG AGGAAGGAGG
1161 TGATGCTTCC TCGAAGGATG AATTGTAG

```

Secuencia de nucleótidos que codifica para el precursor de la proteína de unión a calcio de postoncosferas de *T. solium*, obtenido por secuenciamiento.

Anexo 19. PCR-colonia de colonias de células DH5 α transformadas con el plásmido pGEX-6P-1 + secuencia para el factor de elongación nuclear alfa1 (NEF) (A); o secuencia para anexina B2 (ANB2) (B).



Pozo 1 al 5: colonias transformadas con el plásmido pGEX-6P-1 + Inserto. M: marcador de DNA 1kb (Opti-DNA Marker, ABM).

Anexo 20. Resultados del secuenciamiento de plásmido que contiene la secuencia codificante para la proteína factor de elongación nuclear alfa 1 de postoncosfera de *T. solium*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

pGEX_R ----- 0
AB505027.1 -----ATGGGCAAATCCTCTTTCAAGTA 23
pGEX_F CGGATCTGGAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCATGGGCAAATCCTCTTTCAAGTA 60

pGEX_R ----- 0
AB505027.1 CGCTTGGGTTCTTGATAAGCTCAAGGCTGAGCGTGAGCGTGGTATCACTATTGATATCGC 83
pGEX_F CGCTTGGGTTCTTGATAAGCTCAAGGCTGAGCGTGAGCGTGGTATCACTATTGATATCGC 120

pGEX_R ----- 0
AB505027.1 GCTTTGGAAATTTGAGACTCCTAAGTATCTCGTCACGATCATTGATGCGCCTGGCCACCG 143
pGEX_F GCTTTGGAAATTTGAGACTCCTAAGTATCTCGTCACGATCATTGATGCGCCTGGCCACCG 180

pGEX_R -----CACCAGCCAGGCGGACTGTGCTATTCTAGTTGT 33
AB505027.1 TGATTTTATCAAGAATATGATTACAGGCACCAGCCAGGCGGACTGTGCTATTCTAGTTGT 203
pGEX_F TGATTTTATCAAGAATATGATTACAGGCACCAGCCAGGCGGACTGTGCTATTCTAGTTGT 240
*****

pGEX_R TGCTGCTGGTACTGGTGAGTTCGAGGCAGGCATTAGCAAGAACGGTCAGACCCGCGAGCA 93
AB505027.1 TGCTGCTGGTACTGGTGAGTTCGAGGCAGGCATTAGCAAGAACGGTCAGACCCGCGAGCA 263
pGEX_F TGCTGCTGGTACTGGTGAGTTCGAGGCAGGCATTAGCAAGAACGGTCAGACCCGCGAGCA 300
*****

pGEX_R CGCCCTCCTCGCTTTTACTTTGGGTGTGAAGAAGCTTATTATCGCGGTCAACAAGATGGA 153
AB505027.1 CGCCCTCCTCGCTTTTACTTTGGGTGTGAAGAAGCTTATTATCGCGGTCAACAAGATGGA 323
pGEX_F CGCCCTCCTCGCTTTTACTTTGGGTGTGAAGAAGCTTATTATCGCGGTCAACAAGATGGA 360
*****

