



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**EVALUACIÓN DE TRES DIFERENTES MÉTODOS DE PURIFICACIÓN  
DE PROTEÍNA (21-31 KDA) DEL ESTADO LARVAL DE *Echinococcus*  
*granulosus***

**Tesis para optar al Título de Licenciada en Biología**

**Autor:**

**Cornelio Parra, Dayanne Viviana**

**Asesor:**

**Asesor Interno: Mg. Santa Cruz Carpio, Carlos  
Marco Asesor Externo: M.Sc. Cáceres Rey, Omar**

**Jurados:**

**Mg. Lezama Vigo, Helmer Heli  
Mg. Salas Asencios, Ramsés  
Mg. Bohórquez Meza, Isabel**

Lima - Perú

2018

## DEDICATORIA

A mis amadas abuelitas Esther y Juana por todo su amor y cariño,

Sé que donde estén, están orgullosas de mí

A mis padres Marisol y Julio por su guía y apoyo incondicional

A mis hermanos Leonardo y Sebastian por ser pieza fundamental en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al PROGRAMA NACIONAL DE INNOVACIÓN PARA LA COMPETITIVIDAD Y PRODUCTIVIDAD (Innovate Perú) por el financiamiento otorgado al proyecto presentado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, titulado: **“Proteómica de *Echinococcus granulosus*: Hacia la búsqueda e identificación de proteínas específicas para el diagnóstico de equinococosis quística en humanos”**, código **01-042-15**.

También agradezco al Instituto Nacional de Salud (INS) que me brindó las instalaciones del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria totalmente equipado para cumplir con los objetivos de esta tesis de investigación.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Elizabeth Sánchez Romani investigadora principal de este proyecto y responsable del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria del Instituto Nacional de Salud por aceptarme para realizar esta tesis en el marco del proyecto financiado por INNÓVATE-PERÚ. Debo agradecer también su orientación y tiempo dedicado durante mi estancia en la cual me brindo todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos de la tesis.

Quiero extender mi agradecimiento al Blgo. Omar Cáceres Rey, responsable del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del INS, principal co-investigador de este proyecto y mi asesor externo, por su paciencia, orientación y disponibilidad de compartir sus experiencias y amplio conocimiento con el tema relacionado a esta tesis. Le agradezco por sus comentarios y observaciones realizadas para mejorar los resultados obtenidos. Muchas gracias profesor.

A mi Asesor Interno el Mg. Carlos Santa Cruz Del Carpio por su amabilidad y tiempo para la revisión de esta tesis.

Agradezco también al equipo del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria del INS los biólogos Nury Vargas, William Quispe y Jhon Mayo por brindarme las facilidades en el ambiente de trabajo y brindarme consejos para la aplicación de las técnicas.

Por supuesto agradecer profundamente a mi familia por brindarme todo el apoyo para seguir adelante y la confianza que depositaron en mi desde el principio de esta hermosa carrera. A mis padres Marisol Parra y Julio Cornelio quienes son motor y motivo de mi familia de ellos aprendí a seguir persistiendo con mucha honestidad y humildad. A mis hermanos Leonardo y Sebastian para quienes soy su ejemplo a seguir, gracias por todo su apoyo y comprensión. A mi novio John por su apoyo incondicional.

## ABREVIATURAS

<b>EQ</b>	Equinococosis Quística
<b>AgB</b>	Antígeno B
<b>Ag5</b>	Antígeno 5
<b>ATLH</b>	Antígeno total de líquido hidatídico
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>EgAg</b>	Antígeno de <i>Echinococcus granulosus</i>
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>μl</b>	Microlitro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>μg</b>	Microgramo
<b>mg</b>	Miligramo
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>mA</b>	Miliamperio
<b>V</b>	Voltio
<b>LH</b>	Líquido hidatídico
<b>LHL</b>	Líquido hidatídico liofilizado
<b>Pp-D</b>	Precipitado dializado
<b>S-D</b>	Sobrenadante dializado

<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PBS-T</b>	Buffer fosfato salino Tween

# ÍNDICE

	pág
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. OBJETIVOS.....	7
4.1. OBJETIVOS GENERALES.....	7
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
5. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	8
6. HIPOTESIS.....	9
7. MARCO TEÓRICO.....	10
7.1. ANTECEDENTES.....	10
7.2. GENERALIDADES.....	13
7.2.1 El parásito.....	13
7.2.1.1 Taxonomía.....	14
7.2.1.2 Formas o Estados.....	14
7.2.1.2.1 Huevo.....	14
7.2.1.2.2 Oncósfera o Embrión.....	15
7.2.1.2.3 Quiste.....	16
7.2.1.2.4 Protoescólices.....	17
7.2.1.2.5 Adulto.....	18
7.2.2 Ciclo de Vida.....	19
7.2.3 Epidemiología.....	21
7.2.4 Control de la enfermedad.....	26
7.2.5 Manifestaciones clínicas y tratamiento.....	26

7.2.5.1 Tratamiento .....	27
7.2.5.2 Vacunas.....	28
7.3 Aspectos bioquímicos del parásito <i>Echinococcus granulosus</i> .....	29
7.3.1 Antígeno de Líquido de quiste hidatídico .....	29
7.3.1.1 Antígeno B (AgB).....	30
7.3.1.2 Antígeno 5 (Ag5).....	31
8. Técnicas de purificación de proteínas.....	32
8.1 Precipitación por sales.....	32
8.2 Diálisis.....	32
8.3 Cromatografía de gel de exclusión.....	33
8.4 Electroforesis SDS-PAGE.....	34
8.5 Electroelución.....	35
9. Cuantificación de proteínas.....	36
9.1 Método de Bradford .....	36
9.2 Método de Biuret .....	36
9.3 Método de Lowry .....	37
10. Materiales y métodos.....	38
10.1 Tipo de Investigación .....	38
10.2 Población de estudio .....	38
10.2.1 Líquido hidatídico liofilizado (LHL) .....	38
10.2.2 Sueros de la seroteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria .....	38
10.3 Muestra de estudio.....	39
10.3.1 Líquido hidatídico (LH).....	39
10.3.2 Sueros para la evaluación.....	39
10.3.2.1 Sueros positivos a Hidatidosis confirmados por intervención	



quirúrgica 39

10.3.2.2	Suero control positivo .....	40
10.3.2.3	Suero control negativo .....	40
10.3.2.4	Sueros de pacientes previamente diagnosticados positivos para hidatidosis .....	40
10.3.2.5	Sueros positivos a otras zoonosis .....	40
10.4	Materiales.....	41
10.4.1	Equipos e instrumentos.....	41
10.4.2	Materiales y reactivos.....	41
10.5	Métodos.....	44
10.5.1	Re suspensión de antígeno liofilizado de <i>Echinococcus granulosus</i> con Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0.....	44
10.5.2	Protocolo 1: Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación, ultrafiltración y electroelución de estas proteínas .....	44
10.5.2.1	Precipitación con Sulfato de Amonio y Diálisis.....	44
10.5.2.2	Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas dializadas .....	45
10.5.2.3	Concentración de proteínas por ultrafiltración .....	45
10.5.2.4	Electroelución de las proteínas 21-31 kDa .....	46
10.5.2.5	Concentración al vacío de las proteínas electroeluidas .....	46
10.5.2.6	Tinción con Plata .....	47
10.5.3	Protocolo 2: Purificación por separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE y electro elución de la proteína .....	48
10.5.4	Protocolo 3: Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de	

amónio al 60% de saturación y electroeluidas a partir del gel .....	48
10.5.4.1 Precipitación con Sulfato de Amonio y Diálisis.....	48
10.5.4.2 Electroelusión de las proteínas 21- 31 kDa.....	49
10.5.4.3 Concentración al vacío de las proteínas electroeluidas .....	49
10.5.5 INMUNOBLOT .....	50
10.5.5.1 Preparación de la transferencia.....	51
10.5.5.2 Electrotransferencia.....	51
10.5.5.3 Reacción inmunoenzimática.....	52
10.5.5.4 Lectura .....	53
11. Resultados .....	54
12. Discusiones .....	80
13. Conclusiones.....	87
14. Recomendaciones.....	89
15. Referencias Bibliográficas... ..	92
16. Anexos .....	95

## 1. RESUMEN

La equinococosis quística es producida por el estado larval del cestodo *Echinococcus granulosus* y es un problema de importancia en salud pública. Las técnicas serodiagnósticos de la enfermedad empleadas se basa en el antígeno total del líquido de hidatídico (ATLH), y su eficacia depende de múltiples factores (origen, pureza y calidad del antígeno). El objetivo de este trabajo es obtener un producto purificado de la fracción antigénica de 21 a 31kDa del líquido de quiste hidatídico, para ello se evaluaron tres protocolos de purificación de proteínas. Para el estudio se empleó ATLH liofilizado, obtenido a partir de líquido de quiste hidatídico de ovino. Los protocolos empleados fueron: 1. Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación, concentración por ultrafiltración y electroelusión.; 2. Purificación por separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE y electroelusión de la proteína.; 3. Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación y electroelusión. Las proteínas obtenidas con los 3 métodos fueron evaluadas con electroforesis SDS-PAGE donde se observó a la proteína del peso molecular esperado. Sin embargo, la estabilidad de ellas vario debido al tiempo de colecta y el método de purificación. En el Inmunoblot se observó una reacción antígeno-anticuerpo más intensa en las tiras evaluadas con sueros confirmados positivos de Hidatidosis en el protocolo 1 a diferencia del protocolo 2 y 3, donde la reacción fue menos intensa. Se concluyó que el protocolo 1 fue el más eficiente y adecuado para fines de purificación de la fracción antigénica de 21-31 kDa de *Echinococcus granulosus*.

**Palabras clave:** *Echinococcus granulosus*, equinococosis quística, purificación de proteínas, inmunoblot, Perú.

## 2. ABSTRACT

Cystic echinococcosis caused by the larval stage of the cestode *Echinococcus granulosus* is a problem of public health importance. The employed serodiagnostic techniques are based on the total antigen of the hydatid fluid (ATLH), and its efficacy depends on multiple factors (origin, purity and quality of the antigen). The aim of this work is to obtain a purified product of the antigenic fraction from 21 to 31 kDa of hydatid cyst fluid. In this sense, three methods of protein purification were evaluated. For this purpose, Lyophilized ATLH obtained from fluid of sheep hydatid cyst was used. The methods used were: 1. Purification by fractionation of proteins with ammonium sulphate at 60% saturation, following of a concentration by ultrafiltration and electroelusion; 2. Purification by separation of proteins using SDS-PAGE electrophoresis and electroelusion of the protein; 3. Purification by fractionation of proteins with ammonium sulphate at 60% saturation and electroelusion. The proteins obtained with the 3 methods were evaluated with SDS-PAGE electrophoresis where the protein of the expected molecular weight was observed. However, the stability of them varied due to the collection time and the purification method. In the Immunoblot, a more intense antigen-antibody reaction was observed in the strips evaluated with confirmed positive hydatidosis sera in protocol 1, as opposed to protocol 2 and 3, where the reaction was less intense. It was concluded that protocol 1 was the most efficient and suitable for purification purposes of the antigenic fraction of 21-31 kDa of *Echinococcus granulosus*.

**Key words:** *Echinococcus granulosus*, Cystic echinococcosis, protein purification, immunoblot, Peru.

### 3. INTRODUCCIÓN

La equinococosis quística (en adelante, EQ) o Hidatidosis es causada por el estado larval del cestodo *Echinococcus granulosus* (figura 1). El ciclo de vida de este parásito involucra al perro y a otros cánidos como los hospederos definitivos, mientras que los hospederos intermediarios son ganado ovino y vacuno, cabras y cerdos. Sin embargo, debido a la contaminación de las fuentes de alimento y agua por los huevos de *Echinococcus granulosus* liberados en las heces de los perros, el hombre puede convertirse en un hospedero intermediario accidental y desarrollar la equinococosis quística. Ciertas actividades humanas como la práctica rural generalizada de alimentar a los perros con las vísceras de los ovinos y bovinos caseros faenadas, facilitan la transmisión del gusano y consecuentemente incrementa el riesgo de infección de los humanos, el juego y/o contacto entre el niño y el perro infectado también es una de las formas de transferencia de los huevos ya que estos se encuentran adheridos al pelaje del can<sup>1,2,3</sup>.

Después de ingeridos los huevos de *Echinococcus* eclosionan y liberan embriones (oncósfera) en el intestino delgado, estos penetran la mucosa y llegan al torrente sanguíneo y se dirigen hacia el hígado y otros órganos, donde comienza el desarrollo del quiste. Muchas de las infecciones primarias en humanos consisten de un solo quiste; sin embargo, 20-40 % de los individuos tienen múltiples quistes o múltiples órganos involucrados<sup>1,4,5</sup>.

El hígado es el órgano más común de infección de los quistes de *Echinococcus* (>65 %), seguido de pulmón (25%), los quistes son menos frecuentes en el bazo, riñón, corazón, huesos y sistema nervioso central<sup>4</sup>. En la

mayoría de los casos de infección humana, el desarrollo del quiste hidatídico es asintomático. La infección por los huevos de *E. granulosus*, generalmente se da en la infancia y la sintomatología sólo se manifiesta tardíamente, en la edad adulta, cuando el quiste hidatídico ha alcanzado un mayor tamaño en el órgano afectado<sup>2,6</sup>.

La equinococosis quística es una enfermedad crítica y de importancia en la salud pública que afecta a la población de zonas agrícolas y ganadera. En las regiones endémicas, las tasas de incidencia de la equinococosis quística en el ser humano pueden ascender a más de 50 por 100 000 personas-año, y la prevalencia puede alcanzar el 5-10% en algunas zonas de Argentina, Perú, África Oriental, Asia Central y China<sup>5</sup>. Globalmente, la pérdida anual debido a hidatidosis humana (tratamiento y pérdida de ingresos) ha sido estimada en un promedio de US\$ 200 millones<sup>5</sup>. En el Perú, las áreas afectadas y con una alta prevalencia de EQ se encuentran principalmente en la región andina que abarca Puno, Junín, Arequipa, Cusco, Huancavelica y Ayacucho<sup>7</sup>.

La equinococosis quística es una infección parasitaria humana, cuyo diagnóstico de laboratorio es principalmente inmuno-serológico. El diagnóstico serológico de la hidatidosis se basa en la detección de anticuerpos circulantes o células sensibilizadas contra los antígenos del quiste hidatídico<sup>3</sup>.

El diagnóstico de esta zoonosis parasitaria frecuentemente es confirmado por técnicas de imagen como la tomografía, la resonancia magnética y la ecografía y métodos serológicos de los cuales destacan la técnica de Inmunoblot o *Western Blot* que muestra alta sensibilidad y especificidad<sup>2</sup>, la doble difusión

arco 5 (DD5), la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la técnica de aglutinación de látex<sup>2</sup>.

El líquido hidatídico, los extractos de protoescolices y las membranas envolventes de los quistes se utilizan como fuentes de antígeno para realizar las diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico de la hidatidosis, proporcionando mejores resultados el uso del líquido hidatídico ya que contiene macromoléculas secretoras y excretoras de la larva<sup>8</sup>. Los antígenos del líquido del quiste hidatídico como las lipoproteínas de antígeno B (Ag B) y el antígeno 5 (Ag 5) son la fuente habitual de material antigénico para el inmunodiagnóstico de EQ<sup>6,8</sup>.

El diagnóstico por Inmunoblot es una técnica que permite observar la reacción de anticuerpos presentes en el suero de los pacientes frente al antígeno total de líquido hidatídico (ATLH) de *Echinococcus granulosus*. En el diagnóstico por Inmunoblot se obtienen resultados positivos cuando se observa precipitación de las bandas de 21- 31 kDa que demuestran reacción inmunoenzimática entre el suero del paciente y el antígeno<sup>2,8,9</sup>.

El diagnóstico precoz y un oportuno tratamiento pueden disminuir los casos de mortalidad, ya que las infecciones son usualmente asintomáticas por muchos años, además la sintomatología varía de acuerdo con la tasa de desarrollo del parásito<sup>10</sup>.

La reacción cruzada con otras infecciones por helmintos es otro de los problemas en el diagnóstico serológico, por ejemplo, la reacción serológica para hidatidosis, tiene reacciones cruzadas con cisticercosis y/o *T. saginata*, lo que

hace que ninguna de las técnicas de diagnóstico individualmente sea satisfactoria, por lo que se recomienda usar combinaciones de dos o más test<sup>6,10</sup>.

La reactividad cruzada con antígenos de otros parásitos, notablemente otros cestodos taenidos, es un problema importante. Se ha sugerido que la prueba serológica para EQ puede ser mejorada mediante el uso de proteínas recombinantes, mediante la combinación de varios antígenos definidos, incluyendo nuevos péptidos específicos que reaccionan con muestras de suero de otro modo falso negativo. Sin embargo, en la actualidad no existe una prueba estándar, altamente sensible y específica disponible para la detección de anticuerpos en casos de EQ<sup>3</sup>.

Para mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica de diagnóstico Inmunoblot es necesario mejorar el procedimiento de obtención de antígeno y su purificación. Por tanto, se necesita mejorar la especificidad de la prueba de Inmunoblot para un diagnóstico efectivo, por eso es importante purificar y caracterizar proteínas de fracción antigénica de 21-31 kDa presentes en el líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus*, las cuales han demostrado ser específicas para el diagnóstico de la enfermedad<sup>2,8,9</sup>.

Esta tesis es parte de un proyecto presentado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria del Instituto Nacional de Salud, titulado: **“Proteómica de *Echinococcus granulosus*: Hacia la búsqueda e identificación de proteínas específicas para el diagnóstico de equinococosis quística en humanos”**, código OI-042-15. El proyecto y esta tesis fueron financiados por INNÓVATE PERÚ.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar tres protocolos para purificar la fracción de proteínas antigénicas entre 21 y 31 kDa a partir de líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* de ovino.

### 4.2 Objetivos específicos

- Estandarizar tres protocolos de aislamiento y purificación de proteínas entre 21 y 31 kDa a partir del antígeno presente en el líquido hidatídico de *Echinococcus granulosus* de ovino.
- Comparar los protocolos de purificación y aislamiento de proteínas a partir del antígeno presente en el líquido hidatídico de *Echinococcus granulosus* de ovino.
- Evaluar el rendimiento de cada protocolo de purificación para la obtención de las proteínas entre 21 y 31 kDa.

## 5. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La Hidatidosis humana es una enfermedad con un alto índice de morbilidad que amenaza a poblaciones de zonas rurales, agrícolas y ganaderas las cuales desconocen normas de salubridad y sanidad. La importancia de la hidatidosis en la salud pública está relacionada con el alto índice de morbilidad humana, pues cerca del 70% de los casos ocurre en personas en plena actividad productiva, afectando el rendimiento laboral y causando gastos por hospitalización, intervenciones e incapacidades.

El diagnóstico mayormente es confirmado por técnicas de imagen y métodos serológicos. Sin embargo, la sintomatología de esta zoonosis se presenta cuando el quiste llega a un cierto tamaño que requiere muchos años después de la primera infección.

Pese a la alta sensibilidad de las técnicas serológicas basadas en antígeno total, tienen la desventaja de ser bastante inespecíficas por el número elevado de reacciones cruzadas que se presentan con otras infecciones parasitarias. Por tanto, se necesita mejorar la especificidad de la prueba de Inmunoblot para un diagnóstico efectivo, por eso es importante purificar y caracterizar proteínas de fracción antigénica entre 21-31 kDa presentes en el Líquido de Quiste Hidatídico de *Echinococcus granulosus*, las cuales han demostrado ser específicas para el diagnóstico de la enfermedad.

Para la purificación de la fracción antigénica de las proteínas entre 21 a 31 kDa se emplearon tres métodos:

1. Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación, concentración por ultrafiltración un sistema cerrado empleando membrana de poliétersulfona y electroelución de estas proteínas a partir de gel de electroforesis SDS-PAGE en un equipo Electroelutor;
2. Purificación por separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE y electro elución de la proteína de 21 a 31 kDa a partir del gel;
3. Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación y electroeluidas a partir del gel.

Las técnicas utilizadas en los protocolos fueron aplicadas con equipos con los que cuenta el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria. Además, las técnicas aplicadas en cada uno de los 3 métodos de purificación son técnicas estandarizadas por el Laboratorio de Zoonosis parasitara y se realizan para la producción de tiras reactivas para el diagnóstico por Inmunoblot.

## **6. HIPOTESIS**

Las proteínas obtenidas en la purificación de la fracción antigénica de 21- 31 kDa mediante los tres diferentes protocolos tendrán mayor capacidad antigénica.

## 7. MARCO TEORICO

### 7.1 ANTECEDENTES

Los primeros antecedentes descritos sobre el complejo de proteínas presentes en el parásito *Echinococcus granulosus* se remontan a 1987 donde se identificaron cinco grandes subunidades de antígenos del parásito con masa molecular relativa de 12, 16, dos de 20 y 38 kDa <sup>11</sup>. Se concluyó que estas moléculas serían adecuadas para la detección en el inmunodiagnóstico específico. En años posteriores, se aisló dos antígenos del líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* de aproximadamente 20 y 48 kDa, basándose en un protocolo de purificación con cuatro tipos diferentes de cromatografía<sup>12</sup>.

En el 2004, Sánchez E<sup>9</sup> aisló y purificó parcialmente la fracción antigénica de 21 a 31 kDa de líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus* de ovino procedentes de Perú ya que mediante la técnica de Inmunoblot esta fracción es detectada como específica para el diagnóstico de la hidatidosis humana en Perú. Debido a la importancia de ésta fracción como alternativa más específica para la detección del quiste hidatídico en pacientes infectados, purificó estas proteínas mediante la precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación y ultrafiltración. El aislamiento de la fracción antigénica de 21 a 31 kDa fue realizada por electroelución en gel.