```

```

pGEX_R      TGCGGTTGATTATAGCGAAAAACGCTTTCAGGAGATTAGTTCTGAAATGAAGGCGTACAT 213
AB505027.1  TGCGGTTGATTATAGCGAAAAACGCTTTCAGGAGATTAGTTCTGAAATGAAGGCGTACAT 383
pGEX_F      TGCGGTTGATTATAGCGAAAAACGCTTTCAGGAGATTAGTTCTGAAATGAAGGCGTACAT 420
*****

pGEX_R      TAAGAAGGTTGGCTATAACCCAGATACCGTAAATATCGTCCCAATCTCTGGTTGGGTCGG 273
AB505027.1  TAAGAAGGTTGGCTATAACCCAGATACCGTAAATATCGTCCCAATCTCTGGTTGGGTCGG 443
pGEX_F      TAAGAAGGTTGGCTATAACCCAGATACCGTAAATATCGTCCCAATCTCTGGTTGGGTCGG 480
*****

pGEX_R      TGATAATATGCTGGAGCCAGTCTTAACATGCCATGGTATAAGGGACCTACTCTTCTCGC 333
AB505027.1  TGATAATATGCTGGAGCCAGTCTTAACATGCCATGGTATAAGGGACCTACTCTTCTCGC 503
pGEX_F      TGATAATATGCTGGAGCCAGTCTTAACATGCCATGGTATAAGGGACCTACTCTTCTCGC 540
*****

pGEX_R      CAGTATCGATCTTGTTCGAGCCTCCGACTCGTCTGTGGACAAGCCACTTCGACTCCCTCT 393
AB505027.1  CAGTATCGATCTTGTTCGAGCCTCCGACTCGTCTGTGGACAAGCCACTTCGACTCCCTCT 563
pGEX_F      CAGTATCGATCTTGTTCGAGCCTCCGACTCGTCTGTGGACAAGCCACTTCGACTCCCTCT 600
*****

pGEX_R      CCAGGACGTGTTTAAAATTAGCGGCATTGGCACTGTCCCGGTTGGCCGTGTGAGACCGG 453
AB505027.1  CCAGGACGTGTTTAAAATTAGCGGCATTGGCACTGTCCCGGTTGGCCGTGTGAGACCGG 623
pGEX_F      CCAGGACGTGTTTAAAATTAGCGGCATTGGCACTGTCCCGGTTGGCCGTGTGAGACCGG 660
*****

pGEX_R      TATAATGAAGCCGGGTATGATCGTCACCTTTGCTCCGGTTGGCATCTCAACTGAGGTGAA 513
AB505027.1  TATAATGAAGCCGGGTATGATCGTCACCTTTGCTCCGGTTGGCATCTCAACTGAGGTGAA 683
pGEX_F      TATAATGAAGCCGGGTATGATCGTCACCTTTGCTCCGGTTGGCATCTCAACTGAGGTGAA 720
*****

pGEX_R      GTCTATCGAAATGCATCATGAAGCTCTGGCCGAGGCTGTCCCGGAGATAACGTTGGTTT 573
AB505027.1  GTCTATCGAAATGCATCATGAAGCTCTGGCCGAGGCTGTCCCGGAGATAACGTTGGTTT 743
pGEX_F      GTCTATCGAAATGCATCATGAAGCTCTGGCCGAGGCTGTCCCGGAGATAACGTTGGTTT 780
*****

pGEX_R      CAACGTAAAGAACATTTCTGTGAAGGACGTGCGCCGTGGTAATGTTGCAGGGGACTCAA 633
AB505027.1  CAACGTAAAGAACATTTCTGTGAAGGACGTGCGCCGTGGTAATGTTGCAGGGGACTCAA 803
pGEX_F      CAACGTAAAGAACATTTCTGTGAAGGACGTGCGCCGTGGTAATGTTGCAGGGGACTCAA 840
*****

pGEX_R      GAATCATCCTCCTCGCGAGGCCGGGAATTCACCGCCAGGTTATCGTCTTAACCACCC 693
AB505027.1  GAATCATCCTCCTCGCGAGGCCGGGAATTCACCGCCAGGTTATCGTCTTAACCACCC 863
pGEX_F      GAATCATCCTCCTCGCGAGGCCGGGAATTCACCGCCAGGTTATCGTCTTAACCACCC 900
*****

pGEX_R      CGGTGAGATTGGTGTGGCTACACTCCCGTTCTGGACTGCCACACAGCCACATTGCTTG 753
AB505027.1  CGGTGAGATTGGTGTGGCTACACTCCCGTTCTGGACTGCCACACAGCCACATTGCTTG 923
pGEX_F      CGGTGAGAT----- 909
*****

pGEX_R      CAAGTTCGCCGAGCTGAAGGAAAAAATCGACCGCCGAACCGGTCAAGTCAAGGAGACTAA 813
AB505027.1  CAAGTTCGCCGAGCTGAAGGAAAAAATCGACCGCCGAACCGGTCAAGTCAAGGAGACTAA 983
pGEX_F      ----- 909

pGEX_R      CCCCCTAAGATCAAATCCGGTGATGCGGCCATCGTCAGGATGGTCCCCAGCGTCGACTC 873
AB505027.1  CCCCCTAAGATCAAATCCGGTGATGCGGCCATCGTCAGGATGGTCCCCAGCGTCGACTC 1035
pGEX_F      ----- 909

pGEX_R      GAGCGGCCGATCGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGC 913
AB505027.1  ----- 1035
pGEX_F      ----- 909