En el 2011, Aziz A <sup>13</sup>. realizó un análisis de fluido de quiste hidatídico de humano, ganado vacuno y oveja donde identificó 130 proteínas, y mostro con SDS-PAGE una mixtura compleja de proteínas oscilando entre los 11 kDa y 170 kDa. Posteriormente Cui, S <sup>14</sup> identificó 157 y 1588 proteínas del parásito adulto y de

protoescólicas respectivamente, de las cuales 179 son proteínas de la membrana plasmática, 149 proteínas secretadas y 8 proteínas secretadas no clásicamente, lo que representa el 21% del total de proteínas identificadas.

En el 2013, Zheng, H <sup>15</sup> reportó la secuencia y el análisis del genoma de *Echinococcus granulosus*, señaló que está compuesto por nueve pares de cromosomas, y fue uno de los primeros genomas de cestodos en ser secuenciado. Su estudio proporcionó información sobre la biología, el desarrollo, la diferenciación, la evolución y la interacción de *E. granulosus* con el hospedero e identificó una serie de medicamentos y vacunas que podrían facilitar el desarrollo de nuevas herramientas de intervención para el tratamiento y control de hidatidosis.

Años después en el 2014, Jeyathilakan, N <sup>16</sup> evaluó la capacidad antigénica del antígeno B del líquido hidatídico en exámenes de diagnóstico, demostró que la subunidad de 8 kDa fue inmunodominante durante la evaluación. En el mismo año Pagnozzi, D <sup>17</sup> caracterizó los antígenos B y 5 nativos del líquido hidatídico de quiste ovino, mediante una serie de métodos de purificación. De los cuales determinaron las bandas de 8, 16, 24 y 38 kDa. Mientras que, en el año siguiente, Debarba, J<sup>18</sup> identificó 275 nuevas proteínas sintetizadas por los protoescólicas durante el desarrollo de estrobilación dentro del quiste hidatídico. En el 2016, Álvarez, V<sup>19</sup>, evaluó la unión del Antígeno B de *Echinococcus granulosus* con los monocitos y macrófagos en función a su respuesta inmune, por lo que descubrió que la subunidad EgAg8/1 posee potenciales ligandos para la unión de estas moléculas.

En el 2017 Díaz, A <sup>6</sup> mencionó que las proteínas recombinantes del antígeno B se comportan de manera similar al fluido hidatídico crudo en el diagnóstico del paciente. Sin embargo, ni el uso de antígenos recombinantes únicos ni la combinación de pruebas contra dos o más antígenos superan el problema de que aproximadamente una quinta parte del total de los pacientes dan negativo. La mejora de la serología EQ requerirá grandes estudios intercentros, de los cuales pocos tienen llevado a cabo.

## 7.2 GENERALIDADES

### 7.2.1 El Parásito

***Echinococcus granulosus*** ( Batsch 1786) , es una de las tenías más pequeñas del mundo (figura 1), ya que su estróbila (cuerpo del parásito) mide unos 5 milímetros de largo (de 2 a 6 mm) y posee 3 a 5 proglótidos (segmentos). Como todos los ciclofilídeos, presenta su escólex (cabeza) con cuatro ventosas y posee, distintivamente, un rostellum con usualmente 30 a 36 ganchos, en doble hilera<sup>3,20</sup>. Carece de sistema digestivo por lo que intercambio metabólico se lleva a cabo a través de la cubierta exterior sincitial, el tegumento<sup>20</sup>.



**Figura 1. Tenía de *Echinococcus granulosus*. Fuente:**  
[www.facmed.unam.mx/.../echinocadulto.jpg](http://www.facmed.unam.mx/.../echinocadulto.jpg)

### 7.2.1.1 Taxonomía

El gusano *Echinococcus granulosus* causante de la EQ o Hidatidosis se encuentra clasificado taxonómicamente de esta manera<sup>20</sup>.

**Filo** Platelminetos

**Clase** Cestoda

**Subclase** Eucestoda

**Orden** Cyclophyllidea

**Familia** Taenidae

**Género** Echinococcus

**Especie** *E. granulosus*

### 7.2.1.2 Formas o estadios

El parásito de *Echinococcus granulosus* posee diferentes estadios o formas durante el desarrollo de su ciclo biológico.

#### 7.2.1.2.1 Huevo

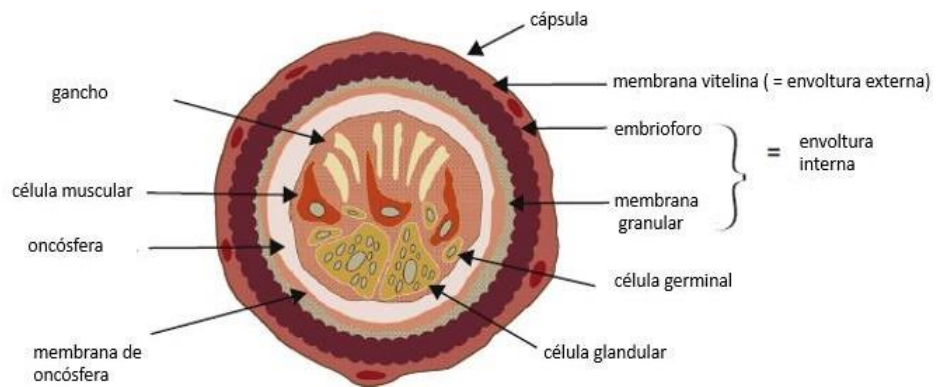
Con la materia fecal del perro se elimina periódicamente el último de sus tres segmentos o proglótide grávido conteniendo un promedio de 587 huevos. Estos huevos (figuras 2 y 3), son de características ovoideas, de 30 a 40 micras de diámetro que contienen un embrión hexacanto (oncósfera o primer estado larval) envuelto en varias membranas, incluyendo una gruesa pared queratinizada y de alta resistencia<sup>3,20</sup>. Los huevos son muy resistentes a las condiciones climáticas pudiendo permanecer viables un año<sup>21</sup>.





**Figura 2. Huevo de *Echinococcus granulosus*.**

Fuente: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Echinococcosis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Echinococcosis_il.htm)



**Figura 3. Huevo de *Echinococcus granulosus*.**

Fuente: Thompson, R.C.A.2017. Biology and systematics of Echinococcus.

### 7.2.1.2.2 Oncósfera o Embrión

Los huevos eclosionan liberando el embrión hexacanto (figura 4) en el intestino delgado del animal. A través de las vellosidades intestinales, pasan a la circulación venosa y se alojan en el tejido hepático o pulmonar donde forman una o varias hidátides (metacestode o segundo estado larval)<sup>20,21</sup>.

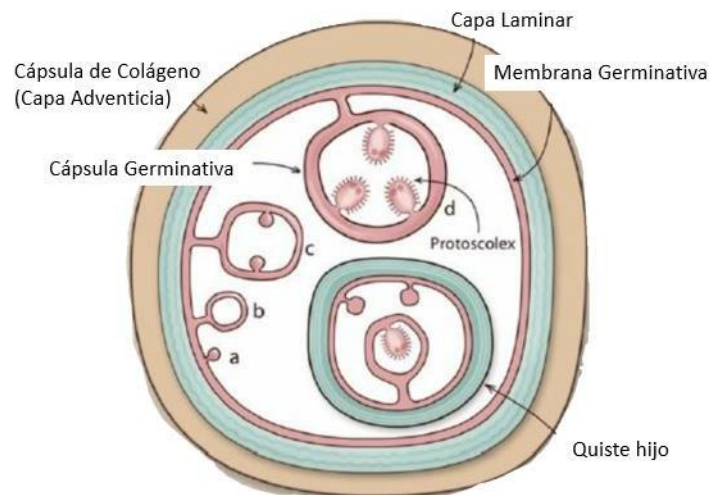


**Figura 4. Oncófera de *Echinococcus granulosus*.**

Fuente: <http://www.parasite-diagnosis.ch/echinocystessentials>

### 7.2.1.2.3 Quiste

El quiste hidatídico (figura 5) es el estado larval propiamente dicho del parásito. El proceso de gemación de la capa germinal hacia la cavidad del quiste da lugar a las llamadas cápsulas o vesículas proligeras, que a su vez generan dentro de ellas a los protoescólices. La capa germinal está protegida externamente por una capa acelular gruesa (hasta 3 mm) llamada capa laminada<sup>6,20</sup>.



**Figura 5: Estructura transversal e interna del quiste hidatídico.**

Proceso de Gemación en el que brotan hacia su interior para generar protoescólices (a-d). Fuente: Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease).2017. Autor: Álvaro Díaz.



Figura 6. Quistes de *Echinococcus granulosus* en hígado y pulmón de ovino.  
Fuente: Foto Propia.

#### 7.2.1.2.4 Protoescólices

Se encuentran en el interior del quiste hidatídico (figura 6), se forman, en la membrana germinal la que da lugar a vesículas en las que se desarrollan protoescólices (figura 7), con 4 ventosas y corona de ganchos (escólices)<sup>3,20</sup>. Estas vesículas pueden encontrarse adheridas a la pared o libres, en el líquido, cuando es ingerido por un huésped definitivo, evagina y se adhiere a la mucosa intestinal, desarrollándose en adultos sexualmente maduros en un período promedio de 4 a 7 semanas<sup>21</sup>. El conjunto de restos membranales, protoescólices, constituyen la denominada **arenilla**<sup>3,20</sup>.

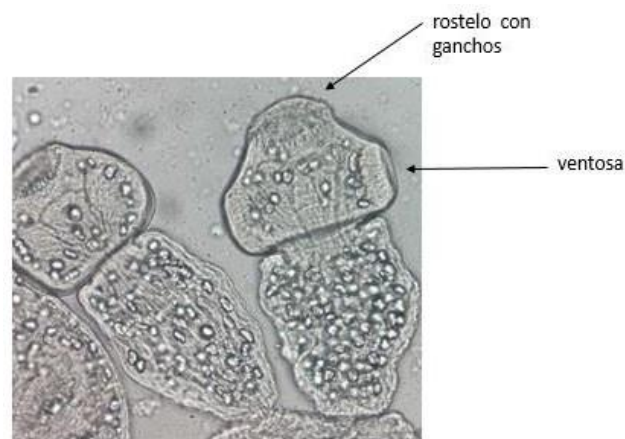


Figura 7. Protoescólices de *Echinococcus granulosus*. Fuente: Foto Propia.

### 7.2.1.2.5 Adulto

El ciclo de vida del parásito se completa cuando los perros se alimentan de los órganos infectados de huéspedes intermediarios, los cuales poseen protoescólices viables que al ser ingeridos se convierten en gusanos adultos (figura 8) en el intestino<sup>3,20,21</sup>.

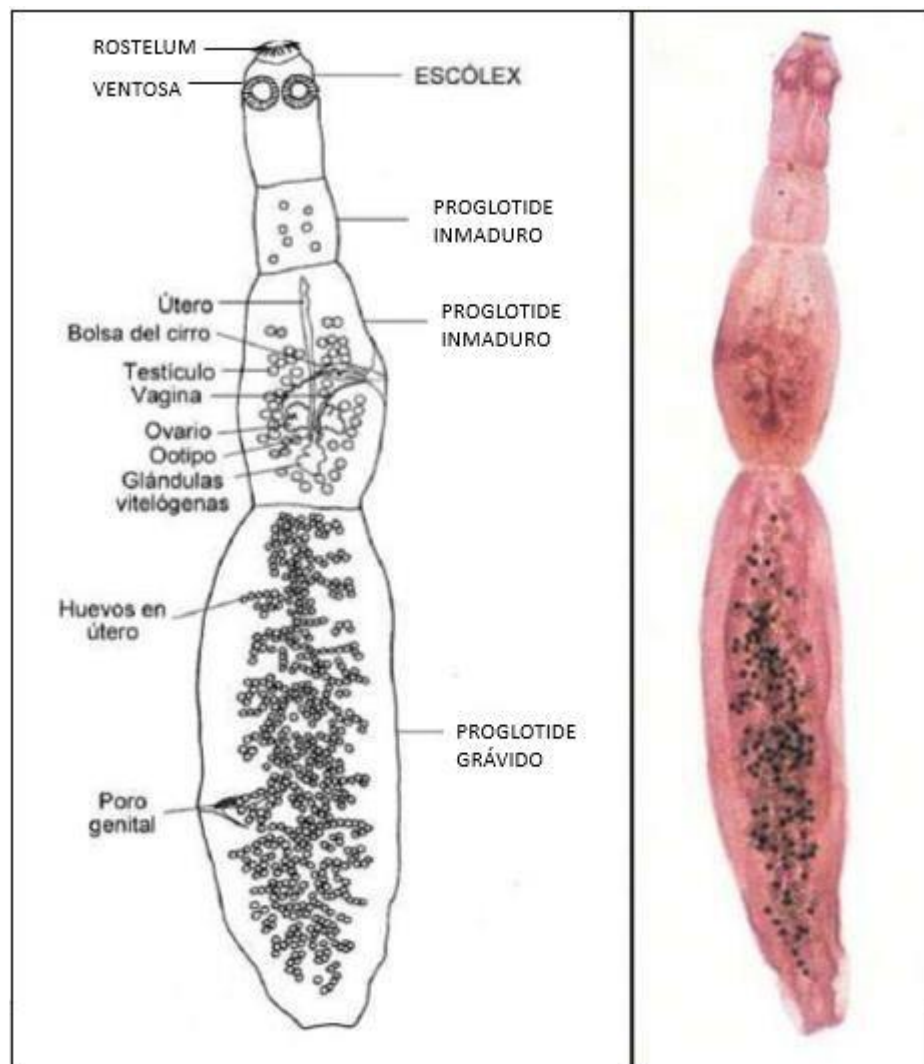


Figura 8. Parásito en su forma adulta de *Echinococcus granulosus*.

Fuente: <http://cestodes53.blogspot.pe/p/informacion-sobre-tenia-equinococcus.html>

## 7.2.2 Ciclo de vida

El ciclo de transmisión del parásito (figura 9) comprende perro-ovino, sin embargo, también puede parasitar a otros animales y a humanos. El perro al alimentarse con vísceras parasitadas del ganado ovino (u otros) ingiere los protoescólices, los cuales se fijan en el intestino del perro donde desarrollan la forma adulta del parásito y estos a su vez liberarán huevos juntamente con las heces contaminando así el medio ambiente, agua, hortalizas y pasto<sup>1,3,6</sup>. El ganado ovino al alimentarse con pastos contaminados ingiere los huevos del parásito, posteriormente el ganado desarrolla la forma larvaria o quiste hidatídico en hígado y/o pulmones completándose el ciclo, el hombre se infesta en forma accidental, por convivencia y contacto con el perro o bien por la ingestión de alimentos (vegetales y hortalizas mal lavadas) o agua contaminadas con huevos del parásito<sup>20,21</sup>.

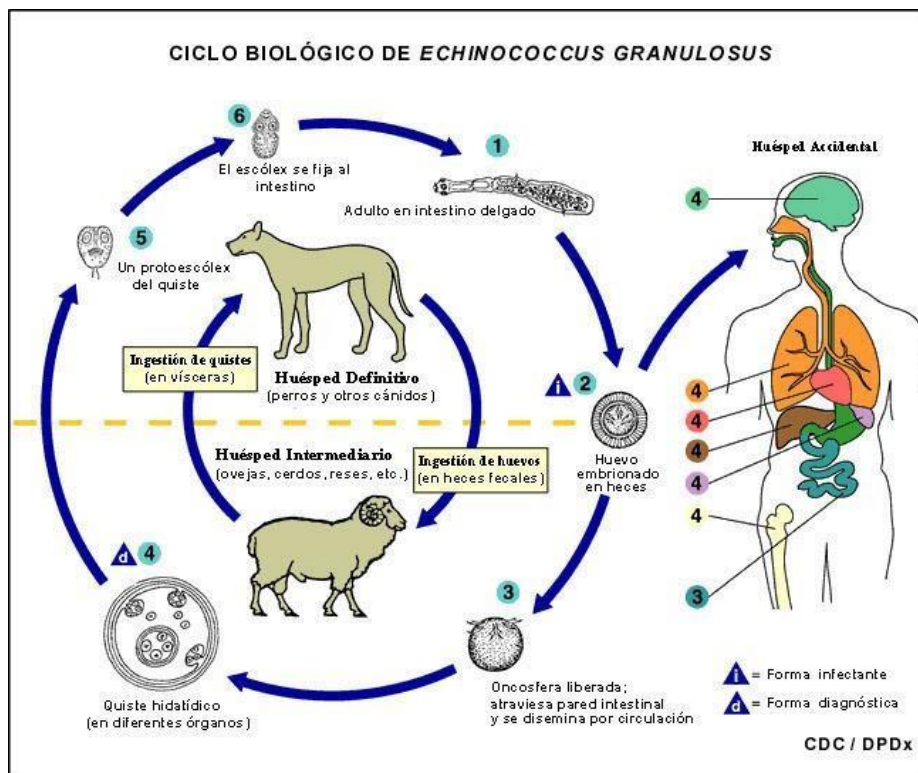


Figura 9. Ciclo Biológico de *Echinococcus granulosus*.

Fuente: <https://www.cdc.gov/parasites/echinococcosis/biology.html>

*E. granulosus* tiene dos hospederos: el definitivo y el intermediario. El hospedero definitivo es el perro en cuyo intestino se desarrolla la forma adulta. Los hospederos intermediarios son mamíferos herbívoros, incluyendo al hombre en quienes se encuentra la forma larvaria<sup>1,2,20</sup>.

El parásito adulto se encuentra fijado a las vellosidades de la mucosa del intestino delgado del hospedero definitivo. Las proglótidas grávidas que contienen varios cientos de huevos, se desprenden del estróbilo y son eliminadas con las heces del animal y contaminan el suelo, pasto, vegetales y el agua<sup>2,3,21</sup>.

Cada huevo liberado contiene una oncósfera (o embrión hexacanto) el cual es ingerido por los hospederos intermediarios a través de la vegetación, suelo o agua contaminados. Cuando la oncósfera se libera al intestino delgado de este hospedero, atraviesa la mucosa intestinal y penetra los vasos sanguíneos y linfáticos, a través de las cuales llega al hígado, de allí a los pulmones y a otros órganos donde va a desarrollarse la larva o quiste hidatídico<sup>3,6,20</sup>.

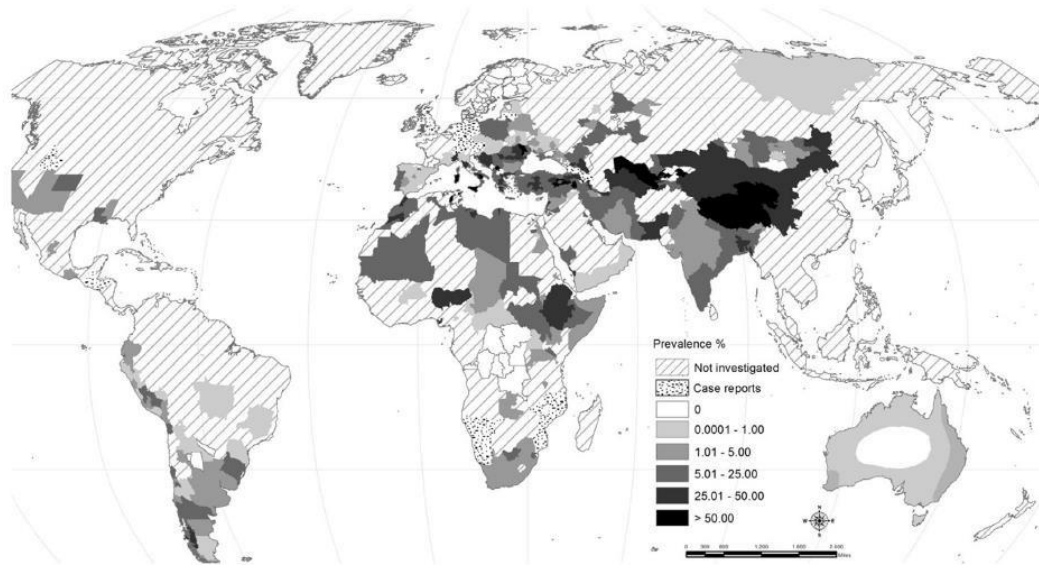
Las vísceras del hospedero intermediario que contienen las larvas o quistes. Cada quiste está rodeado por una membrana adventicia granulomatosa producida por el huésped. En la membrana interna germinal del quiste brotan pequeñas vesículas llamadas cápsulas de crecimiento donde se producen múltiples protoescólices por división asexual<sup>1</sup>. Estos protoescólices ingeridos por el perro se desarrollarán en su intestino dando origen a la forma adulta de *E. granulosus*. El hombre es un hospedero intermediario accidental y no cumple ningún papel en el ciclo evolutivo, sin embargo, es el principal responsable en perpetuar la infección, ya que alimenta a los perros por costumbre o por necesidad, con vísceras portadoras de quistes<sup>1,2</sup>.

Los perros infectados con el cestodo de *Echinococcus* eliminan los huevos en sus heces y los humanos se infectan mediante contacto fecal-oral, particularmente durante el juego que tienen los niños con los perros. Los huevos se adhieren en el pelo del perro infectado alrededor del ano, muslos y patas. La transferencia indirecta de los huevos, también se da mediante agua contaminada y alimentos mal cocidos o por un artrópodo intermediario como la pulga que pueden también infectar a los humanos<sup>1,3,6</sup>.