```

Alineamiento de la secuencia de nucleótidos que codifica para el factor de elongación nuclear alfa (GENBANK: AB505027.1) con las secuencias obtenidas del secuenciamiento del plásmido PGEX-6P-1 + inserto NEF (MACROGEN, USA). pGEX_F= cebador forward para el plásmido, pGEX_R= cebador reverse para el plásmido.

```

1 ATGGGCAAAT CCTCTTTCAA GTACGCTTGG GTTCTTGATA
41 AGCTCAAGGC TGAGCGTGAG CGTGGTATCA CTATTGATAT
81 CGCGCTTTGG AAATTTGAGA CTCCTAAGTA TCTCGTCACG
121 ATCATTGATG CGCCTGGCCA CCGTGATTTT ATCAAGAATA
161 TGATTACAGG CACCAGCCAG GCGGACTGTG CTATTCTAGT
201 TGTTGCTGCT GGTACTGGTG AGTTCGAGGC AGGCATTAGC
241 AAGAACGGTC AGACCCGCGA GCACGCCCTC CTCGCTTTTA
281 CTTGGGTGT GAAGAAGCTT ATTATCGCGG TCAACAAGAT
321 GGATGCGGTT GATTATAGCG AAAAACGCTT TCAGGAGATT
361 AGTTCTGAAA TGAAGGCGTA CATTAGAAG GTTGGCTATA
401 ACCCAGATAC CGTAAATATC GTCCCAATCT CTGGTTGGGT
441 CGGTGATAAT ATGCTGGAGC CCAGTCCTAA CATGCCATGG
481 TATAAGGGAC CTACTCTTCT CGCCAGTATC GATCTTGTCTG
521 AGCCTCCGAC TCGTCCTGTG GACAAGCCAC TTCGACTCCC
561 TCTCCAGGAC GTGTTTAAAA TTAGCGGCAT TGGCACTGTC
601 CCCGTTGGCC GTGTTGAGAC CGGTATAATG AAGCCGGGTA
641 TGATCGTCAC CTTTGCTCCG GTTGGCATCT CAACTGAGGT
681 GAAGTCTATC GAAATGCATC ATGAAGCTCT GGCCGAGGCT
721 GTTCCCGGAG ATAACGTTGG TTTCAACGTA AAGAACATTT
761 CTGTGAAGGA CGTGCGCCGT GGTAATGTTG CAGGGGACTC
801 AAAGAATCAT CCTCCTCGCG AGGCCGGGGA ATTCACCGCC
841 CAGGTTATCG TCCTTAACCA CCCCAGTGAG ATTGGTGCTG
881 GCTACACTCC CGTTCTGGAC TGCCACACAG CCCACATTGC
921 TTGCAAGTTC GCCGAGCTGA AGGAAAAAAT CGACCGCCGA
961 ACCGGTCAAG TCAAGGAGAC TAACCCCGCT AAGATCAAAT
1001 CCGGTGATGC GGCCATCGTC AGGATGGTCC CCAGC

```

Secuencia de nucleótidos que codifica para el factor de elongación nuclear alfa 1 de postoncosferas de *T. solium*, obtenido por secuenciamiento.

Anexo 21. Resultados del secuenciamiento de plásmido que contiene la secuencia codificante para la proteína anexina B2 de postoncosfera de *T. solium*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

pGEX_R          ----- 0
AY998562.1     -----ATGGCAAAAAATACTCGCTCACCTCTC 28
pGEX_F          CTGGAGTNTGTTCAGGGGCCCTGGGANNCATGGCAAAAAATACTCGCTCACCTCTC 60

pGEX_R          ----- 0
AY998562.1     AGTATTTGCGACTGCAATGGAAAACCTTTCAGACCCACACTGAAGCCCAATCCCAACTTTG 88
pGEX_F          AGTATTTGCGACTGCAATGGAAAACCTTTCAGACCCACACTGAAGCCCAATCCCAACTTTG 120

pGEX_R          ----- 0
AY998562.1     ATGTGAATGCTGACGTGGAGGCGCTCTGC AAAATCCATGCGTTGTTGGGGCACC GATGAGG 148
pGEX_F          ATGTGAATGCTGACGTGGAGGCGCTCTGC AAAATCTATGCGTTGTTGGGGCACC GATGAGG 180