### **7.2.3 Epidemiología**

La equinococosis quística está asociada con la pobreza y las malas prácticas de higiene, en particular en las comunidades ganaderas, tiene una distribución cosmopolita y representa un importante problema de salud pública en algunas regiones. Se considera endémico en áreas como Perú, Chile, Argentina, Uruguay, sur de Brasil, la región mediterránea, Asia central, oeste de China y África oriental (figura 10). La equinococosis quística no se encuentra en la Antártida y ha sido eliminada a través de programas integrales de control en Islandia, Nueva Zelanda, Tasmania, Islas Malvinas y Chipre<sup>5,6,21</sup>.

La equinococosis es una de las 17 enfermedades tropicales olvidadas reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>21</sup>. La incidencia humana puede exceder 50 por cada 100,000 personas-años en áreas endémicas, y tasas de prevalencia de hasta 5% a 10% se pueden encontrar en partes de Perú, Argentina, África oriental y China. Cada año, la equinococosis es responsable de la pérdida de al menos 1 millón de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) y de \$ 3,000 millones en gastos, que incluyen el tratamiento y las pérdidas de ganado<sup>6,21</sup>.



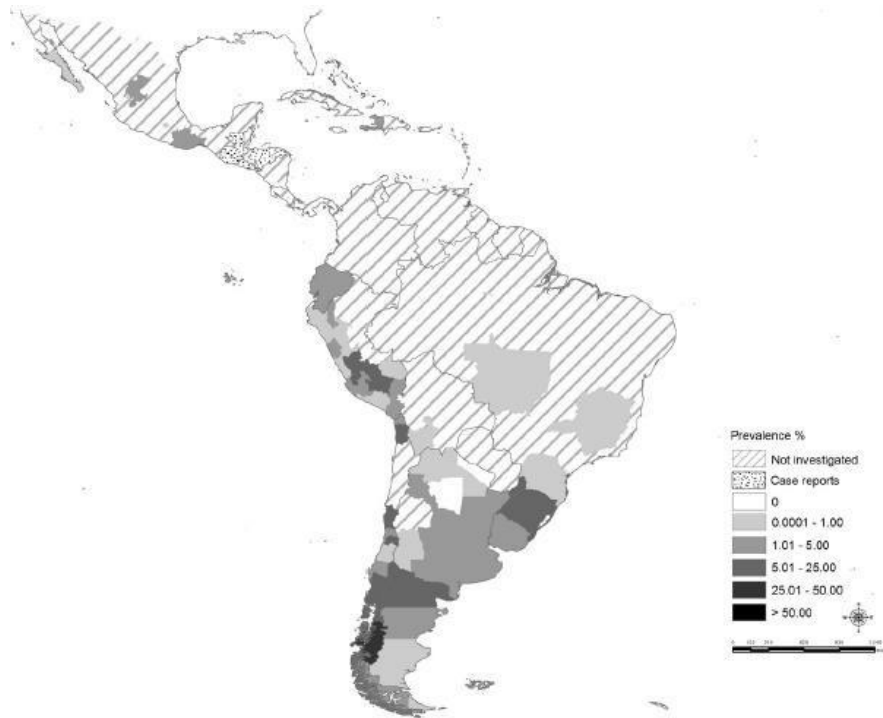
**Figura 10. Distribución actual de *Echinococcus granulosus*, causante de equinococosis quística.**

Fuente: (2017) Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis

En América del Sur (figura 11), se sabe que EQ tiene una alta prevalencia en partes de Argentina (Patagonia, Pampa, Costa), Bolivia (suroeste), Brasil (sur), Chile (regiones del valle central sur y extremo sur), Perú (centro y sur) y Uruguay<sup>23</sup>. La enfermedad tiene una gran importancia para la salud humana y socioeconómica, y tiene una alta prevalencia en el ganado<sup>21,23</sup>.

El Perú es probablemente el país de América del Sur con una mayor incidencia y prevalencia de EQ, entre el 2001 y 2006 el número de casos por año fue entre 7 y 11 casos por cada 100 000 personas, sin embargo, hay departamentos con más altas tasas de incidencias entre 14 y 34 casos por cada 100 000 habitantes como es el caso de Junín, Cerro de Pasco y Huancavelica, ocasionando altos costos hospitalarios que llegan entre 1000 y 5500 dólares por paciente<sup>24</sup>.





**Figura 11. Distribución actual de *Echinococcus granulosus*, causante de equinococosis quística en Centro y Suramérica.**

Fuente: (2017) Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis

*Echinococcus granulosus* se compone de numerosas variantes inicialmente identificadas por J.D. Smyth y Z. Davies (1974), a las que llamaron "cepas fisiológicas". Este término se debió a la observación de diferencias radicales en el desarrollo in vitro de protoescólices aislados de quistes de ovejas y caballos. Desde entonces, se identificaron más cepas las cuales difieren en muchas características, como el perfil proteico, los rehidratos de carbohidratos y lípidos, la morfología de los ganchos, los requisitos metabólicos, desarrollo de quistes fértiles en infecciones naturales, desarrollo de quistes en infecciones experimentales, especificidad intermedia del hospedador, antigenicidad e infectividad y patogenicidad en humanos<sup>22</sup>.

Las técnicas de biología molecular permitieron la identificación de polimorfismos de ADN en genes mitocondriales de *E. granulosus*. Esos polimorfismos se detectaron por secuenciación de ADN y PCR-RFLP y se correlacionaron con las cepas descritas hasta entonces<sup>22,23</sup>. Esto permitió asignar un genotipo a cada cepa. Desde entonces, se han aplicado varias herramientas moleculares para determinar la variabilidad genética *Echinococcus* spp<sup>22,24</sup>.

Estudios moleculares usando secuenciamiento de ADN mitocondrial han identificado 10 diferentes tipos genéticos (G1-G10) en *Echinococcus granulosus*. Estos incluyen dos cepas de Oveja (G1 y G2), dos cepas de bovino (G3 y G5), una cepa de caballo (G4), una cepa de camélido (G6), una cepa de cerdo (G7), y una cepa de cérvido (G8). Un noveno genotipo (G9) ha sido descrito en un cerdo en Polonia y un décimo genotipo (G10) en un reno en Eurasia. La cepa de oveja (G1) es la forma más cosmopolita y es la más común asociada con infecciones humanas<sup>1,7,22</sup>.

En América del Sur, cinco países tienen casos de equinococosis quística identificados en hospedadores naturales, intermedios y definitivos para los que se dispone de datos de secuenciación: Argentina, Brasil, Chile, Perú y Uruguay. Se han encontrado un total de seis genotipos en la región: G1, G2, G3, G5, G6 y G7. Los tipos de ganado afectados son ovejas, vacas, cerdos, cabras y alpacas. El genotipo G1 muestra la distribución más amplia y es el más frecuente en las especies de ganado analizadas, así como en el hospedador doméstico definitivo. El segundo genotipo más frecuente es el G5 principalmente aislado del ganado brasileño<sup>24</sup>.

Sánchez, E y colaboradores<sup>7</sup> determinaron los genotipos presentes en áreas endémicas del Perú, las muestras colectadas para el estudio provenían de ganado ovino, vacuno y de humanos, para el análisis se utilizó el gen de la subunidad 1 del citocromo C oxidasa mitocondrial. Los productos de reacción en cadena de polimerasa resultantes se secuenciaron y se examinaron. Todos los aislamientos, independientes del huésped, exhibieron el genotipo G1. El genotipo G1 se considera la forma más extendida e infecciosa de *E. granulosus* en todo el mundo y los resultados confirman que los mismos patrones se aplican a este país.

Años posteriores Sánchez, E y su equipo <sup>25</sup> identificó los genotipos de *Echinococcus granulosus* presentes en animales de granja y animales salvajes dentro de las regiones endémicas para la equinococosis quística. Se recogieron muestras de quistes hidatídicos de *E. granulosus* de alpacas (4) en Puno y cerdos (8) en Ayacucho en Perú, una región endémica para EQ. Mediante las técnicas de PCR y el secuenciamiento del ADN de regiones específicas de la subunidad 1 mitocondrial del citocromo C y de los genes de la subunidad 1 de NADH deshidrogenasa se confirmó la presencia de una cepa común en ovejas, el genotipo G1, en alpacas. Se identificaron dos cepas diferentes de *E. granulosus* en cerdos: los genotipos G1 y G7. Este fue el primer informe del genotipo G1 de *E. granulosus* en alpacas en regiones endémicas de EQ en Perú.

#### **7.2.4 Control de la Enfermedad**

La equinocosis quística se controla mediante la prevención de la transmisión del parásito. Las medidas de prevención incluyen limitar las áreas donde los perros están permitidos y evitar que los animales consuman los órganos infectados con quistes<sup>17</sup>.

Algunas de las normas propuestas por la OMS son evitar que los perros se alimenten de los cadáveres de ovejas infectadas, control de las poblaciones de perros callejeros, lavarse las manos con jabón y agua tibia después de tocar perros y antes de manipular alimentos<sup>5</sup>.

#### **7.2.5 Manifestaciones clínicas y Tratamiento**

Las manifestaciones clínicas de la hidatidosis se relacionan con el estado físico del quiste e integridad de sus membranas, así como de su localización y tamaño. El promedio de crecimiento de los quistes es variable, oscilando de 1 a 5 cm en diámetro por año. Generalmente, el crecimiento del quiste puede manifestarse como masas palpables, deformación de órganos, además de alteraciones funcionales. En casos de localización pulmonar los signos y síntomas frecuentemente incluyen tos, dolor torácico, hemoptisis o disnea. Cuando la localización es hepática o abdominal puede haber dolor, masas palpables, ictericia, hepatomegalia o esplenomegalia<sup>1,2,3</sup>. Entre los signos no específicos figuran anorexia, pérdida de peso y debilidad. El período asintomático de incubación de la enfermedad puede durar muchos años hasta que los quistes hidatídicos crecen hasta un punto que desencadenan signos clínicos. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los pacientes que reciben tratamiento médico para la infección lo reciben pocos años después de ser infectados<sup>21,24</sup>.

### **7.2.5.1 Tratamiento**

La OMS publicó un "Consenso de expertos para el diagnóstico y tratamiento de la equinococosis quística y alveolar en humanos" en 2010. Dada la falta de ensayos que comparen las diferentes opciones de tratamiento, las recomendaciones se basan en las opiniones de expertos en el campo. Incluso entre las autoridades respetadas, hay una gran variación en el manejo de la enfermedad en todo el mundo<sup>21</sup>.

En general, existen cuatro modalidades de tratamiento diferentes: terapia percutánea, cirugía, quimioterapia y observación sin intervención (observar y esperar). La experiencia del personal y la disponibilidad de recursos, la etapa, el tamaño y la ubicación del quiste, y la presencia de síntomas / complicaciones son los principales elementos que se toman en consideración al elegir entre estas opciones<sup>6,21,24</sup>.

Dentro del tratamiento farmacológico el Albendazol a dosis de 10 mg/kg (usualmente 400 mg, 2 veces por día) luego de una comida con algún contenido graso para mejorar su absorción, sería el fármaco de elección en la actualidad en quistes asintomáticos o en pacientes sintomáticos (no complicados) que tienen contraindicación para una cirugía<sup>24</sup>.

### **7.2.5.2 Vacunas**

La protección inmunitaria mediante preparaciones crudas de oncosfera se imita mediante la vacunación con un único antígeno proteico, llamado Eg95, en forma nativa o recombinante<sup>6</sup>. Actualmente, la vacuna se está sometiendo a una prueba de campo en ovejas en Argentina y se informa que 86% de las ovejas vacunadas estaban completamente libres de quistes hidatídicos viables cuando se examinaron 1 año después de la inmunización. La vacunación redujo el número de quistes viables en un 99.3%<sup>1,6</sup>. También se ha desarrollado una vacuna contra la fase tenia del perro, que confiere una protección del 97-100% contra el crecimiento del gusano y la producción de huevos<sup>1</sup>. La posibilidad de una vacuna humana es remota, también por razones económicas, ya que la carga de EQ humana en el mundo desarrollado es pequeña<sup>6</sup>.

### **7.3 Aspectos bioquímicos del parásito *Echinococcus granulosus***

Muchas investigaciones se han realizado para mejorar el diagnóstico de EQ, como la purificación y caracterización de las proteínas antigénicas, producción de proteínas recombinantes, entre otras.

#### **7.3.1 Antígeno de Líquido de Quiste Hidatídico**

La fuente de antígenos más importante para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana deriva del líquido del quiste hidatídico<sup>6,26</sup>. El Líquido hidatídico (LH) está compuesto por glucoproteínas y lipoproteínas, hidratos de carbono y sales minerales provenientes del hospedador (principalmente albúmina e inmunoglobulinas), así como otros componentes producto de la actividad metabólica del metacestodo<sup>26</sup>.

Décadas de estudio han demostrado que las principales proteínas antigénicas en el fluido hidatídico son el llamado antígeno 5 y el antígeno B, ambos están bien caracterizados en términos moleculares<sup>6</sup>.

El líquido del quiste hidatídico crudo tiene una alta sensibilidad, que varía típicamente del 75 por ciento al 95 por ciento. Sin embargo, su especificidad a menudo es insatisfactoria y comúnmente se observa reactividad cruzada con sueros de pacientes infectados con otras especies de cestodos (89 por ciento), nemátodos (39 por ciento) y tremátodos (30 por ciento). Por lo tanto, recomiendan purificar los componentes del LH crudo como lipoproteínas del antígeno B de y del antígeno 5 para fines de diagnóstico<sup>16</sup>.

### 7.3.1.1 Antígeno B (Ag B)

Uno de los principales componentes de LH sintetizados en abundancia por la larva es una lipoproteína llamada Antígeno B (EgAgB). La composición y antigenicidad de EgAgB ha sido ampliamente estudiada, debido a que constituye el antígeno del género *Echinococcus* más inmunogénico, alentado el uso preferencial de este antígeno sobre otros antígenos hidatídicos, en el diagnóstico serológico de EQ<sup>6,16,19,27</sup>.

El AgB es una proteína polimérica de 120-160 kDa que en condiciones reductoras se disocia en grandes complejos o subunidades. El análisis de EgAgB nativo a partir del líquido del quiste hidatídico mostró oligómeros de 16, 24 y 32 kDa que se construyen a partir de las subunidades de 8 kDa, como se encuentra en el análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras<sup>26,27</sup>.

Los estudios moleculares para caracterizar el resto de proteína EgAgB mostraron que está codificado por una familia polimórfica y multigénica que comprende cinco subfamilias denominadas EgAgB1 a EgAgB5. Estos genes se expresan diferencialmente en etapas individuales del ciclo de vida del parásito, así como dentro de tejidos distintos de una determinada etapa de desarrollo<sup>27</sup>. EgAgB1 a EgAgB4 se expresan en la etapa metacestoda, mientras que EgAgB5 parece expresarse principalmente en la etapa adulta<sup>19,27</sup>.

Los productos proteicos de los genes EgAgB son polipéptidos ricos en hélice de 8 kDa, subunidades o apolipoproteínas denominados como EgAgB8 / 1 a EgAgB8 / 5<sup>19,27</sup>. Se descubrió que EgAgB pertenece a una nueva familia específica de cestodos conocida como Hydrophobic Ligand Binding Proteins



(HLBPs) o Proteínas de unión a ligando hidrofóbicas, que han surgido por eventos de expansión de genes independientes en diferentes especies<sup>19</sup>.

### **7.3.1.2 Antígeno 5 (Ag5)**

Mientras que AgB es una lipoproteína termoestable de 120 -160 kDa compuesta por subunidades de 8kDa, Ag5 es una proteína dimérica compuesta por subunidades de 22 y 38 kDa unidas por un puente disulfuro, ambas subunidades llevan una modificación de N-glucano<sup>26</sup>.

El antígeno 5, cuya función es desconocida, es antigénico principalmente debido a una cadena particular de carbohidratos que lleva y debido a su elevada concentración en el LH sugiere un papel destacado en el desarrollo del metacestodo<sup>6,26</sup>.

Se ha demostrado que la subunidad de 38 KDa está íntimamente relacionada con serina-proteasas de la familia de la tripsina, mientras que la subunidad de 22 KDa parecer estar implicada en fenómenos de adhesión a la matriz extracelular<sup>26</sup>.

También se sabe que el Ag5 posee un epítipo inmunorrelevante que es un resto de azúcar unido a la subunidad de 38 kDa la cual porta un N-glicano bicatenario modificado con fosforilcolina. Ag5 es una glicoproteína termolábil oligomérica que migra como bandas de 57 kDa y 67 kDa en electroforesis en gel de sodio-dodecilsulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras, y como bandas de 38 kDa y 22 kDa en condiciones reductoras<sup>17,26</sup>.

## 8. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

### 8.1 Precipitación por sales

La **precipitación salina** de las proteínas es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Grandes cantidades de una sal agregada a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína - H<sub>2</sub>O porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar esta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas. Comúnmente se usa sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> debido a su gran solubilidad (760 g de sulfato de amonio/1000 ml de agua a una temperatura de 20°C) y porque el ion sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de esta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas, pero no desnaturalizadas<sup>29</sup>. Las proteínas en solución se hacen menos solubles cuando se aumenta la fuerza iónica y esto se puede lograr adicionando sales como el sulfato de amonio. Esta diferencia en solubilidad se ha utilizado para separar y purificar proteínas<sup>28</sup>.

### 8.2 Diálisis

La diálisis es un proceso que separa moléculas de bajo peso molecular, mediante el empleo de membranas semipermeables que contienen poros de dimensiones inferiores a las macromoleculares. Estos poros permiten que moléculas pequeñas, tales como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, se difundan a través de la membrana, pero bloquean el tránsito de

moléculas mayores. La diálisis se emplea rutinariamente para cambiar el disolvente en el que se encuentran disueltas las macromoléculas. Una disolución macromolecular se introduce en el saco de diálisis, que se sumerge en un volumen relativamente grande de disolvente nuevo. Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana al fluido externo hasta que se alcanza el equilibrio, las macromoléculas permanecerán en el interior de saco de diálisis. El proceso puede repetirse varias veces a fin de sustituir completamente un sistema disolvente por otro<sup>29</sup>.

### **8.3 Cromatografía de gel de exclusión**

La cromatografía de exclusión molecular (a menudo también llamada filtración en gel o de tamiz molecular) es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas. Este tipo de cromatografía se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que se fabrican con este fin y que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado<sup>28,30</sup>.

El principio de la separación es el siguiente: el material que llena la columna (fase estacionaria, gel o resina) está formado por partículas con poros de un cierto intervalo de tamaños. Las moléculas mayores que los poros no pueden entrar en ellos, por lo que "pasan de largo" y avanzan por la columna con mayor rapidez que las de tamaño menor, que pueden entrar en los poros y así realizan un recorrido mayor, progresando más lentamente a lo largo de la columna. En una

cromatografía en columna lo habitual es recoger fracciones del líquido que sale (o eluye), para analizarlas individualmente y así trazar el perfil de elución de la cromatografía<sup>30</sup>.

#### **8.4 Electroforesis SDS-PAGE**

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; Estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos + y - respectivamente), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. La electroforesis es un método analítico – semi preparativo, en el que se separan biomoléculas, en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937. Raymond y Weintraub en 1959 emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores<sup>31,32</sup>.

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además, tiene la ventaja de que, variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro<sup>28,31</sup>.

La solución de tratamiento de las proteínas contiene Tris-HCl, 2 Mercapto-etanol y Dodecil sulfato de sodio (SDS). Esta solución ayuda a desnaturalizar a las proteínas presentes en los antígenos ya que pueden romper los puentes

disulfuro de la cadena polipeptídica de las proteínas con estructura cuaternaria, debido a los agentes reductores como el mercapto-etanol y detergentes como el SDS que posee carga negativa y un fuerte carácter desnaturizante<sup>29</sup>.

### **8.5 Electroelusión**

Un sistema de electroelusión es una técnica que se basa en la extracción de una muestra de un gel de electroforesis mediante la aplicación de una corriente eléctrica la cual produce la migración de las proteínas. Se trata de recuperar la proteína inmersa en el gel, y si es posible volver a renaturalizarla. En esta técnica, las zonas proteicas se localizan después de la electroforesis mediante tinción con azul brillante Coomassie R-250. Los pedazos de gel que contienen proteínas se cortan del gel principal y luego se colocan en una cámara de electroelusión donde las proteínas se transfieren bajo la acción de un campo eléctrico desde el gel a la solución y se concentran sobre una membrana de diálisis con un límite de poro molecular apropiado. Aunque este método puede tener una alta eficacia (90%) de recuperación de proteínas, adolece de una serie de desventajas, que incluyen (1) aislamiento relativamente lento de un pequeño número de muestras, (2) contaminación de la proteína eluida con dodecil sulfato de sodio (SDS), sales y otras impurezas, (3) escisión de la cadena peptídica durante la tinción o elución, y (4) modificación química durante la tinción o elución, que puede conducir a un bloqueo del extremo N terminal<sup>33</sup>.

## **9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Es importante estimar la concentración de las proteínas durante el proceso de purificación y el uso de un método de cuantificación adecuado depende de diversos factores como la cantidad de proteína total en la muestra, la concentración de la proteína, la especificidad del método, así como también la presencia de otras sustancias que puedan interferir en la medición.

### **9.1 Método de Bradford**

El ensayo de Bradford es un método de determinación de proteínas que consiste en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a proteínas (Bradford, 1976). El tinte existe en tres formas: catiónico (rojo), neutro (verde) y aniónicos (azul) (Compton y Jones 1985). En un medio ácido, el colorante es predominantemente en forma catiónica roja doblemente protonado ( $A_{\max} = 470$  nm). Sin embargo, cuando el colorante se une a la proteína, que se convierte en una forma estable no protonada azul ( $A_{\max} = 595$  nm). Es esta forma de proteína azul de colorante que se detecta a 595 nm en el ensayo utilizando un espectrofotómetro o un lector de microplacas<sup>34,35</sup>. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbancias entre 595 y 465 nm<sup>34</sup>.