pGEX_R          ----- 0
AY998562.1     AAACAATCACCAAAATCTTGGGAAAGAGGACAAGTGAAGAGCGTCTCCAGATTGTAAGCC 208
pGEX_F          AAACAATCACCAAAATCTTGGGAAAGAGGACAAGTGAAGAGCGTCTCCAGATTGTAAGCC 240

pGEX_R          -----TACGGTCGTGAACTTGCACACGATCTGGACGGTGATCTGAAAGGTC 46
AY998562.1     TGTACAAGCAAAAGTACGGTCGTGAACTTGCACACGATCTGGACGGTGATCTGAAAGGTC 268
pGEX_F          TGTACAAGCAAAAGTACGGTCGTGAACTTGCACACGATCTGGACGGTGATCTGAAAGGTC 300
                    *****

pGEX_R          ACTTTAGAGATTGCACCATCCTACTAACCAGGACCCCATCTATCTGATGGCAAAATCGC 106
AY998562.1     ACTTTAGAGATTGCACCATCCTACTAACCAGGACCCCATCTATCTGATGGCAAAATCGC 328
pGEX_F          ACTTTAGAGATTGCACCATCCTACTAACCAGGACCCCATCTATCTGATGGCAAAATCGC 360
                    *****

pGEX_R          TCTACTACGCAATGAAGGGTGTGGCAGCAATGAGAATACCATCATTTGAAATCATTGTAG 166
AY998562.1     TCTACTACGCAATGAAGGGTGTGGCAGCAATGAGAATACCATCATTTGAAATCATTGTAG 388
pGEX_F          TCTACTACGCAATGAAGGGTGTGGCAGCAATGAGAATACCATCATTTGAAATCATTGTAG 420
                    *****

pGEX_R          GCTGCACAAATGAGGAAATTAACAAGCTTAAACAATTTACATATACGTTCTGCGTGACA 226
AY998562.1     GCTGCACAAATGAGGAAATTAACAAGCTTAAACAATTTACATATACGTTCTGCGTGACA 448
pGEX_F          GCTGCACAAATGAGGAAATTAACAAGCTTAAACAATTTACATATACGTTCTGCGTGACA 480
                    *****

pGEX_R          AGGGGATTAAGATCCAAAACGCACCCCTGGAGACTGACATCCGCACAGAGACAACGGGCT 286
AY998562.1     AGGGGATTAAGATCCAAAACGCACCCCTGGAGACTGACATCCGCACAGAGACAACGGGCT 508
pGEX_F          AGGGGATTAAGATCCAAAACGCACCCCTGGAGACTGACATCCGCACAGAGACAACGGGCT 540
                    *****

pGEX_R          ACTTCTGCAAAATGCTGTTGCAGCTTCTAAAGGGTGACATTC CCGATCCAACGCCAGAGC 346
AY998562.1     ACTTCTGCAAAATGCTGTTGCAGCTTCTAAAGGGTGACATTC CCGATCCAACGCCAGAGC 568
pGEX_F          ACTTCTGCAAAATGCTGTTGCAGCTTCTAAAGGGTGACATTC CCGATCCAACGCCAGAGC 600
                    *****

pGEX_R          AGCTTCGCACCATTTCAGCAAAAAGGCGGCGACCTAATGGTCAATCAGAAAAGAGGTTACAG 406
AY998562.1     AGCTTCGCACCATTTCAGCAAAAAGGCGGCGACCTAATGGTCAATCAGAAAAGAGGTTACAG 628
pGEX_F          AGCTTCGCACCATTTCAGCAAAAAGGCGGCGACCTAATGGTCAATCAGAAAAGAGGTTACAG 660
                    *****

pGEX_R          CTGCCGTCAAACAAATTTGTGGAGGCGCTAGCAAAACCGAAGAATTC AACAAATTTCTGTCC 466
AY998562.1     CTGCCGTCAAACAAATTTGTGGAGGCGCTAGCAAAACCGAAGAATTC AACAAATTTCTGTCC 688
pGEX_F          CTGCCGTCAAACAAATTTGTGGAGGCGCTAGCAAAACCGAAGAATTC AACAAATTTCTGTCC 720
                    *****

pGEX_R          TTCTGAACGCATTCCAGCACAAAATGTTTGGGAAATAGCAGCTATGGATAAAGAGTACA 526
AY998562.1     TTCTGAACGCATTCCAGCACAAAATGTTTGGGAAATAGCAGCTATGGATAAAGAGTACA 748

```