### **9.2 Método de Biuret**

La reacción de Biuret es una reacción coloreada (violeta) debida a la formación de un complejo de Cu en un medio alcalino en compuestos que poseen más de un enlace peptídico, como las proteínas<sup>29</sup>.

Tiene muy pocos agentes interferentes (uno de ellos es el sulfato de amonio). Es un método menos sensible que el de Lowry por lo que requiere mayor cantidad de muestra<sup>29</sup>.

### 9.3 Método de Lowry

La cuantificación de proteína con cobre y el reactivo Folin es un método sensible que no requiere digestión previa. Es mucho más sensible y específica que la determinación por absorción en el ultravioleta a 280 nm, así como relativamente sencilla y fácil de adaptar a análisis en pequeña escala. Sin embargo, la cantidad de color producido varía con diferentes proteínas y en algunos casos el color no es estrictamente proporcional a la concentración<sup>29</sup>.

Existen dos pasos que llevan al desarrollo de color en las proteínas, la reacción con cobre en álcali y la reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por el complejo proteína-cobre<sup>29,35</sup>.

## **10. MATERIALES Y METODOS**

### **10.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Esta tesis es de tipo descriptivo ya que se estandarizaron métodos de purificación, así que no se requirió de un análisis estadístico.

### **10.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO**

#### **10.2.1 Líquido hidatídico liofilizado (LHL)**

Líquido hidatídico liofilizado (LHL) colectado a partir de pulmón e hígado de ovinos naturalmente infectados con quistes de *Echinococcus granulosus*, procedentes del camal de diferentes áreas endémicas (Junín, Pasco y Ayacucho) del Perú.

#### **10.2.2 Sueros de la seroteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria.**

Sueros de la seroteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, los cuales pertenecen a pacientes positivos a Hidatidosis por Inmunoblot. Estos sueros serán utilizados para la evaluación mediante Inmunoblot de las proteínas purificadas.



## **10.3 MUESTRA DE ESTUDIO**

### **10.3.1 Líquido hidatídico (LH)**

El líquido hidatídico obtenido de quistes de pulmón e hígado de ovinos sacrificados en el camal, cuyos órganos han sido decomisados por presentar la enfermedad (presencia de quistes) fue liofilizado. Para la evaluación de los 3 métodos de purificación se utilizaron 300 mg del liofilizado, el cual fue resuspendido en 6 ml de Buffer Tris/HCl 0.05M pH 8,0 a una concentración de 50mg/ml. El material resuspendido fue repartido en volúmenes iguales para cada protocolo.

Se debe precisar que en la ejecución de este proyecto NO se sacrificaron animales, se utilizaron las vísceras con quistes hidatídicos decomisados en los camales.

### **10.3.2 Sueros para la evaluación por Inmunoblot de las proteínas purificadas**

Para la evaluación de las proteínas purificadas por los 3 diferentes métodos y se utilizó la técnica de Inmunoblot y se utilizaron sueros de la seroteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria.

#### **10.3.2.1 Sueros positivos a Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica.**

Para realizar la evaluación final por inmunoblot de las proteínas purificadas por los tres protocolos, se hizo una búsqueda de las fichas clínicas de pacientes que fueron diagnosticados positivos a Hidatidosis por inmunoblot en Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria, con esos resultados se realizó una visita al departamento de anatomía patológica de los diferentes establecimientos

de salud: Hospital María Auxiliadora, Hospital Arzobispo Loayza, Hospital Dos de Mayo, Instituto Nacional del Niño y Hospital Rebagliati, con el fin de averiguar si los pacientes habían confirmado la enfermedad mediante intervención quirúrgica.

#### **10.3.2.2 Suero control positivo.**

El suero control positivo es el suero utilizado para el diagnóstico de rutina. Este suero fue seleccionado a partir de su resultado positivo previo para Hidatidosis por Inmunoblot donde presentó una mayor intensidad de las bandas reactivas.

#### **10.3.2.3 Suero control negativo.**

El suero control negativo es el suero utilizado para el diagnóstico de rutina. Este suero pertenece a un suero de persona sana.

#### **10.3.2.4 Sueros de pacientes previamente diagnosticados positivos para hidatidosis.**

Para hacer las evaluaciones previas de las proteínas purificadas. Se utilizaron sueros con resultados positivos previos a Hidatidosis por Inmunoblot.

#### **10.3.2.5 Sueros positivos a otras zoonosis.**

Se utilizaron sueros diagnosticados previamente positivos por Inmunoblot para Cisticercosis, Fasciolosis y positivos por Inmunofluorescencia para Toxoplasmosis. Estos sueros también se encontraron almacenados en la seroteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria.

## **104 MATERIALES**

### **10.4.1 Equipos e instrumentos**

- Balanza de precisión.
- Potenciómetro.
- Refrigeradora.
- Congeladora a -80 °C.
- Agitador magnético
- Sistema de electroforesis vertical.
- Sistema de transferencia húmedo de proteínas.
- Rotador eléctrico.
- Centrifuga refrigerada
- Equipo Ultrafiltrador
- Equipo Electroelutor
- Fuente de poder Universal.
- Micropipetas de 1-10  $\mu\text{L}$ .
- Micropipetas de 10-100  $\mu\text{L}$ .
- Micropipetas de 200-1000  $\mu\text{L}$ .
- Micropipeta multicanal de 50 – 200  $\mu\text{L}$ .

### **10.4.2 Materiales y reactivos**

- Membranas de diálisis MWCO 6-8 kDa
- Membrana de Nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Placas de plástico divididas en compartimentos.
- Placas de vidrio
- Tris/HCl
- NaCl

- HCl
- 2 Mercapto-Etanol.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS).
- Inhibidor de proteasas
- Acrilamida.
- N N' bis-acrilamida.
- Persulfato de Amonio (APS)
- Glicina
- Temed
- Azul de bromofenol.
- Glicerol
- Agua desionizada
- Anticuerpo Anti-IgG humano (molécula total) marcado con peroxidasa.
- Estándar de bajo peso molecular.
- Peróxido de hidrógeno al 30%.
- PBS
- Tween 20.
- Leche.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- Metanol.
- Ácido acético.
- Cromógeno: 3'3' diaminobenzidina (DAB).
- Suero control positivo a Hidatidosis.

- Suero control negativo a Hidatidosis.
- Sueros positivos a Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica.
- Sueros positivos a otras zoonosis.

## **10.5 MÉTODOS**

### **10.5.1 Re suspensión de antígeno liofilizado de *Echinococcus granulosus* con Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0.**

Se resuspendió 300mg de LHL en 6ml de Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0 a una concentración de 50 mg/ml. Se vortexeó y dejó a 4°C. Se repartió el antígeno resuspendido en volúmenes iguales (2ml) para cada protocolo.

### **10.5.2 Protocolo 1: Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación, concentración por ultrafiltración y electroelusión de estas proteínas.**

#### **10.5.2.1 Precipitación con Sulfato de Amonio y Diálisis**

El LHL re suspendido fue sometido a precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación. Se agregó 1.4 gr de sulfato de amonio lentamente a los 2 ml de antígeno resuspendido, posteriormente se realizó agitación constante por una hora a 4°C, luego centrifugado a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se obtuvieron productos de Precipitado y Sobrenadante. El precipitado fue resuspendido con 1ml de Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0 para ser colocados en las membranas de diálisis. Los productos de precipitado y sobrenadante fueron dializados por separado en buffer de Tris/HCl 0,05M pH 8.0 a 4°C con un recambio de buffer cada 3 horas. La eliminación de la sal se corroboró con la prueba de BaCl<sub>2</sub> al 10% en cada recambio de Buffer para observar la eliminación de las sales. El proceso de diálisis fue de 12 horas. Finalmente, se obtuvo el producto de Precipitado Dializado (Pp-D) y Sobrenadante Dializado (S-D). Se alicuotó 20µl de cada producto para ser cuantificado por el método de Bradford y 50 µl para realizar electroforesis SDS-PAGE.

### **10.5.2.2 Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas dializadas**

Las proteínas obtenidas en cada paso de la purificación fueron analizadas por SDS-PAGE (Tsang et. al. 1986) con un gel de empaquetamiento al 4% y en un gel de separación de poliacrilamida al 15%. Las proteínas fueron tratadas con solución de tratamiento (0.125 M Tris –HCl, pH 6,8, conteniendo 5% de SDS y 2% de 2-mercaptoethanol) y sometidas a ebullición por 5 minutos. La electroforesis se realizó a 80v por 10 minutos, luego a 180v por 1 hora y 10 minutos a 30 mA por gel de corrida en un sistema de electroforesis Mini Protean II, Bio-Rad. Se realizó la tinción del gel de poliacrilamida en Azul de Coomassie por 30 minutos y decolorado en solución decolorante por 1 hora con recambio para visualizar las bandas de proteínas y fotografiar el gel.

### **10.5.2.3 Concentración por ultrafiltración de las Proteínas**

Se unieron ambos productos dializados (Pp-D y S-D) y fueron concentrados por ultrafiltración en un sistema cerrado de ultrafiltración (Stirred Ultrafiltration Cell, Millipore Amicon) empleando membrana de Polietersulfona (PES) de 50kDa. La concentración de las proteínas por ultrafiltración se realizó por 4 horas a temperatura ambiente aplicando una presión de gas nitrógeno a 25 psi. Una alícuota de las proteínas concentradas fue analizada por electroforesis SDS-PAGE según el ítem 9.5.2.2 y cuantificada con el método de Bradford.

#### **10.5.2.4 Electroelución de las proteínas 21 y 31 kDa.**

Para la elución de la fracción proteica de interés se utilizó un sistema de electroelución (Equipo electro elutor BIORAD) de la siguiente manera:

1. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE siguiendo el ítem **9.5.2.2**, de las proteínas concentradas en la ultrafiltración.
2. Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con Azul de Coomassie por 30 minutos y decolorado por 1 hora para visualizar la banda de 21 y 31 kDa. Se cortó la banda de gel de poliacrilamida que contiene la fracción de proteínas de 21 y 31 kDa. Este fragmento de gel se cortó en secciones pequeñas de 3 x 3 mm y se colocaron en el sistema de electroelución, en Buffer de elución a 20mA por 3 horas, para eluir las proteínas de 21 y 31 kDa contenidas en el fragmento de gel de poliacrilamida.
3. Se tomó una alícuota de las proteínas eluidas para su cuantificación y evaluación mediante electroforesis SDS-PAGE siguiendo el ítem **9.5.2.2**, y fueron conservadas a -20°C.

#### **10.5.2.5 Concentración al vacío de las proteínas electroeluidas**

Para realizar las pruebas de Inmunoblot las proteínas electroeluidas se concentraron utilizando el equipo concentrador Speed Vacuum. Se colocó el tubo de micro centrifuga con un volumen de 500 µl del buffer de electroelución se redujo a 100 µl en dos horas. Posteriormente se cuantificó la proteína oncentrada con el método de Bradford.



### 10.5.2.6 Tinción con Plata

Después de terminada la corrida electroforética, se procede a teñir el gel con Nitrato de Plata siguiendo el protocolo:

1. Sumergir el gel en Ácido acético 10% por 40 minutos en una placa Petri en agitación a temperatura ambiente.
2. Lavar 3 veces con agua destilada con 2 minutos por cada lavada.
3. Sumergir el gel en nitrato de plata (100mg/100ml de agua ultra pura + 150  $\mu$ l formaldehído) por 40 minutos en una placa Petri en agitación a temperatura ambiente.
4. Lavar rápidamente con agua destilada máximo 10 segundos y eliminar todo resto de agua.
5. Sumergir el gel en Solución de revelada fría (3g carbonato de sodio en 100 ml agua ultra pura + 150  $\mu$ l formaldehído + 1mg de Tiosulfato).
6. Esperar la reacción de revelado, esperar que salgan burbujas y detener la reacción con Ácido acético 10% frío.

### **10.5.3 Protocolo 2: Purificación por separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE y electro elución de la proteína.**

Se tiene 2ml de LHL re suspendido en Buffer Tris/HCl 0,05 M pH 8.0 a una concentración de 50 mg/ml. Los componentes del líquido de quiste hidatídico fueron separados de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE al 15% y luego éstas fueron sometidas a un sistema de electroelución (Equipo electro elutor BIORAD) para la elución de las proteínas de 21 y 31kDa. Las proteínas eluídas fueron concentrada siguiendo el ítem **9.5.2.5**. Se retiró una alícuota de 50µl para su cuantificación y evaluación por electroforesis SDS-PAGE siguiendo el ítem **9.5.2.2**, y la tinción con plata siguiendo el ítem **9.5.2.6** para visualizar la presencia de la fracción proteica de interés y conservadas a -20°C.

### **10.5.4 Protocolo 3: Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación y electroeluidas a partir del gel.**

#### **10.5.4.1 Precipitación con Sulfato de Amonio y Diálisis**

El Líquido de quiste hidatídico liofilizado, re suspendido en Buffer Tris/HCl 0,05M fue sometido a precipitación con sulfato de amonio al 60% de saturación. Se agregó 1.4 gr de sulfato de amonio lentamente a los 2 ml de antígeno resuspendido, posteriormente se sometió a agitación constante por una hora a 4°C, luego centrifugado a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se obtuvo productos de sobrenadante y precipitado. El precipitado fue resuspendido con 1ml de Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0 para ser colocados en las membranas de diálisis. Los productos de precipitado y sobrenadante fueron dializados por separado en buffer de Tris/HCl 0,05M pH 8.0 a 4°C con un recambio de buffer cada 3 horas. La eliminación de la sal se corroboró con la prueba de BaCl<sub>2</sub> al 10% en cada

recambio de Buffer para observar la eliminación de las sales. El proceso de diálisis fue de 12 horas. Finalmente, el producto dializado fue cuantificado por el método de Bradford y evaluado mediante electroforesis SDS-PAGE según ítem 9.5.2.2.

#### **10.5.4.2 Electroelusión de las proteínas 21 y 31 kDa**

Para el aislamiento de las fracciones proteicas de interés (21 y 31 kDa) será utilizado un sistema de electroelusión (Equipo electro elutor BIORAD) de la siguiente manera:

1. Se realizará una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas del líquido hídrico precipitadas.
2. Finalizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida al 15% conteniendo las proteínas será colocado en el sistema de electroelusión, en buffer de elusión a 20mA por 3 horas, para aislar las fracciones proteicas contenidas en el líquido hídrico.
3. Las fracciones proteicas aisladas fueron evaluadas por electroforesis SDS-PAGE siguiendo el ítem 9.5.2.2 y tinción con plata siguiendo el ítem 9.5.2.5 y conservados a -20°C.

#### **10.5.4.3 Concentración al vacío de las proteínas electroeluidas**

Para realizar las pruebas de Inmunoblot las proteínas electroeluidas se concentraron utilizando el equipo concentrador Speed Vacum. Se colocó el tubo de micro centrifuga con un volumen de 500 µl del buffer de electroelusión se redujo a 100 µl en dos horas. Posteriormente se cuantificó la proteína concentrada con el método de Bradford.

### 10.5.5 INMUNOBLOT

La evaluación de la capacidad antigénica de las proteínas purificadas se realizó mediante Inmunoblot. El diagnóstico por Inmunoblot es una técnica que permite observar la reacción de anticuerpos presentes en el suero de los pacientes frente al antígeno, en este caso las proteínas purificadas fijadas en la membrana de nitrocelulosa. Se obtienen resultados positivos cuando se observa precipitación coloreada de las bandas de 21 y 31 kDa que demuestran reacción inmunoenzimática entre el suero del paciente y el antígeno.

Después de la purificación y aislamiento de las proteínas de 21 y 31 kDa del antígeno, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con todas las proteínas purificadas obtenidas en cada método. Luego estas proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente ser evaluadas con los sueros positivos a Equinococosis del crío banco del Laboratorio de Zoonosis Parasitaria descritos en el ítem **9.3.2**. Se siguió el protocolo presente en el Manual de Procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias<sup>3</sup> con algunas modificaciones.

Las proteínas antigénicas son transferidas electroforéticamente del gel hacia la membrana de nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu\text{m}$ , empleando una cámara de transferencia.

### **10.5.5.1 Preparación de la transferencia.**

Para iniciar el proceso de transferencia se realiza una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas purificadas. Finalizada la corrida electroforética se colocó el gel sobre una membrana de nitrocelulosa ambos se sumergidos en un recipiente que contiene buffer de transferencia (Anexo G). A su vez, estos se colocaron entre dos hojas de papel filtro embebido en el mismo buffer. El conjunto de gel, nitrocelulosa y papel filtro, se colocaron entre dos esponjas de 3 mm de espesor, embebidas en el tampón de transferencia de igual manera que el complejo anterior; luego se colocó todo en una pieza de plástico con orificios en ambos lados, asegurándose que el gel quedase frente al cátodo (color negro de la pieza) y la nitrocelulosa frente al ánodo (transparente) formando una especie de sándwich. Seguidamente la pieza se encajó en la cámara de transferencia y se colocó un refrigerante para mantener el buffer frío.

### **10.5.5.2 Electrotransferencia**

Se corrió la electrotransferencia 55V por 1 hora y 30 minutos en una fuente de poder HV de BIO-RAD. El procedimiento de electrotransferencia se realizó para los 3 protocolos.

Al terminar la electrotransferencia, se retiró la membrana de nitrocelulosa y lavó tres veces por cinco minutos cada una, con PBS 0,01M, pH 7,2 conteniendo 0,3% de *Tween* 20 (PBS-T) (Anexo G). Se incubó la membrana por una hora con PBS-*Tween* Leche. Posteriormente se realizó 2 lavadas más con PBS-*Tween* y una lavada más con PBS solo. Se cortó la tira de nitrocelulosa que contiene los patrones de peso molecular y se coloreó con solución de tinta China al 1%.

La membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras de 3mm de forma vertical. Se dejaron secar las tiras a temperatura ambiente por 1 hora y se guardaron a 4°C hasta su uso.

#### **10.5.5.3 Reacción inmunoenzimática**

Para realizar la evaluación con Inmunoblot se emplearon placas de plástico divididas en compartimentos. Se colocaron tiras de nitrocelulosa conteniendo el antígeno hidatídico (evaluando las diferentes concentraciones de antígeno) en los compartimentos de las placas.

Se incubaron las tiras con 10µl de suero en 900µl de PBS-TL (relación 1:100) en cada compartimiento de la placa e se incubó por una hora a temperatura ambiente y en agitación. Se lavaron las tiras cinco veces durante cinco minutos con PBS-T.

Posteriormente se adicionó una solución de anti-IgG humano marcado con peroxidasa diluido a 1:1000 en PBS-TL e incubó por una hora a temperatura ambiente y en agitación. Se lavaron las tiras cinco veces durante cinco minutos cada vez con PBS-T y una vez más con PBS solo.

Se reveló la reacción adicionando una solución reveladora (5 mg de DAB), 10µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) en 10mL de PBS. Luego de visualizar las bandas, se lavaron las tiras varias veces con agua deionizada. Se dejaron secar las tiras a temperatura ambiente y en oscuridad.



Figura 12. Placas de plástico para incubar las tiras de Inmunoblot.

#### 10.5.5.4 Lectura

Consiste en visualizar en las tiras de nitrocelulosa, la presencia o ausencia de bandas de precipitación. Con ayuda del marcador de peso molecular se puede calcular el peso aproximado de las bandas presentes, colocando la tira de peso molecular al lado y a la misma altura de las tiras evaluadas. En este estudio la banda presente correspondería a la banda de proteína purificada de 21- 31 kDa. El criterio de positividad para el diagnóstico de hidatidosis es el reconocimiento de uno o más péptidos antigénicos de Mr entre 21 y 31 kDa por anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente.

## 11. RESULTADOS

### Protocolo 1: Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación, concentración por ultrafiltración y electroelusión.

El LH liofilizado resuspendido fue cuantificado con el método de Bradford, posteriormente fue precipitado con sulfato de amonio al 60% de saturación según el ítem 10.5.2.1, donde se obtuvo un sobrenadante y precipitado. El producto precipitado fue resuspendido con buffer. Se retiró una alícuota de 50 $\mu$ l de cada producto para su cuantificación y evaluación por electroforesis SDS-PAGE.

Se realizó el proceso de diálisis del sobrenadante y precipitado en un tiempo aproximado de 12 horas, con cambios de Buffer cada 3 horas. Se retiró una alícuota de 50 $\mu$ l del producto finalizado el proceso para su cuantificación como se ve en la Tabla 1.



Figura 13. "Chups" de membranas de diálisis conteniendo precipitado y sobrenadante.



Se verificó la eliminación de las sales durante la diálisis con la prueba de BaCl<sub>2</sub>. Se retiró una alícuota del buffer en cada cambio y se realizó la prueba de BaCl<sub>2</sub> al 10%. Se observó que la diálisis fue exitosa ya que en el último cambio (figura 14. Tubo 5) ya no hay se observa la precipitación de las sales en el Buffer.

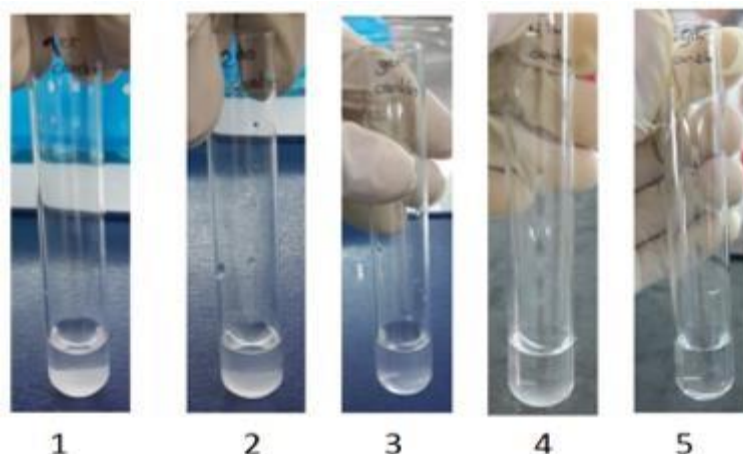


Figura 14. Prueba de BaCl<sub>2</sub> durante el proceso de diálisis. Tubos 1 al 5: 5 cambios de Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0.

Tabla 1. Cuantificación de proteínas del Líquido hidatídico (LH) durante cada proceso de la purificación.

<b>Proceso de purificación</b>	<b>µg/µl</b>
LH Resuspendido	<b>146.03</b>
Sobrenadante +Sulfato de amonio	<b>74.24</b>
Precipitado +Sulfato de amonio	<b>114.56</b>
Sobrenadante Dializado	<b>53.7</b>
Precipitado Dializado	<b>65.9</b>

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas precipitadas con sulfato de amonio (sobrenadante y precipitado) y dializadas (sobrenadante S/D y precipitado P/D) para comparar en el perfil de proteínas la calidad y concentración de la proteína.

Se observó que hay una mayor concentración de proteínas en el precipitado dializado (PD) frente al sobrenadante dializado (figura 15).

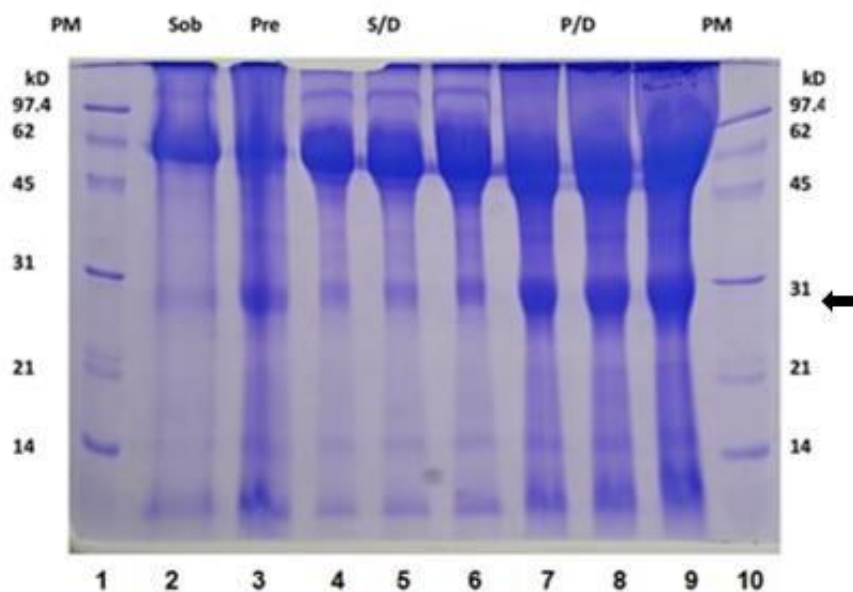


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE de LH: Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular Low range: 3.5 $\mu$ l. Carril 2: Sobrenadante con sulfato de amonio(SS): 74.2 $\mu$ g(2 $\mu$ l). Carril 3: Precipitado con sulfato de amonio(PS): 114.5 $\mu$ g(2 $\mu$ l). Carril 4,5 y 6: Sobrenadante Dializado(SD) 134.25 $\mu$ g(5 $\mu$ l), 161.1 $\mu$ g(6 $\mu$ l) y 214.8 $\mu$ g(8 $\mu$ l). Carril 7,8 y 9: Precipitado Dializado(PD): 164.75 $\mu$ g(5 $\mu$ l), 197.7 $\mu$ g(6 $\mu$ l) y 263.6 $\mu$ g(8 $\mu$ l).

Se realizó el proceso de **concentración de proteínas por ultrafiltración**, se mezclaron los productos dializados de sobrenadante y precipitado haciendo un volumen total de 12.750 ml. El proceso de concentración duró 1 hora, obteniéndose 6ml de proteína concentrada. Posterior a la concentración, las proteínas se cuantificaron y se obtuvo que las proteínas estaban una concentración de 101.19 $\mu$ g/ $\mu$ l.

Para observar la calidad de las proteínas se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas concentradas (Figura 16). Se pudo observar que las proteínas se encontraban concentradas y no se perdió proteínas durante la ultrafiltración.

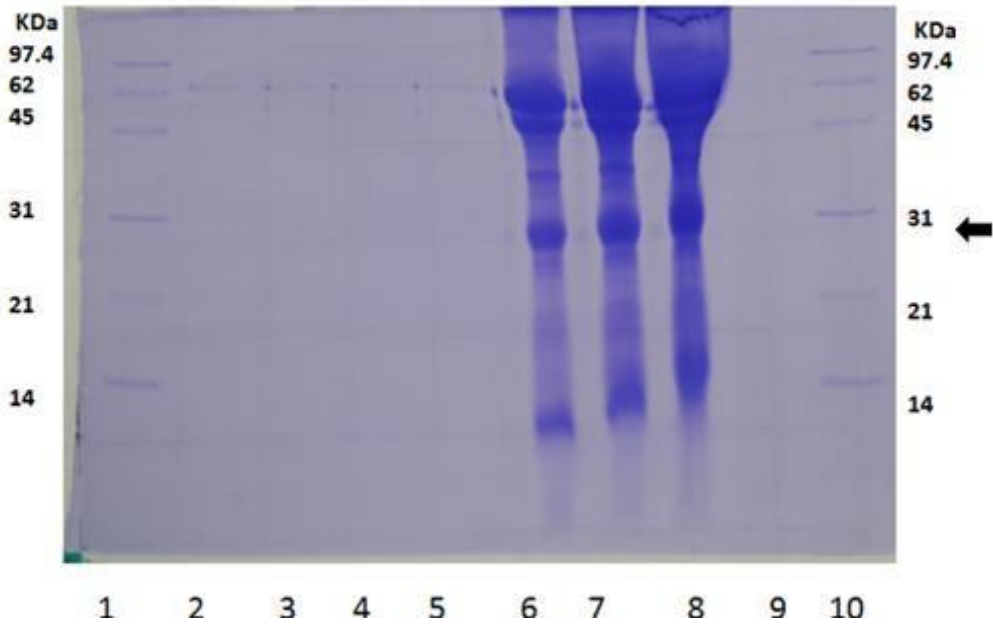


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas Ultrafiltradas: Carriles 1 y 10: Marcador de Peso Molecular Low range: 3 $\mu$ l. Carriles 2,3,4 y 5: Colecta de lo filtrado a los 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas. Carriles 6, 7 y 8: proteína concentrada con la membrana de 50 kDa : 151.78 $\mu$ g(3 $\mu$ l), 252.97 $\mu$ g(5 $\mu$ l) y 354.16 $\mu$ g(7 $\mu$ l). Carril 9: vacío.

Para iniciar el proceso de electroelución, se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas concentradas, utilizando un peine preparativo de un carril (figura17).

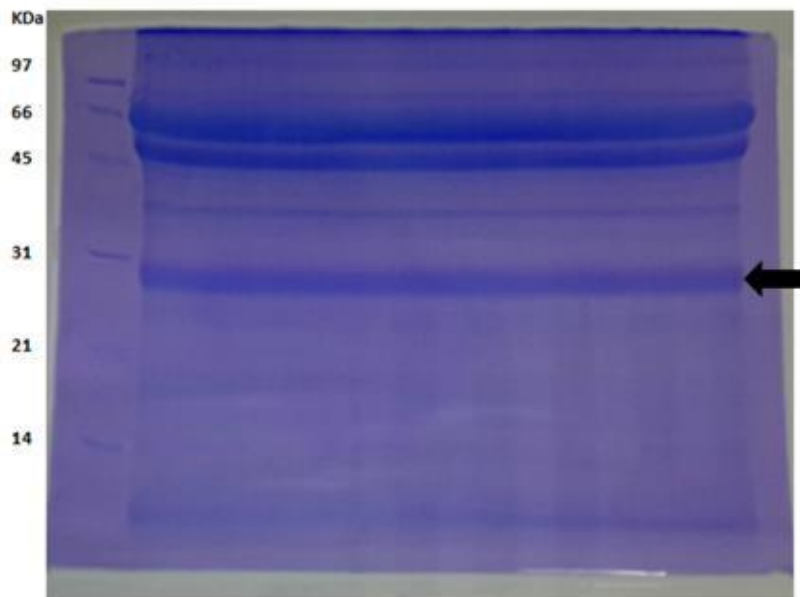


Figura 17. Electroforesis SDS-PAGE proteínas concentradas: Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5  $\mu$ l. Carril 2: Proteínas concentradas: 2023 $\mu$ g(40  $\mu$ l). ← señala la proteína a ser electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa.

La **electroelusión** de la banda 21-31 kDa fue a 20mA en una fuente de poder universal por 3 horas en dos tubos. Se colectó el material eluído en un volumen aproximado de 500  $\mu$ l. Posteriormente se cuantificó la proteína de 21 – 31 kDa eluída, teniendo una concentración de 1.04  $\mu$ g/ $\mu$ l.

Nuevamente se realizó una electroforesis SDS-PAGE para observar la calidad de la proteína electroeluida. Se realizó la tinción correspondiente con Azul de Comassie (figura 18) y con tinción de plata (figura 19), para evidenciar si hubo contaminación con otras proteínas. Finalmente, se observó una banda del peso molecular esperado correspondiente a la proteína electroeluida.



Figura 18. Electroforesis SDS-PAGE. Proteína electroeluida de 21 a 31 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2. Proteína de 21 – 31 kDa: 72.28 $\mu$ g(139 $\mu$ l). ← señala la proteína electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa. tinción con Azul de Comassie.



Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE. Proteína electroeluida de 21 a 31 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2. Proteína de 21 – 31 kDa: 72.28 $\mu$ g(139 $\mu$ l). ← señala la proteína electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa. tinción con plata.

Para realizar la prueba de Inmunoblot la proteína electroeluida se concentró siguiendo el ítem 10.5.2.5. Se volvió a cuantificar las proteínas concentradas obteniéndose 3.88µg/µl.

A continuación, se presenta una tabla resumen de la cuantificación de la concentración de las proteínas que se obtuvo a partir de la resuspensión del antígeno total hasta la proteína electroeluida de 21 – 31 kDa.

Tabla 2. Tabla resumen de la purificación de las proteínas del protocolo 1.

<b>TABLA DE PURIFICACION : PROTOCOLO 1</b>			
<b>Procedimiento o paso</b>		<b>Proteína (µg/µl)</b>	
1	Resuspensión de antígeno total	146.03	
2	Precipitación con sulfato de amonio al 60%	sobrenadante	74.2
		precipitado	114.5
3	Diálisis	sobrenadante	53.7
		precipitado	65.9
4	Concentración por ultrafiltración	101.19	
5	Electroelusión ( proteína de 21 – 31 kDa)	1.04	
6	Concentración proteína electroeluida ( SpeedVac)	3.88	

**PROTOCOLO 2: Purificación por separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE y electro elución de la proteína de 21 a 31 kDa a partir del gel.**

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE del antígeno resuspendido en un peine preparativo (figura 20) para posteriormente cortar la banda de interés de 21- 31 kDa para realizar la electroelusión.

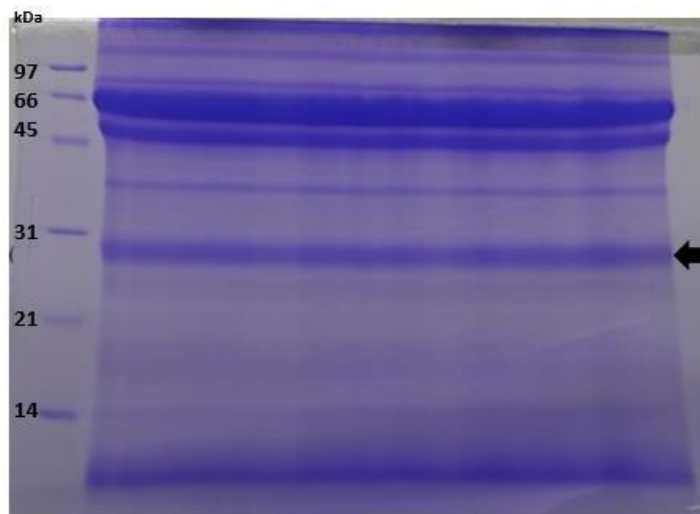


Figura 20. Electroforesis SDS-PAGE de Antígeno Total de Líquido Hídrico resuspendido 50mg /ml. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2: Antígeno 40  $\mu$ l(2920  $\mu$ g). ← señala la proteína a ser electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa.

El **electroelusión** de la banda de 21-31 kDa fue a 20mA en una fuente de poder universal por 3 horas. Se colectó la proteína electroeluida en un volumen aproximado de 500  $\mu$ l. Posterior a la electroelusión la proteína fue cuantificada, obteniéndose 1.01 $\mu$ g/ $\mu$ l.

Para observar la calidad de la proteína electroeluida de 21-31kDa, se realizó una electroforesis SDS-PAGE. Se realizó la tinción correspondiente con Azul de Comassie (figura 21) y con tinción de plata (figura 22). Finalmente, se observó

una banda del peso molecular esperado correspondiente a la proteína electroeluida de 21- 31 kDa en ambos casos.

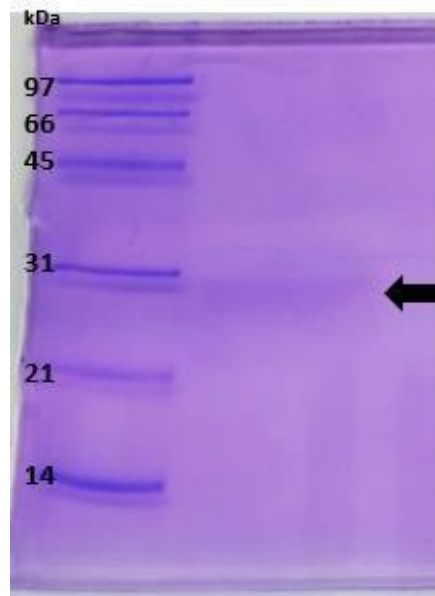


Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE. Proteína electroeluida de 21 a 31 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2: Proteína electro eluída de 21-31kDa:15 $\mu$ g (30 $\mu$ l). ← señala la proteína electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa. Tinción con Azul de Comassie.

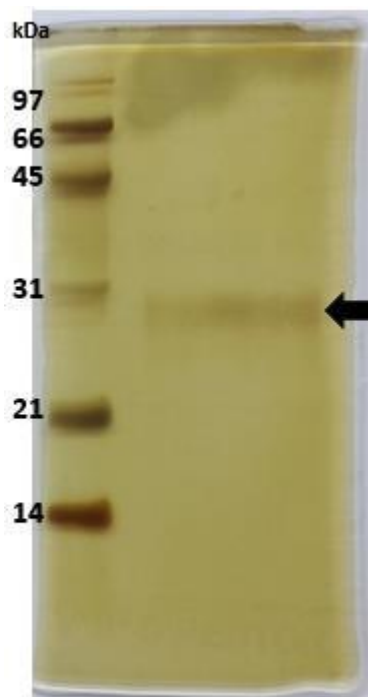


Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE. Proteína electroeluida de 21 a 31 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2: Proteína electro eluída de 21-31kDa:15 $\mu$ g (30 $\mu$ l). ← señala la proteína electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa. Tinción con Plata.



Para realizar las pruebas de Inmunoblot las proteínas electroeluidas se concentraron siguiendo el ítem 10.5.2.5. Se cuantificó la proteína concentrada, obteniéndose 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

A continuación, se muestra una tabla de las concentraciones de la proteína en obtenidas durante cada proceso de este protocolo de purificación.

Tabla 3. Tabla resumen de la purificación de la proteína de 21 – 31 kDa con el protocolo 2.

<b>TABLA DE PURIFICACION : PROTOCOLO 3</b>		
<b>Procedimiento o paso</b>		<b>Proteína (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>
1	Resuspensión de antígeno	146.03
2	Electroelusión (proteína de 21-31kDa)	1.01
3	Concentración de proteína electroeluida (SpeedVac)	4

**Protocolo 3: Purificación por fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio al 60% de saturación y electroeluidas a partir del gel.**

El antígeno resuspendido, se precipito con sulfato de amonio al 60% de saturación obteniéndose productos precipitados y sobrenadante. El producto precipitado fue resuspendido con Buffer Tris/HCl. Se realizó la diálisis del antígeno de los productos precipitados, obteniéndose sobrenadante dializado y precipitado dializado. Se realizó el perfil de proteínas por SDS-PAGE después de haber sido dializado (figura 23). Durante el proceso de diálisis se realizó la prueba de  $BaCl_2$  para confirmar la eliminación de las sales. En la electroforesis posterior a la diálisis se observó que en el precipitado dializado (figura 23) hay una mejor distribución de las bandas de 21-31KDa más claras y definidas.

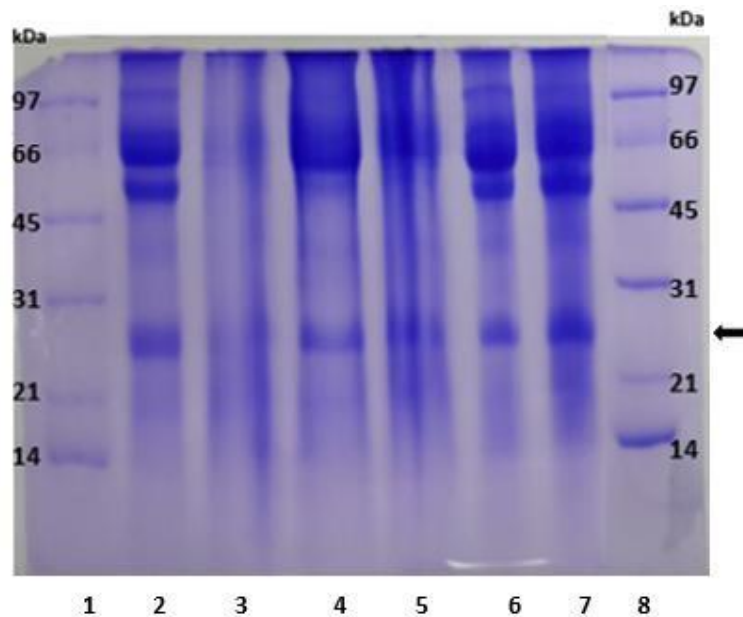


Figura 23. Electroforesis SDS-PAGE de LH: Carril 1 y 8: Marcador de peso molecular Low range: 3.5 $\mu$ l. Carril 2: Antígeno resuspendido(3 $\mu$ l). Carril 3: Antígeno resuspendido + Sulfato (2 $\mu$ l). Carril 4: Sobrenadante con sulfato de amonio (SS): 74.2 $\mu$ g(4 $\mu$ l). Carril 5: Precipitado con sulfato de amonio (PS): 114.5 $\mu$ g(3 $\mu$ l). Carril 6: Sobrenadante Dializado (SD) 134.25 $\mu$ g(5 $\mu$ l).Carril 7: Precipitado Dializado(PD) 197 $\mu$ g (3 $\mu$ l).

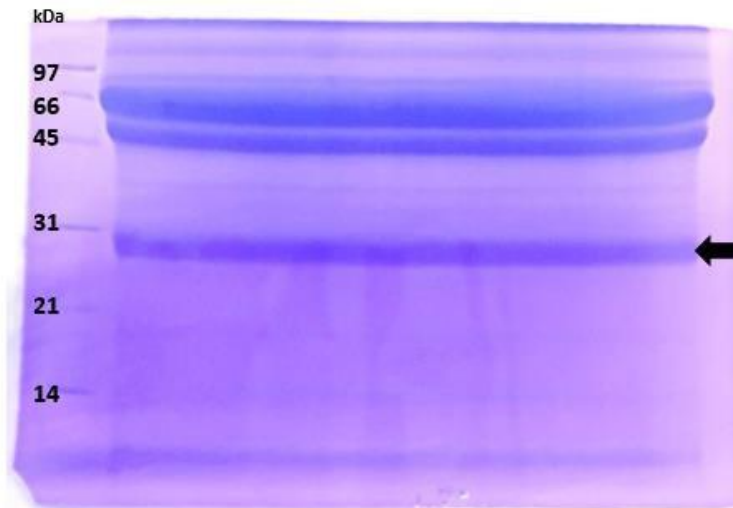


Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE de Antígeno Precipitado dializado (PD). Carril 1 y 5: Marcador de peso molecular Low range: 8 $\mu$ l. Carril 2,3 y 4: Precipitado dializado 2636 $\mu$ g(40 $\mu$ l). ← señala la proteína a ser electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa.

Se realizó la electroforesis SDS- PAGE de Precipitado Dializado (PD) en un gel al 15% con peine preparativo (figura 24) para iniciar el proceso de electroelusión siguiendo los pasos del ítem **10.5.2.2**. Se colectó un volumen aproximado de 500  $\mu$ l de proteína electroeluida. Posterior a la electroelusión de la proteína de 21-31kDa se realizó la cuantificación con el método de Bradford, obteniéndose 1.1 $\mu$ g/ $\mu$ l.

Para observa la calidad de la proteína electroeluida de 21-31kDa, se realizó una electroforesis SDS-PAGE. Se realizó la tinción correspondiente con Azul de Comassie (figura 25) y con tinción de plata (figura 26), para evidenciar si hubo contaminación con otras proteínas. Finalmente, se observó una banda del peso molecular esperado correspondiente a la proteína electroeluida de 21- 31 kDa.