```

pGEX_F      TTCTGAACGCATTCCAGCACAAAAATGTTTGGGAAATAGCAGCTATGGATAAAGAGTACA 780
*****

pGEX_R      AAAAGGCAAGTGGAAAGGGCCTTATTTTCAGCCATATCAGAGGCTGTAGAGGGAGAATTCG 586
AY998562.1  AAAAGGCAAGTGGAAAGGGCCTTATTTTCAGCCATATCAGAGGCTGTAGAGGGAGAATTCG 808
pGEX_F      AAAAGGCAAGTGGAAAGGGCCTTATTTTCAGCCATATCAGAGGCTGTAGAGGGAGAATTCG 840
*****

pGEX_R      GCACATTGCTCATGGCCATGGTTCAACACGCCGTAGACAGACCGAAGTTCTATTCTGAGG 646
AY998562.1  GCACATTGCTCATGGCCATGGTTCAACACGCCGTAGACAGACCGAAGTTCTATTCTGAGG 868
pGEX_F      GCACATTGCTCATGGCCATGGTTCAACACGCCGTANACAGACCGAAGTTCTATTCTGAGG 900
*****

pGEX_R      CTCTCTACCAATCCATGGTGGGTCAAGGAACACGCGACTTCCTCCTCATGCGAGTCTCTCA 706
AY998562.1  CTCTCTACCAATCCATGGTGGGTCAAGGAACACGCGACTTCCTCCTCATGCGAGTCTCTCA 928
pGEX_F      CTCTCTAC----- 908
*****

pGEX_R      TTCTGCGCTCTGAGATTGATTTGCTGGACATCAAGGAGACGTTTCGATAAGGACCACAAGA 766
AY998562.1  TTCTGCGCTCTGAGATTGATTTGCTGGACATCAAGGAGACGTTTCGATAAGGACCACAAGA 988
pGEX_F      ----- 908

pGEX_R      GTTTGGCCGAATGGATAAAGGGTGAACCTCGGGCTACTATGAACAACACTACTGCTCGCAC 826
AY998562.1  GTTTGGCCGAATGGATAAAGGGTGAACCTCGGGCTACTATGAACAACACTACTGCTCGCAC 1048
pGEX_F      ----- 908

pGEX_R      TACTGAATGAATCCTAAGTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGACGATCTGCCT 886
AY998562.1  TACTGAATGAATCCTAA----- 1065
pGEX_F      ----- 908

pGEX_R      CGCGCGTT      894
AY998562.1  -----      1065
pGEX_F      -----      908

```

Alineamiento de la secuencia de nucleótidos que codifica para anexina B2 (GENBANK: AY998562.1) con las secuencias obtenidas del secuenciamiento del plásmido PGEX-6P-1 + inserto ANB2 (MACROGEN, USA). pGEX_F= cebador forward para el plásmido, pGEX_R= cebador reverse para el plásmido.

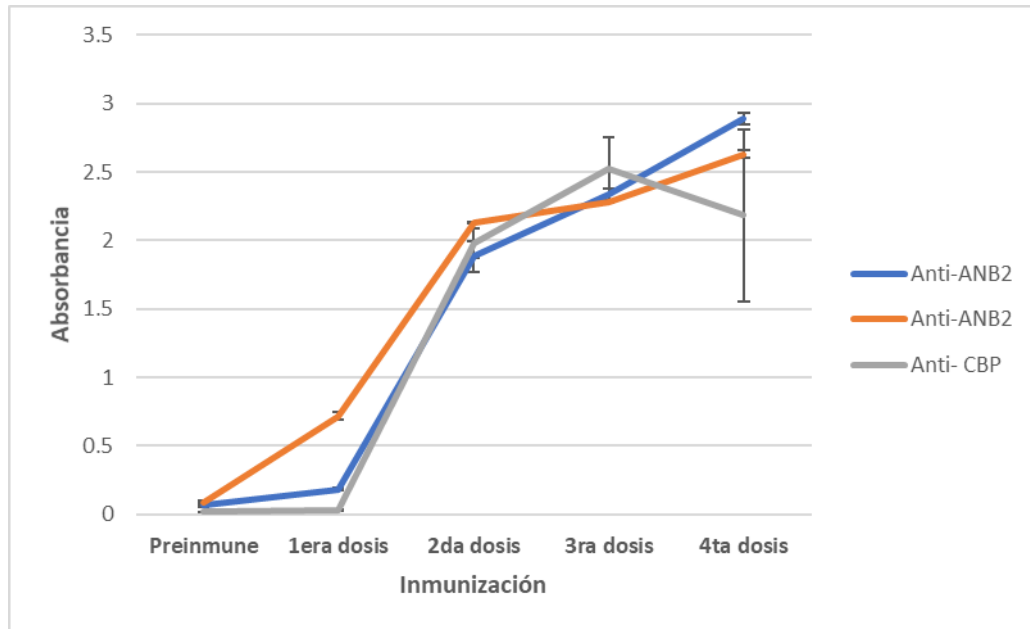
```

1 ATGGCAAAAA ATACTCGCTC ACCCTCTCAG TATTTGACT
41 GCAATGGAAA ACCTTTCAGA CCCACACTGA AGCCCAATCC
81 CAACTTTGAT GTGAATGCTG ACGTGGAGGC GCTCTGCAAA
121 TCTATGCGTT GTTGGGGCAC CGATGAGGAA ACAATCACCA
161 AAATCTTGGG AAAGAGGACA AGTGAAGAGC GTCTCCAGAT
201 TGTAAGCCTG TACAAGCAAA AGTACGGTCG TGAACCTTGCA
241 CACGATCTGG ACGGTGATCT GAAAGGTCAC TTTAGAGATT
281 GCACCATCCT ACTAACCGAG GACCCCATCT ATCTGATGGC
321 AAAATCGCTC TACTACGCAA TGAAGGGTGT TGGCACGAAT
361 GAGAATACCA TCATTGAAAT CATTGTAGGC TGCACAAATG
401 AGGAAATTAA CAAGCTTAAA CAATTCTACA TATACGTTCT
441 GCGTGACAAG GGGATTAAAG ATCCAAAACG CACCTGGAG
481 ACTGACATCC GCACAGAGAC AACGGGCTAC TTCTGCAAAA
521 TGCTGTTGCA GCTTCTAAAAG GGTGACATTC CCGATCCAAC
561 GCCAGAGCAG CTTCGCACCA TTCAGCAAAA AGGCGGCGAC
601 CTAATGGTCA ATCAGAAAAGA GGTACAGCT GCCGTCAAAC
641 AAATTGTGGA GCGCTAGCA AAACCGAAGA ATTCAACAAA
681 TTCTGTCCCT CTGAACGCAT TCCAGCACA AAATGTTTGG
721 GAAATAGCAG CTATGGATAA AGAGTACAAA AAGGCAAGTG
761 GAAAGGGCCT TATTTAGGCC ATATCAGAGG CTGTAGAGGG
801 AGAATTCGGC ACATTGCTCA TGGCCATGGT TCAACACGCC
841 GTAGACAGAC CGAAGTTCTA TTCTGAGGCT CTCTACCAAT
881 CCATGGTGGG TCAAGGAACA CGCGACTTCC TCCTCATGCG
921 AGTCCTCATT CTGCGCTCTG AGATTGATTT GCTGGACATC
961 AAGGAGACGT TCGATAAGGA CCACAAGAGT TTGGCCGAAT
1001 GGATAAAGGG TGAAACCTCG GGCTACTATG AACAACTACT
1041 GCTCGACTA CTGAATGAAT CCTAA

```

Secuencia de nucleótidos que codifica para anexina B de postoncosferas de *T. solium*, obtenido por secuenciamiento. La secuencia fue obtenida a partir del secuenciamiento del plásmido pGEX-6P-1+inserto.

Anexo 22. ELISA de los sueros de conejos inmunizados con proteínas recombinantes de postoncosferas de *T. solium*



Anti-ANB2= suero de conejos inmunizados con proteína recombinante anexina B2 de postoncosferas de *T. solium* (rTsPO_ANB2).

Anti-CBP= suero de conejos inmunizados con proteína recombinantes precursor de proteína de unión a calcio de postoncosferas de *T. solium* (rTsPO_CBP).