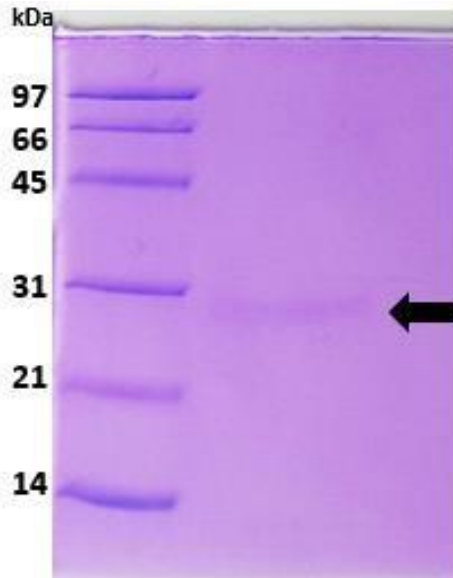


Figura 25. Electroforesis SDS-PAGE. Proteína electroeluida de 21 a 31 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2: Proteína electroeluida de 21-31kDa: 15 $\mu$ g (30 $\mu$ l). ← señala la proteína electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa. Tinción con Azul de Coomassie.

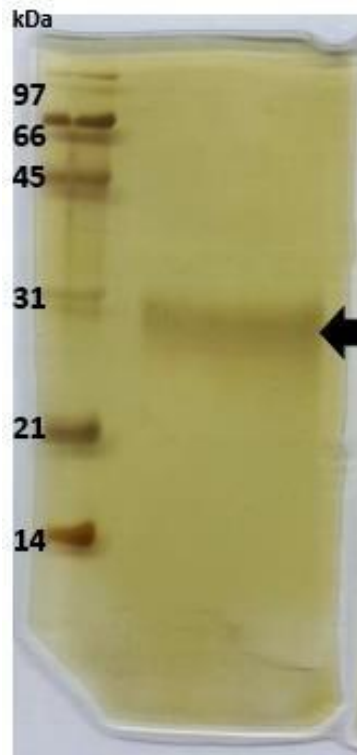


Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE. Proteína electroeluida de 21 a 31 kDa. Carril 1: Marcador de peso molecular Low range: 5 $\mu$ l. Carril 2: Proteína electro eluída de 21-31kDa:15 $\mu$ g (30 $\mu$ l). ← señala la proteína electroeluida, la banda de 21 – 31 kDa. Tinción con Plata.

Para realizar las pruebas de Inmunoblot las proteínas electroeluidas se concentraron siguiendo el ítem 10.5.2.5. Se volvió a cuantificar las proteínas concentradas y se obtuvo 4.5µg/µl.

A continuación, se presenta una tabla resumen de la concentración de proteínas durante el proceso de purificación del protocolo 3.

Tabla 4. Tabla resumen del protocolo de purificación 3.

<b>TABLA DE PURIFICACION : PROTOCOLO 3</b>			
<b>Procedimiento o paso</b>		<b>Proteína (µg/µl)</b>	
1	Resuspensión de antígeno	146.03	
2	Precipitación con sulfato de amonio al 60%	sobrenadante	74.2
		precipitado	114.5
3	Diálisis	sobrenadante	53.7
		precipitado	65.9
4	Electroelusión ( proteína de 21- 31 kDa)	1.1	
5	Concentración proteína electroeluida ( SpeedVac)	4.5	

## **INMUNOBLOT**

Para realizar la evaluación previa de la capacidad antigénica de las proteínas electroeluidas obtenidas con los protocolos 1, 2 y 3 se realizó la evaluación de estas con la técnica de Inmunoblot. Se prepararon tiras de nitrocelulosa a diferentes concentraciones antigénicas y se emplearon 2 sueros con resultado positivo previo a Hidatidosis por Inmunoblot, los cuales mostraban una reacción positiva muy intensa, del Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria. Estos sueros se denominaron Suero A y B.

### **Protocolo 1**

Se realizó la evaluación con la técnica de Inmunoblot, utilizando como fuente de antígeno la proteína concentrada de 21- 31 kDa obtenida con el protocolo 1 que se encuentra a una concentración de 3.8 µg. Se prepararon tiras de nitrocelulosa con 3 concentraciones diferentes de 2.4µg/mm, 4.85µg/mm y 6.46 µg/mm. Se utilizaron los sueros descritos en el ítem 9.3.2.

Se observó que en las tiras de 2.4 µg/mm no hubo una reacción antígeno-anticuerpo. En las tiras de 4.85 µg/mm se observó reacción positiva de gran intensidad en las tiras evaluadas con suero control positivo y sueros A y B. En las tiras de 6.46 µg/mm se observó reacción positiva de gran intensidad en la tira evaluada con suero control positivo y suero B, pero en la tira evaluada con suero A se observó una reacción leve. No hubo reacción positiva en las tiras evaluadas con suero control negativo (figura27).

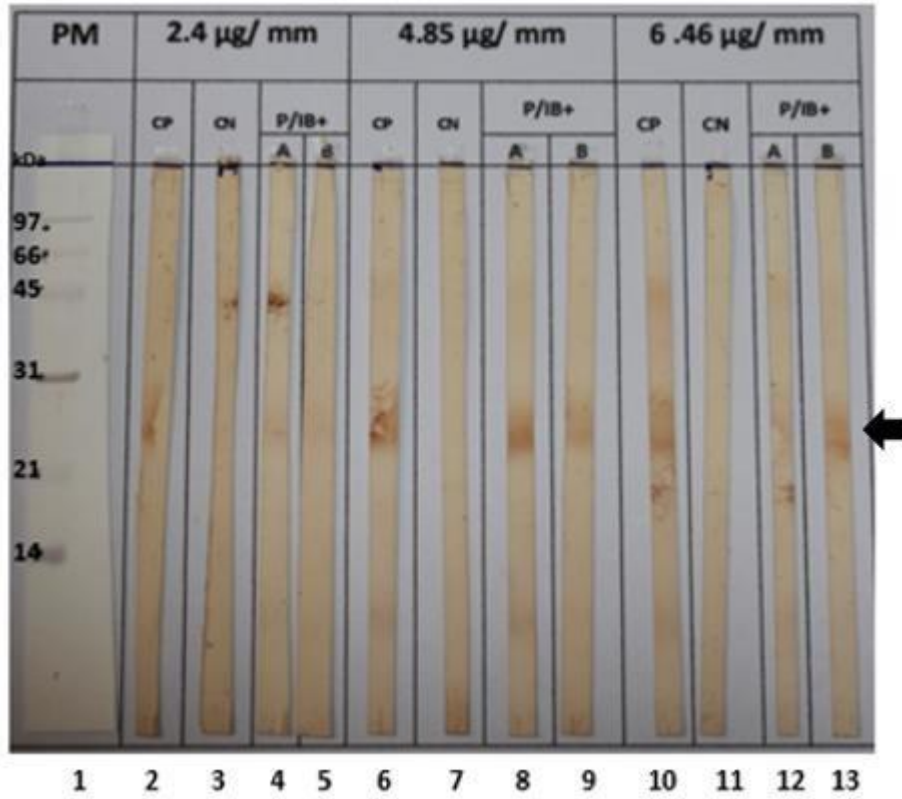


Figura 27. **Inmunoblot del Protocolo 1.** Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2,6 y10: Suero control positivo (CP). Tiras 3,7 y 11: suero control negativo (CN). Tira 4,8 y 12: Suero A (P.A/IB+). Tiras 5,9 y 13: Suero B (P.B/IB+). ← señala la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína de 21 – 31 kDa

## Protocolo 2

Se realizó la evaluación con la técnica de Inmunoblot, utilizando como fuente de antígeno la proteína concentrada de 21- 31 kDa obtenida con el protocolo 2 que se encuentra a una concentración de 4  $\mu\text{g}$ . Se prepararon tiras de nitrocelulosa con 4 concentraciones diferentes de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mm}$ , 4.1 $\mu\text{g}/\text{mm}$ , 5.8  $\mu\text{g}/\text{mm}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{mm}$ . Se utilizaron sueros descritos en el ítem 9.3.2.

Se observó que en las tiras de 2.5  $\mu\text{g}/\text{mm}$  solo se presentó una reacción antígeno-anticuerpo de leve intensidad solo en la tira evaluada con suero control positivo. En las tiras de 4.1  $\mu\text{g}/\text{mm}$  se observó una reacción de leve intensidad en las tiras evaluadas con suero control positivo y sueros A y B. En las tiras de 5.8  $\mu\text{g}/\text{mm}$  la reacción fue mucho más intensa en las tiras evaluadas con suero control positivo y sueros A y B. Finalmente, en las tiras de 10  $\mu\text{g}/\text{mm}$  se observó una reacción de mayor intensidad en las tiras evaluadas con suero control positivo y sueros A y B. No se observó reacción antígeno-anticuerpo en las tiras evaluadas con el suero control negativo en ninguna de las 4 concentraciones (figura 28).



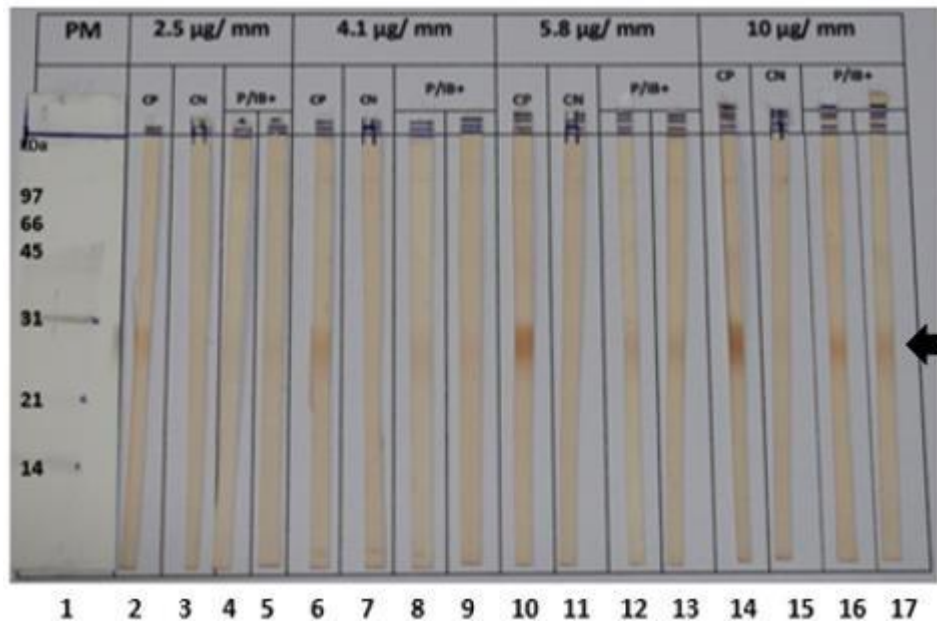


Figura 28 **Inmunoblot del Protocolo 2**. Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2,6,10 y 14: Suero control positivo(CP). Tiras 3,7,11 y 15: suero control negativo(CN). Tira 4,8,12 y 16: Suero A(P.A/IB+). Tiras 5,9,13 y 17: Suero B(P.B/IB+). ← señala la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína de 21 – 31 kDa

### **Protocolo 3**

Se realizó la evaluación con la técnica de Inmunoblot, utilizando como fuente de antígeno la proteína concentrada de 21- 31 kDa obtenida con el protocolo 3 que se encuentra a una concentración de 4.5 µg. Se prepararon tiras de nitrocelulosa con 3 concentraciones diferentes de 2.8µg/mm, 4.1µg/mm y 6.4 µg/mm. Se utilizaron sueros descritos en el ítem 9.3.2.

Se observó que en las tiras de 2.4 µg/mm se presentó una reacción antígeno-anticuerpo de leve intensidad en la tira evaluada con suero control positivo. En las tiras de 4.85 µg/mm y de 6.46 µg/mm se observó una reacción de mayor intensidad en las tiras evaluadas con sueros control positivo mientras que solo hubo una reacción leve con los sueros A y B. No se observó reacción positiva en las tiras evaluadas con el suero control negativo en ninguna de las 3 concentraciones (figura 29).

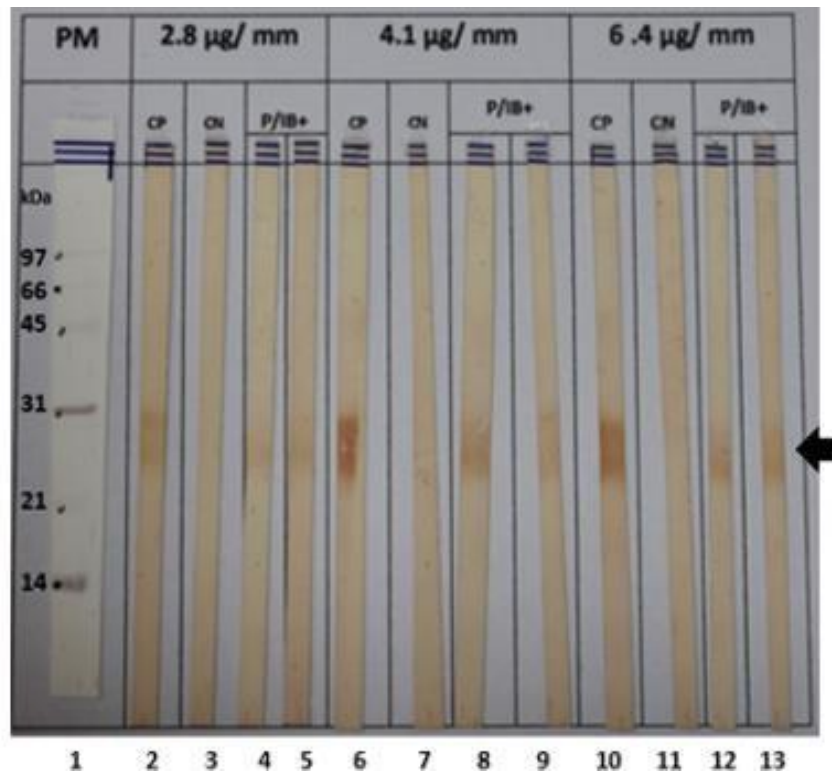


Figura 29. **Inmunoblot del Protocolo 3.** Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2,6 y10: Suero control positivo(CP). Tiras 3,7 y 11: suero control negativo(CN). Tira 4,8 y 12: Suero A(P.A/IB+). Tiras 5,9 y 13: Suero B(P.B/IB+). ← señala la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína de 21 – 31 kDa.

Finalmente se pudo observar que al evaluar las proteínas de 21-31 kDa purificadas con los 3 diferentes protocolos, estas proteínas purificadas mantienen su capacidad antigénica a pesar de los diferentes tratamientos a que fueron sometidos.

## **Evaluación Final de las proteínas purificadas**

De la búsqueda de pacientes con Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica, se obtuvieron 30 sueros de pacientes los cuales además reunieron los criterios de positividad a inmunoblot y características clínicas (tabla 5). Para la evaluación final de las proteínas purificadas, se seleccionaron 5 sueros, los cuales presentaron las 3 bandas reactivas positivas para el diagnóstico de hidatidosis y a la vez mostraron mayor intensidad en la reacción antígeno-anticuerpo (Tabla 6).

Además, se eligieron 4 sueros positivos de cisticercosis, 4 sueros positivos de fasciolosis y 3 sueros positivos de toxoplasmosis, diagnosticados previamente por inmunoblot e Inmunofluorescencia en el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria.

Se realizó la evaluación por Inmunoblot de las tiras de nitrocelulosas producidas a partir de la fracción de proteína de 21- 31 KDa eluída en cada protocolo (figuras 30,31 y 32).

Tabla 5. Tabla de sueros de pacientes confirmados con Hidatidosis por intervención quirúrgica.

	Cod. De muestra	fecha de ingreso	edad	sexo	ubicación/quiste	Procedencia	Bandas	Intensidad
1	INS020019515	3/02/2015	11	M	HIGADO	Hosp. Sabogal	2	medio
2	INS021862915	25/02/2015	35	F	HIGADO	Hosp. Sabogal	3	bajo
3	INS021871715	26/02/2015	37	M	HIGADO	Hosp. Loayza	3	medio
4	INS042697115	20/04/2015	42	F	HIGADO	Hosp. Sabogal	3	bajo
5	INS062385015	15/06/2015	29	F	HIGADO	Hosp. Sabogal	1	bajo
6	INS093984615	22/09/2015	11	M	PULMÓN	Inst. Nacional del niño	3	bajo
7	INS121242315	11/12/2015	21	F	PULMÓN	Hosp. Rebagliati	3	bajo
8	INS122050915	16/12/2015	38	F	PULMÓN	Hosp. Rebagliati	3	bajo
9	INS011323516	12/01/2016	11	M	HIGADO	Hosp. Rebagliati	1	bajo
10	INS021034116	4/02/2016	10	M	HIGADO	Hosp. Rebagliati	3	medio
11	INS024826516	25/02/2016	12	M	PULMÓN	Inst. Nacional del niño	1	medio
12	INS030367816	7/03/2016	10	M	PULMÓN	Inst. Nacional del niño	3	bajo
13	INS053201116	18/05/2016	41	M	HIGADO	Hosp. Dos de Mayo	3	alto
14	INS061279416	14/06/2016	68	F	HIGADO	Hosp. Dos de Mayo	3	bajo
15	INS062686816	15/06/2016	13	M	HIGADO	Inst. Nacional del niño	3	alto
16	INS062318616	17/06/2016	30	M	HIGADO	Hosp. Rebagliati	2	bajo
17	INS065741816	27/06/2016	48	F	HIGADO	Hosp. Rebagliati	3	medio
18	INS065752616	28/06/2016	54	F	HIGADO	Hosp. María auxiliadora	2	bajo
19	INS070897016	7/07/2016	12	F	PULMÓN	Inst. Nacional del niño	1	bajo
20	INS090350516	2/09/2016	9	F	HIGADO	Inst. Nacional del niño	3	medio
21	INS090369116	6/09/2016	5a	F	Pulmón /hígado	Inst. Nacional del niño	3	bajo
22	INS111122316	8/11/2016	12	M	Pulmón /hígado/corazón, riñón	Inst. Nacional del niño	3	alto
23	INS112550816	16/11/2016	44	F	HIGADO	Hosp. Rebagliati	3	medio
24	INS112550916	16/11/2016	79	M	HIGADO	Hosp. Rebagliati	3	bajo
25	INS122516616	21/12/2016	33	F	PULMÓN	Hosp. María auxiliadora	3	alto
26	INS123216616	22/12/2016	25	F	PULMÓN	Hosp. Dos de Mayo	3	alto
27	INS124116616	22/12/2016	5	M	HIGADO	Inst. Nacional del niño	3	alto
28	INS125216616	26/12/2016	48	F	HIGADO	Hosp. Rebagliati	2	medio
29	INS127416616	27/12/2016	52	M	HIGADO	Hosp. Rebagliati	2	medio
30	INS128216616	27/12/2016	43	F	PULMÓN	Hosp. Rebagliati	3	alto

Tabla 6. Sueros seleccionados para la evaluación final con Inmunoblot.

		Cod. De muestra	fecha de ingreso	edad	sexo	ubicación/quiste	Procedencia	Bandas	Intensidad
1	621	INS053201116	18/05/2016	41	M	HIGADO	Hosp. Dos de Mayo	3	alto
2	52	INS062686816	15/06/2016	13	M	HIGADO	Inst. Nacional del niño	3	alto
3	1090	INS111122316	8/11/2016	12	M	Pulmón /hígado/corazón, riñón	Inst. Nacional del niño	3	alto
4	1265	INS122516616	21/12/2016	33	F	PULMÓN	Hosp. María auxiliadora	3	alto
5	126	INS123216616	22/12/2016	25	F	PULMÓN	Hosp. Dos de Mayo	3	alto

Para la evaluación final, se colocó **4µg/mm** de las proteínas de 21-31kDa purificadas en cada tira de nitrocelulosa de cada protocolo. Se observó la reacción inmuno enzimática de las bandas de 21-31kDa de los 3 protocolos.

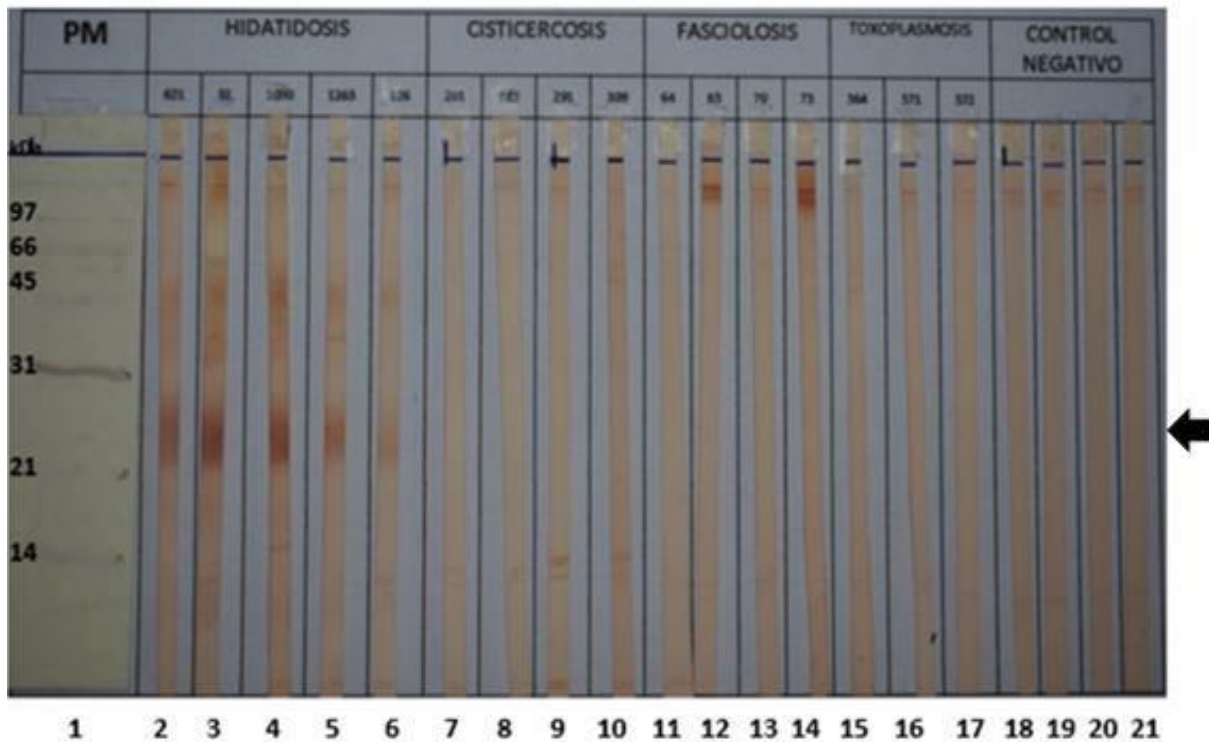


Figura 30. **Inmunoblot del Protocolo 1.** Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2-6: tiras evaluadas con suero de pacientes positivos a Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica. Tiras 7-10: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Cisticercosis, Tiras 11-14: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Fasciolosis. Tiras 15-17: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Toxoplasmosis y Tiras 18-21: sueros control negativo a Hidatidosis. ← señala la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína de 21 – 31 kDa.

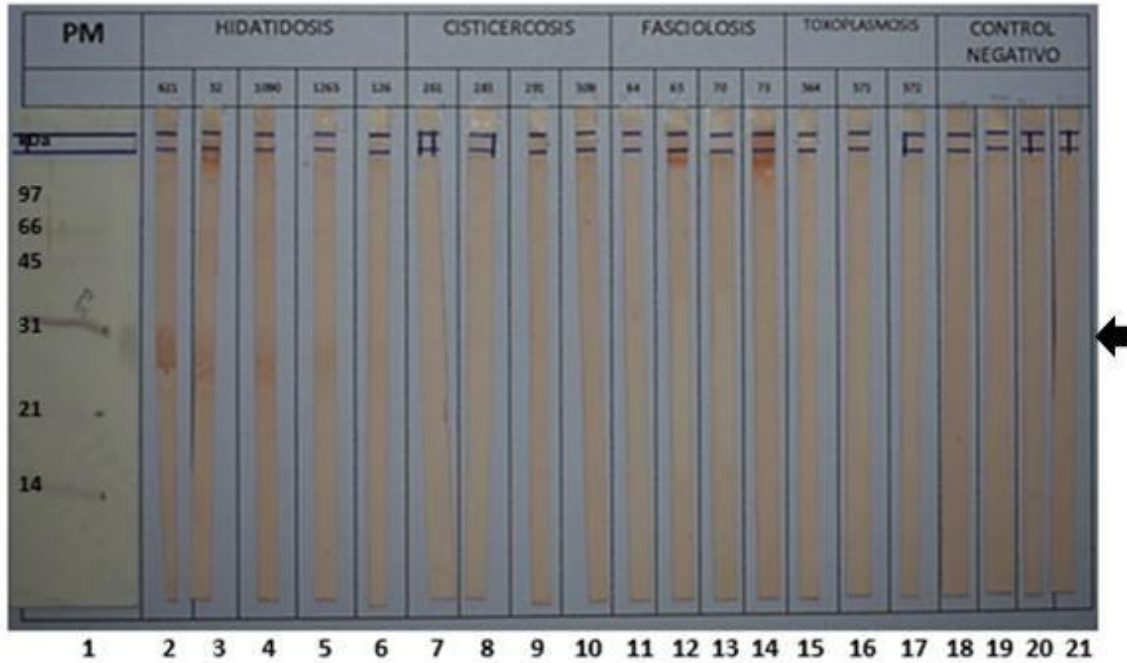


Figura 31. **Inmunoblot del Protocolo 2.** Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2-6: tiras evaluadas con suero de pacientes positivos a Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica. Tiras 7-10: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Cisticercosis, Tiras 11-14: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Fasciolosis. Tiras 15-17: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Toxoplasmosis y Tiras 18-21: sueros control negativo a Hidatidosis. ← señala la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína de 21 – 31 kDa.

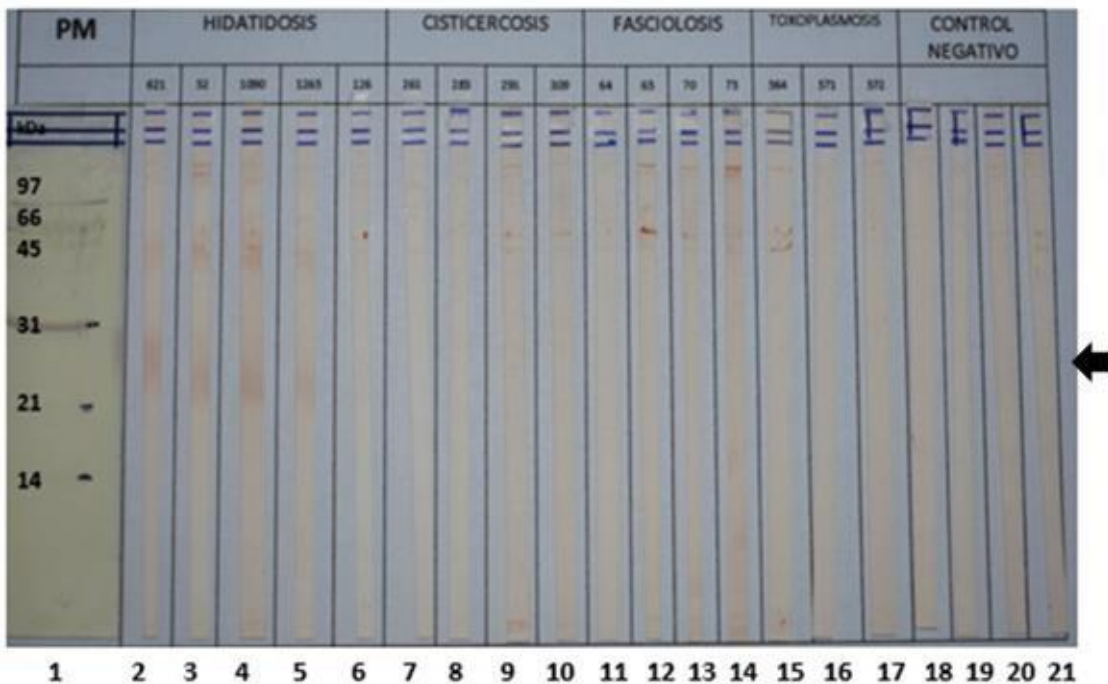


Figura 32. **Inmunoblot del Protocolo 3.** Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2-6: tiras evaluadas con suero de pacientes positivos a Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica. Tiras 7-10: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Cisticercosis, Tiras 11-14: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Fasciolosis. Tiras 15-17: tiras evaluadas con sueros de pacientes positivos de Toxoplasmosis y Tiras 18-21: sueros control negativo a Hidatidosis. ← señala la reacción antígeno-anticuerpo de la proteína de 21 – 31 kDa.



Se observó reacción inmunoenzimática positiva en las tiras evaluadas con los sueros confirmados positivos de Hidatidosis y no con los sueros positivos de las otras zoonosis. Se observó que las proteínas purificadas son específicas para hidatidosis y no presentan reacción cruzada con otras zoonosis. Por otro lado, las tiras evaluadas con suero control negativo no mostraron reacción positiva.

Se observó una reacción antígeno-anticuerpo más intensa en las tiras evaluadas con sueros confirmados positivos de Hidatidosis en el protocolo 1 a diferencia del protocolo 2 y 3, donde la reacción fue menos intensa (figura 33).

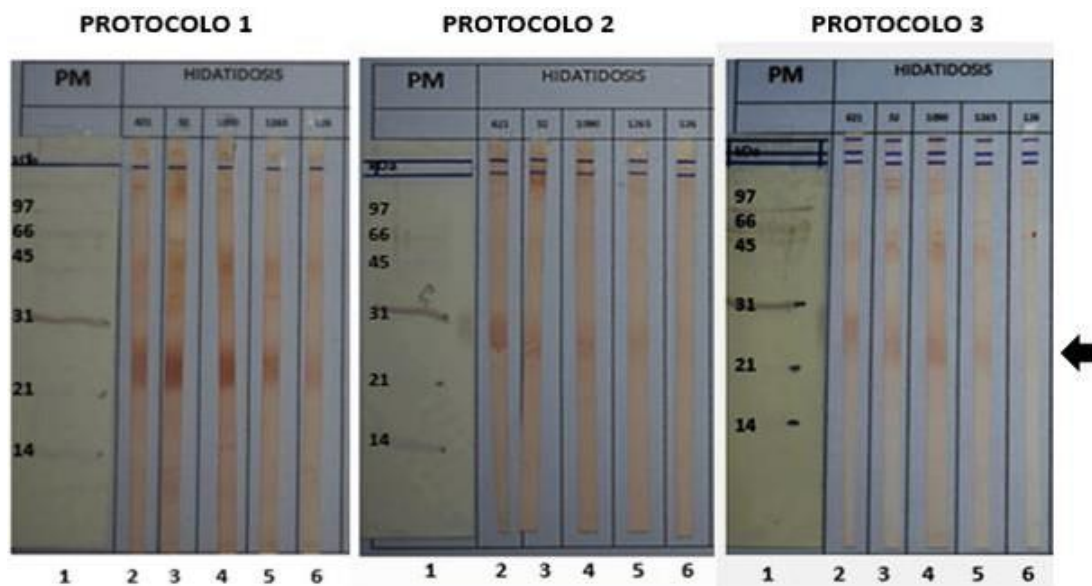


Figura 33. **Comparación de los resultados de la evaluación final por Inmunoblot de los 3 protocolos.** Tira 1: Marcador de peso molecular Low range. Tiras 2-6: tiras evaluadas con suero de pacientes positivos a Hidatidosis confirmados por intervención quirúrgica

## 12. DISCUSIÓN

El Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria realiza su diagnóstico rutinario para Hidatidosis mediante la técnica de Inmunoblot donde toma como criterio de positividad la reacción antígeno-anticuerpo de la fracción antigénica de 21 a 31 kDa, ya que esta fracción es detectada como específica para el diagnóstico de la hidatidosis humana como lo menciona Sánchez E<sup>36</sup> en su tesis de maestría. Sin embargo, con el transcurso de los años y de la aplicación de las vacunas a los animales, la disponibilidad de obtener antígeno total es cada vez es más escasa. Bajo este contexto, resulta necesario aislar y purificar las proteínas de 21-31 kDa presentes en el líquido hidatídico para posteriormente obtener su secuencia de aminoácidos con la finalidad de generar proteínas recombinantes como alternativa más específica para la detección de la enfermedad mediante la producción de nuevos kits de diagnóstico.

Sánchez E<sup>9</sup> purificó parcialmente las proteínas de 21- 31 kDa mediante la precipitación con sulfato de amonio al 60%, ultrafiltración y electroelución más no evaluó la proteína purificada con la técnica de Inmunoblot. Técnica que fue incluida en este trabajo para evaluar la capacidad antigénica de la proteína después de su aislamiento y purificación obteniéndose resultados positivos.

La resuspensión del antígeno de líquido hidatídico liofilizado en este trabajo se realizó con Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0 tomando como referencia el Manual para el diagnóstico de las zoonosis parastarias<sup>2</sup>. También puede ser resuspendido en Buffer Glicina pH 8,2 como lo menciona Miranda E<sup>37</sup>. Sin embargo, se prefirió utilizar el Buffer Tris/HCl 0,05M pH 8,0, ya que el Buffer

Glicina pH 8,2 es más utilizado para pruebas de látex posteriores a la resuspensión.

Se realizó la precipitación con Sulfato de amonio al 60% de saturación, siguiendo los estudios previos realizados en el Laboratorio de Referencia Nacional de Zoonosis Parasitaria donde se evaluaron diferentes concentraciones de Sulfato de amonio, observándose que al 60% de saturación se obtuvieron mejores resultados (Elizabeth Sánchez: Comunicación personal).

Durante la precipitación con sulfato de amonio al 60% y la diálisis en el protocolo 1, se encontró que las proteínas de 21-31 kDa estaban en la misma proporción en el sobrenadante dializado y en el precipitado dializado (figura 15). Por lo que se juntaron ambos productos para recuperar una mayor concentración de la proteína de interés concentrándolas por ultrafiltración.

Con el proceso de concentración por ultrafiltración, se concentraron las proteínas diluidas en la diálisis a un volumen final de 6ml. Se realizó la cuantificación de las proteínas obteniéndose una concentración de 101.19 $\mu$ g/ $\mu$ l. Posteriormente, se realizó el análisis de la proteína concentrada por electroforesis SDS-PAGE para observar la calidad de la proteína (figura 16). Se observó que la concentración por ultrafiltración es buen método para concentrar las proteínas y además permite eliminar las sales sin diluir la muestra a diferencia de la diálisis.

Para realizar el proceso de electroelución, la banda de gel de poliacrilamida que contiene la proteína de 21-31kDa fue extraída y cortada en trozos pequeños de 3mm para los tres protocolos. Se observó que no hay ninguna alteración en la estructura de la proteína cuando el gel, a pesar de ser cortado en pedazos muy pequeños, fue evaluada por electroforesis SDS-PAGE observándose a la proteína de 21-31kDa integra (figuras 18,21 y 25).

Después del proceso de la electroelución en los 3 protocolos fue necesario concentrar las proteínas electroeluidas para poder realizar las evaluaciones con la técnica de inmunoblot. Para ello se utilizó un concentrador de muestras al vacío lográndose que las proteínas electroeluidas aumentaran su concentración 4 veces.

Se logró recuperar mayor concentración de proteínas purificadas en el protocolo 3 donde se obtuvo 4.5 µg, seguido del protocolo 2 donde se obtuvo 4 µg y por último en el protocolo 1, se obtuvo 3.8 µg. Sin embargo, esto no quiere decir que la proteína recuperada sea mejor en el protocolo 3 o 2, ya que en las pruebas de inmunoblot se observó cómo estas proteínas purificadas obtenidas con ambos métodos van perdiendo su estabilidad conforme pasa el tiempo de obtención a diferencia de las proteínas purificadas obtenidas con el protocolo 1.

Cuando se evaluaron las proteínas del protocolo 2 por inmunoblot no se obtuvo ningún tipo de reacción. Se realizaron evaluaciones de la proteína electroeluida mediante electroforesis SDS-PAGE y se observó que la proteína estaba degradada, probablemente esto se debió a que la proteína del protocolo 2 tenía

18 meses de electroeluida, por lo que se tuvo que volver a electroeluir más proteínas de 21-31 kDa para repetir la evaluación aumentando una concentración más en las tiras a ser utilizadas en el Inmunoblot para asegurar que haya reacción antígeno-anticuerpo (figura 28).

La pérdida de la estabilidad de las proteínas podría deberse a las proteasas presentes<sup>38</sup> en el medio donde están obtenidas las proteínas del protocolo 2 ya que a diferencia de los protocolos 1 y 3, donde las proteasas presentes fueron precipitadas durante el proceso de precipitación con sulfato de amonio, en este protocolo no se hizo la precipitación con sal. Este puede ser el motivo por el cual se observó que las proteínas electroeluidas siguiendo el protocolo 1 son más estables y no pierden su capacidad antigénica comparada con las proteínas electroeluidas del protocolo 2, ya que se observó reacción positiva en el Inmunoblot del protocolo 1 a pesar de tener el mismo tiempo (18 meses) de electroeluidas (figura 27). Hubiera sido recomendable utilizar un inhibidor de proteasas en el paso de la resuspensión del antígeno del protocolo 2 para evitar la degradación de las proteínas por las proteasas.

En la evaluación previa por inmunoblot de las proteínas purificadas mediante el protocolo 3, se observó reacción positiva en las tiras evaluadas, esto quiere decir que la proteína aún conserva su función antigénica. En este protocolo se aplicó también la precipitación con sulfato de amonio por lo que se podría considerar nuevamente que las proteasas endógenas fueron precipitadas también ya que la proteína electroeluida no se degradó. Sin embargo, la diferencia entre el protocolo 1 y 3 es el paso de concentración de proteínas por ultrafiltración.

Después de evaluar previamente diferentes concentraciones de proteínas en la prueba de Inmunoblot, se eligió la concentración de 4 µg/mm para la producción de tiras de nitrocelulosa para la evaluación final por Inmunoblot por ser una concentración adecuada y suficiente para observar la reacción antígeno-anticuerpo en los tres protocolos, ya que a mayores concentraciones de proteína también fue posible observar la reacción pero no se utilizó mayor cantidad para mantener una cantidad proteína purificada de respaldo.

En una evaluación por Inmunoblot para Hidatidosis con antígeno total de bovino y caprino, Miranda E<sup>8</sup> determinó que la concentración ideal de proteínas para las tiras de nitrocelulosa fue de 2.3µg/mm, con esa concentración pudo observar bandas bien nítidas. También observó reacciones cruzadas con sueros de otras zoonosis (cisticercosis, fasciolosis y toxoplasmosis) al evaluar el antígeno total de ovino, el autor señaló que estas reacciones se deben a que existen proteínas diferentes con los mismos determinantes antigénicos entre estas zoonosis.

En esta tesis se agregó más concentración de la proteína purificada a las tiras de nitrocelulosa a diferencia del trabajo antes mencionado ya que se observó que la proteína purificada es específica para Hidatidosis y al colocar esa concentración o incluso mayores concentraciones no se observan reacciones cruzadas con sueros de otras zoonosis.

En la evaluación final por inmunoblot se observó reacción antígeno-anticuerpo positiva en las tiras evaluadas con los sueros confirmados positivos de Hidatidosis en los 3 protocolos. Se observó que las proteínas purificadas son

específicas para hidatidosis y no presentan reacción cruzada con otras zoonosis tal como se esperaba. También se observó una mayor reacción de antígeno-anticuerpo de las bandas de 21-31 kDa en el protocolo 1 a diferencia de los protocolos 2 y 3, debido a que estas proteínas tuvieron un tratamiento con sulfato de amonio y además fueron concentradas por ultrafiltración eliminando por segunda vez algunos restos de sales, conservando mejor a las proteínas evitando así la degradación por cambios de pH o temperatura.

El antígeno B posee subunidades de 8 kDa, de las cuales en una reacción por Inmunoblot reaccionan las bandas de 8,16,24 kDa como lo muestra Pagnozi D<sup>17</sup>. La proteína purificada de 21- 31 kDa se encuentra en ese rango de proteínas y es posible que se trate de una proteína formada por las subunidades del Antígeno B.

Se observó que la proteína de 21 a 31 kDa al ser aislada del complejo de proteínas presente en el líquido hidatídico y purificada aún conserva su característica antigénica y puede captar los anticuerpos en una evaluación por Inmunoblot. Esto es importante ya que como menciona Jeyathilakan N<sup>16</sup>, el antígeno total crudo del líquido hidatídico presenta muchas reacciones cruzadas con otras infecciones helmínticas. Por lo tanto, recomienda purificar los componentes como el antígeno B y el antígeno 5, los cuales son componentes más relevantes del LH para fines de diagnóstico. Al tener purificada esta fracción de proteínas de 21 a 31 kDa se pudo evitar este tipo de reacciones cruzadas como se observó en los resultados de este trabajo.

Finalmente, las proteínas electroeluidas del protocolo 1 mostraron mejor resultado en la evaluación final por Inmunoblot, ya que se observó una reacción antígeno-anticuerpo específica con una banda de alta intensidad, además este protocolo provee más estabilidad a las proteínas electroeluidas a diferencias de los otros protocolos. Del mismo modo no se observaron reacciones cruzadas con sueros de otras zoonosis.



### 13. CONCLUSIONES

- La evaluación de los tres protocolos de purificación desarrollados en este estudio nos lleva a concluir que el protocolo 1 fue el más eficiente y adecuado para fines de purificación de la fracción antigénica de 21 a 31 kDa de *Echinococcus granulosus*.
- Se demostró que la fracción antigénica de 21 a 31 kDa conserva su capacidad antigénica después de ser aislada y purificada reaccionando positivamente a las evaluaciones por Inmunoblot y no mostrando reacciones cruzadas con otras zoonosis.
- Las proteínas electroeluidas deben ser concentradas al final del proceso para realizar posteriores evaluaciones.
- Es necesario concentrar las muestras por ultrafiltración ya que con este paso se concentran las proteínas y se reducen efectos externos que puedan alterar su estructura.

## 14. RECOMENDACIONES

- Para obtener mejores resultados en la purificación de la proteína se recomienda usar un inhibidor de proteasas durante la resuspensión del antígeno.
- Se recomienda realizar correctamente los lavados o aumentar el número de lavados necesarios para eliminar todos los residuos de sueros y/o anticuerpos durante la incubación y así evitar las reacciones inespecíficas.
- Se recomienda realizar una evaluación comparativa entre el Inmunoblot con el antígeno total y el Inmunoblot con la proteína purificada para evaluar su capacidad de diagnóstico rutinario para Hidatidosis.
- Se recomienda que la proteína de fracción de 21 a 31 kDa purificada, pueda ser secuenciada con objetivo final de producir proteínas recombinantes.

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moro, P., & Schantz, P. M. (2009). Echinococcosis: a review. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(2), 125–133.
2. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. (2010). Manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias. Serie de Normas Técnicas N.º32. 2.ª Edición;37-45
3. Acha, P. & Szyfres, B. (2003). Zoonosis y Enfermedades Transmisibles al Hombre y a los Animales. Tercera Edición. Publicación Científica No 503(2), 734-751.
4. Moro, P. L., Caveró, C. A., Tambini, M., Briceño, Y., Jiménez, R., & Cabrera, L. (2008). Identification of risk factors for cystic echinococcosis in a peri-urban population of Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(1), 75–78.
5. Organización Mundial de la Salud. (2018). Equinococosis. Nota descriptiva N°377.
6. Díaz, Á. (2017). Immunology of cystic echinococcosis (hydatid disease). *British Medical Bulletin*,
7. Sánchez, E., Cáceres, O. Náquira, C., García, D., Patiño, G., Herrera, S., Volotão, A., Fernandes, O. (2010). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* from Peru by sequencing of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit 1 gene. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 105(6): 806-810.

8. Miranda, E., Velarde, F., Somocurcio, J., Ayala, E. (2010). Evaluación de dos pruebas de Inmunoblot con antígeno hidatídico de caprino y ovino para el diagnóstico de equinococosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*; 27(2): 209-14.
9. Sánchez, E. Cáceres, O. Náquira, C. (2004). Aislamiento y purificación de una fracción antigénica de 21 a 31 kDa de líquido de quiste hidatídico de *Echinococcus granulosus*. *Serie Informes Técnicos N°22*.
10. Flores, A., & Rodriguez, P. (2006). Estandarización de la prueba de elisa para el inmunodiagnóstico de hidatidosis humana empleando antígenos de producción local. *Gaceta Médica*.
11. Shepherd, J., & McManus, D. (1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Volume 25, Issue 2, 143-154.
12. Fadwa, M., & Knobloch, J. (1989). Isolation and partial characterization of species-specific and crossreactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37; 101-108.
13. Aziz, A., Zhang, W., Li, J., Loukas, A., McManus, D. P., & Mulvenna, J. (2011). Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *Journal of Proteomics*, 74(9), 1560–1572.
14. Cui, S., Xu, L., Zhang, T., Xu, M., Yao, J., Fang, C., . . . Liu, F. (2013). Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host–parasite interactions. *Journal of Proteomics*, 84, 158–175.

15. Zheng, H., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, Z., Li, J., Lu, G., Wang, S. (2013). The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nature Genetics*, 45(10), 1168–1175.
16. Jeyathilakan, N., Abdul Basith, S., Lalitha John, Daniel Joy Chandran, N., Dhinakar Raj, G., & Richard Churchill, R. (2014). Evaluation of native 8kDa antigen based three immunoassays for diagnosis of cystic echinococcosis in sheep. *Small Ruminant Research*, 116(2-3), 199–205.
17. Pagnozzi, D., Biosa, G., Addis, M. F., Mastrandrea, S., Masala, G., & Uzzau, S. (2014). An Easy and Efficient Method for Native and Immunoreactive *Echinococcus granulosus* Antigen 5 Enrichment from Hydatid Cyst Fluid. *PLoS ONE*, 9(8).
18. Debarba, J. A., Monteiro, K. M., Moura, H., Barr, J. R., Ferreira, H. B., & Zaha, A. (2015). Identification of Newly Synthesized Proteins by *Echinococcus granulosus* Protoscoleces upon Induction of Strobilation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9).
19. Silva-Álvarez, V., Folle, A. M., Ramos, A. L., Kitano, E. S., Iwai, L. K., Corraliza, I., . . . Ferreira, A. M. (2016). *Echinococcus granulosus* Antigen B binds to monocytes and macrophages modulating cell response to inflammation. *Parasites & Vectors*, 9(1).
20. Thompson, R. (2017). *Biology and Systematics of Echinococcus*. *Echinococcus and Echinococcosis*, Part A, 65–109.
21. Agudelo Higueta, N. I., Brunetti, E., & McCloskey, C. (2015). Cystic Echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 518–523.

22. Cucher, M. A., Macchiaroli, N., Baldi, G., Camicia, F., Prada, L., Maldonado, L., . . . Kamenetzky, L. (2015). Cystic echinococcosis in South America: systematic review of species and genotypes of *Echinococcus granulosus* sensu lato in humans and natural domestic hosts. *Tropical Medicine & International Health*, 21(2), 166–175.
23. Deplazes, P., Rinaldi, L., Alvarez Rojas, C., Torgerson, P., Harandi, M., Romig, T., Jenkins, E. (2017). Global Distribution of Alveolar and Cystic Echinococcosis. *Echinococcus and Echinococcosis, Part A*, 315–493.
24. Guerra, L., & Ramírez, M. (2015). Hidatidosis humana en el Perú. *Apuntes de Ciencia & Sociedad*, 05(01).
25. Sánchez, E. Cáceres, O. Náquira, C., Miranda, E., Samudio, F., Fernandes, O. (2012). *Echinococcus granulosus* genotypes circulating in alpacas (*Lama pacos*) and pigs *sus scrofa* from endemic region in Peru. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 107(2): 275-278,
26. Carmena, D., Benito, A. Eraso, E. (2007). Avances recientes en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*;25(4):263-9.
27. Silva-Álvarez, V., Franchini, G. R., Pórfido, J. L., Kennedy, M. W., Ferreira, A. M., & Córscico, B. (2015). Lipid-Free Antigen B Subunits from *Echinococcus granulosus*: Oligomerization, Ligand Binding, and Membrane Interaction Properties. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3).
28. Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. (2008). *Bioquímica* (6ª ed.). Barcelona, España: Reverté. Pp 68-70.

29. Deutscher, M. (1997). Guide to Protein Purification. Academic Press.
30. Gutierrez, M. Burdó, A., Cegarra, J. (2009). La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. Boletín Intexter N°. 135.
31. García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Universo Diagnostico;1(2):31-41.
32. Ministerio de Salud. (2003). Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de normas técnicas N° 38.
33. Dunn, M. (2010). Electroelution of proteins from polyacrylamide gels. Methods in Molecular Biology, vol. 244: Protein Purification Protocols: Second Edition; 77-80.
34. Fanger, B. (1987). Adaptation of the Bradford Protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. Analytical Biochemistry; 162,11-16.
35. García, H. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. Biotecnología (3ª Edición)
36. Sánchez, E. (1995) Determinação de antígenos relevantes da forma larvar do *Echinococcus granulosus*. Padronização e aplicação do Immunoblot no diagnostico da hidatidose humana. Tese de Mestre. Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ.
37. Miranda, E., Sánchez, E., Náquira, C., Somocursio, J., Ayala, E., Miranda, M. (2009). Evaluación de una prueba de aglutinación de látex para el diagnóstico serológico de la equinococosis quística. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública; 26(2): 198-202.

38. Dos Santos, G., Monteiro, K., Da Silva, E., Battistella, M., Ferreira, H., Zaha, A. (2016). Excretory/secretory products in the *Echinococcus granulosus* metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite?. *International Journal for Parasitology*: 46,843-856.



## 16. ANEXOS

### ANEXO A

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE (Fuente: Manual de Procedimientos para el diagnóstico serológico de zoonosis parasitarias. - MINSA)

##### A.1. Tampón Tris/HCl 0,05M, pH 8,0

Tris 0,6 g.  
NaCl 0,6 g.  
Ajustar pH 8,0 con HCl concentrado.  
Agua desionizada c.s.p 100 mL.

##### A.2 Solución de tratamiento de muestra

Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8 ó pH 8,0) 950 µL.  
2 Mercapto-Etanol 50 µL.  
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 20 mg.  
Diluir la muestra con la solución de tratamiento (V/V) y hervir por cinco minutos. Adicionar solución marcadora de corrida.

##### A.3 Solución colorante marcador de corrida

Azul de bromofenol 50 mg.  
Glicerol 8 mL.  
Tris/HCl 0,5 M pH 8,0 1 mL.  
Agua desionizada 1 mL.  
Usar: 1 µL por cada 30µL de muestra.

##### A.4 Solución *stock* de poliacrilamida (30%T / 2,7%C)

Acrilamida 14,6 g.  
N N' bis-acrilamida 0,4 g.  
Agua desionizada c.s.p 50 mL.  
Pesar los reactivos en tubo de plástico. Disolver con agua caliente ( $\pm$  20 mL), esperar hasta que se enfríe y completar el volumen. Conservar a 4 °C.

##### A.5 Tampón de gel de enpaquetamiento 0,5 M, pH 6,8

Tris 0,5 M 6 g.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.

##### A.6 Tampón de gel de separación o de corrida 1,5 M pH 8,8

Tris 1,5 M 18,15 g.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.

##### A.7 Solución de persulfato de amonio (APS) al 10%

Persulfato de amonio 10 g.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.  
Alicuotar y conservar a -20 °C.

### A.8 Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

SDS 10 g.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.  
Conservar a 4 °C o a temperatura ambiente.

### A.9 Tampón de corrida (superior/inferior)

Tris 0,025 M 3 g.  
Glicina 0,192 M 14,4 g.  
SDS al 10% 10 mL.  
Agua desionizada 1000 mL.

### A.10 Solución colorante Coomassie

#### Solución stock 1%:

Coomassie Blue R 250 1 g.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.  
Disolver y filtrar en papel Watman N°1.

#### Colorante para uso:

Solución stock 1% 12,5 mL.  
Metanol 50 mL.  
Ácido acético 10 mL.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.

### A.11 Solución decolorante

Metanol 5 mL.  
Ácido acético 7 mL.  
Agua desionizada c.s.p. 100 mL.

**Tabla A 1:** Fórmula de concentración de gel de empaquetamiento y de separación o de corrida al 4,12 y 15 %.

Componentes	Gel de empaquetamiento y de separación		
	4 %	12%	15%
Solución stock	1,33 mL	4,8 mL	6,0 mL
Tampón de gel inferior o de separación	-	3,6 mL	4,5 mL
Tampón de gel superior o de empaquetamiento	2,5 mL	-	-
SDS 10%	100 µL	120 µL	120 µL
Agua desionizada	6,1 mL	3,6 mL	1,5 mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%	50 µL	60 µL	60 µL
Temed	5 µL	4 µL	4 µL

## ANEXO B

### Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 15%

#### Procedimiento:

Para la etapa de separación de proteínas, se procedió a preparar el gel de separación para modelo Mini Protean II, BIO RAD. Se utilizaron 2 placas de vidrio de 73 mm de alto por 102 mm de ancho x 1 mm de espesor y dos espaciadores de plástico de 1 mm de espesor. Las placas se ensamblaron empleando separadores y se fijaron a un soporte.

Se preparó el gel de separación a concentración de 15% y con ayuda de la pipeta se colocó entre las placas ensambladas y completó con agua destilada, dejando polimerizar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Luego se procedió a preparar el gel de empaquetamiento a concentración de 4%; para lo cual se secó la superficie del gel de separación con papel filtro y se agregó el gel de empaquetamiento, dejando polimerizar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras de antígenos fueron tratadas con solución de tratamiento volumen a volumen (V/V), para luego ser sometidos a baño maría por 5 minutos y finalmente agregar la solución colorante.

Se retiró el peine de electroforesis y cargaron las muestras. Se adicionó el tampón de corrida en la cubeta. La corrida electroforética se efectuó a 80v por 10' y 160v por 1 hora y 10 min. Con ayuda del sistema de fuente de poder universal a 15mA. Culminado el tiempo de corrida electroforética se colocó el gel en solución colorante por 1 hora, pasado el tiempo se colocó en solución decolorante en agitación.

## ANEXO C

### Precipitación con Sulfato de Amonio al 60%.

- a. Resuspender el líquido de quiste hidatídico liofilizado en Buffer Tris/HCl 0,05M, pH 8,0 (Anexo A) a una concentración de 50mg/mL.
- b. Homogenizar bien el material evitando formar burbujas.
- c. Dejar a temperatura ambiente por 2 horas, agitando cada 15 minutos. Posteriormente dejar a 4°C por 12 horas.
  - Separar 10 µl del preparado anterior para evaluar mediante electroforesis el perfil de proteínas del antígeno resuspendido en gel de poliacrilamida al 15%.
- d. Agregar al líquido de quiste hidatídico resuspendido el sulfato de amonio al 60% de saturación (pesar 1.4 gr de sulfato de amonio para 2ml de solución de antígeno) e inmediatamente agitar por 1 hora a 4°C.
  - Separar 10 µl del preparado anterior para evaluar mediante electroforesis el perfil de proteínas del antígeno precipitado con sulfato en gel de poliacrilamida al 15%.
- e. Centrifugar a 6000 rpm por 1 hora a 4°C.
- f. Colectar el producto sobrenadante (S1) y el producto precipitado (Pp1) por separado. Luego resuspender el Pp1 con Buffer Tris/HCl 0,05M, pH 8,0 al volumen inicial.
  - Separar 50 µl de S1 y Pp1 para la cuantificación de proteínas
  - Separar 50 µl para evaluar mediante electroforesis el perfil de proteínas en gel de poliacrilamida al 15%.
- g. Dializar los productos obtenidos (S1 y Pp1) en Buffer Tris/HCl 0,05M, pH 8,0, utilizando membrana de diálisis (Spectra MWCO: 12-14000), se dializa contra un volumen 100 veces mayor al del antígeno. El tiempo de diálisis es 12 horas a 4°C y en agitación, realizando cambios de Buffer cada hora.
- h. Luego de finalizada la diálisis, colectar los productos (S1D y Pp1D).
  - Separar 50 µl de S1D y Pp1D para la cuantificación de proteínas
  - Separar 50 µl de S1D y Pp1D para evaluar mediante electroforesis el perfil de proteínas en gel de poliacrilamida al 15%.

## ANEXO D

### Concentración por ultrafiltración de los productos dializados empleando equipo MILLIPORE 8010.

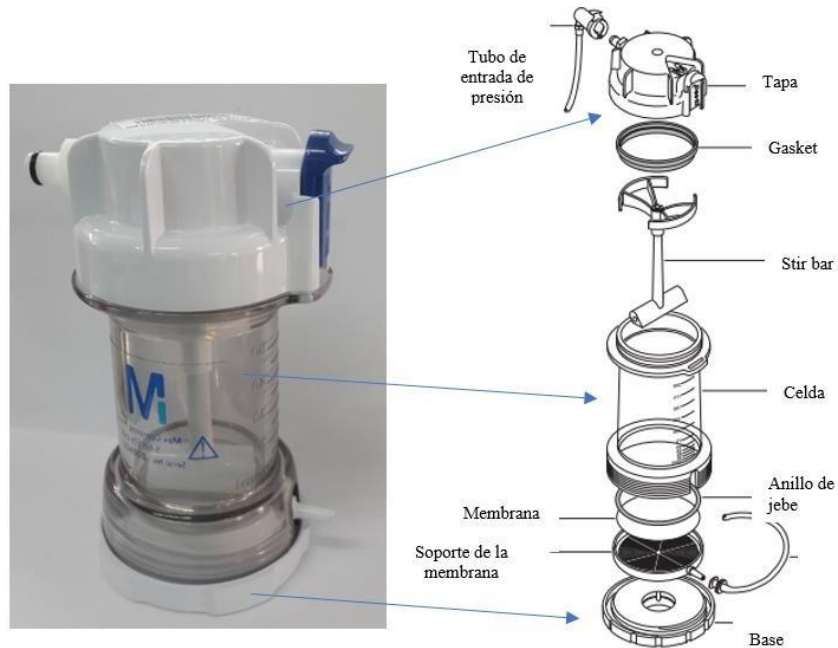
Las proteínas de S1-D y Pp1D son ultrafiltradas en un sistema cerrado de ultrafiltración (Stirred Ultrafiltration Cell, Millipore Amicon) empleando membrana de Polietersulfona.

#### Desarrollo de la Actividad

- a. Colocar el soporte de la membrana en la base del equipo (Anexo D.1). Luego transferir la membrana previamente tratada en la base, con la parte brillante hacia arriba. Se utiliza la membrana YM50 en el equipo de ultrafiltración.  
**Nota:** Para tratar la membrana lavarla tres veces en agua destilada por 15 min cada lavado, colocando la superficie brillante de la membrana hacia abajo.
- b. Colocar el anillo de jebes encima de la membrana y empujar hacia abajo gentilmente para asentar la membrana en el soporte.
- c. Alinear el puerto del tubo de filtrado en el soporte de la membrana con la ranura en la parte inferior del cuerpo de la celda. Enroscar la base en el cuerpo de la celda.
- d. Insertar el stir bar dentro de la celda hasta que el anillo de soporte este asentado en la cresta de la parte superior del cuerpo de la celda.
- e. Vierta la muestra (proteínas de S1-D y Pp1D) dentro de la celda.
- f. Con la tapa orientada como se muestra, colocar el diámetro más ancho del gasket en la parte superior de la tapa (Anexo D.2). Empuje suavemente el anillo de jebes hacia abajo para asentarlo completamente.
- g. Enroscar la tapa a la celda.
- h. Mover el seguro deslizante de color azul hacia abajo para cerrar la válvula de presión y asegurar la tapa en su lugar.
- i. Conecte el tubo de entrada de presión, insertando el conector en el casquillo de conexión rápida en la tapa hasta que haga clic.
- j. Colocar el equipo en un agitador magnético
- k. Insertar el tubo de filtración en un contenedor apropiado
- l. Para concentrar, conectar el terminal libre del tubo de presión a una fuente de presión.
- m. Iniciar la agitación y presurizar la celda a la aplicando una presión de gas nitrógeno a 25 psi por aproximadamente 1 hora.
- n. Colectar el filtrado.
- o. Una vez completada la filtración, apagar la fuente de presión, luego apagar el agitador magnético.  
**Nota:** No desconecte el tubo de presión hasta que la celda sea despresurizada.
- p. Mover el seguro azul hacia arriba para desfogar la presión residual y quitar el tubo de presión y la tapa
- q. Recuperar la muestra concentrada y desarmar el equipo.

- r. Lavar la membrana y guardarla de ser necesario en hidróxido de sodio al 10%.
- s. Lavar el equipo de ultrafiltración con agua destilada, secar y guardar.
- t. Analizar las proteínas concentradas mediante SDS-PAGE.

### D.1. Equipo Ultrafiltrador Millipore - Merck



### D.2 Tapa y seguro



## ANEXO E

### PREPARACIÓN DE TAMPÓN PARA ELECTRO ELUSIÓN (Fuente: Manual de Equipo Electro-elutor 422 – BIORAD)

#### E.1 Buffer de Elusión

Tris 0,025 M 3 g.  
Glicina 0,192 M 14,4 g.  
SDS al 10% 10 mL.  
Agua desionizada 1000 mL.

#### E.2 Electroelusión de proteínas usando el equipo Electro Elutor – 422 de BIORAD

Un sistema de electroelusión es una técnica que se basa en la extracción de una muestra de un gel de electroforesis mediante la aplicación de una corriente eléctrica la cual produce la migración de las proteínas. Se trata de recuperar la proteína inmersa en el gel, y si es posible volver a renaturalizarla.

##### Desarrollo de la Actividad

4. Realizar una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas concentradas anteriormente por ultrafiltración.
5. Terminada la corrida electroforética, colorear el gel en Azul de Comassie por 30 minutos y decolorar por una hora en solución decolorante (Anexo A). Posteriormente enjuagar el gel en agua destilada por 5 minutos y colocar el gel sobre una lámina de vidrio, luego con la ayuda de un bisturí cortar y retirar las bandas de las proteínas de interés (21-31 kDa).
6. Tome el número apropiado de tubos de vidrio y coloque en cada uno, los discos claros porosos o frits en el fondo de cada tubo. Para colocarlo ponga el tubo sobre una hoja de papel toalla limpia y presione el frit hasta que quede completamente nivelado con el fondo del tubo.
  - a. Coloque el tubo de vidrio con el frit en el módulo del electroelutor, para facilitar el deslizamiento del tubo humedezca el aro de plástico (grommet) con el buffer de elución.

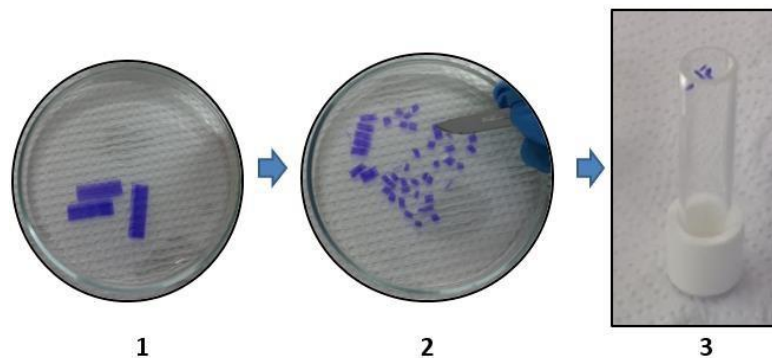
**Nota:** Asegúrese de que el tubo de vidrio quede nivelado con la parte superior del aro de plástico y que el frit se encuentre alineado con el fondo del tubo de vidrio.
  - b. Tapar los orificios de los aros de plástico que no serán empleados con los tapones de jebe.
  - c. Colocar una tapa de membrana en el fondo de cada adaptador de silicona. Llenar el adaptador con buffer de elusión (Anexo E) y mediante el uso de una pipeta, remover las burbujas que rodeen la membrana de diálisis.

- d. Deslizar el adaptador de silicona con la tapa de membrana a través del tubo de vidrio con el frit, colocándolo hasta el fondo. Algunas pequeñas burbujas pueden salir del Frit, para eliminarlas quite y ponga de forma parcial el adaptador de silicona varias veces para asegurarse de que las burbujas del frit sean expulsadas y removidas. Todas las burbujas deben ser removidas del Frit para un mejor campo de elución.

**Nota:** Los tubos de vidrio tienen un extremo esmerilado. El adaptador de silicona blanco debe de ser colocado en ese extremo, de lo contrario, se podría resbalar del tubo durante la elución.

- e. Colocar los fragmentos de los geles obtenidos en el paso “b” en los tubos, para esto deberán cortarse los geles en pedazos pequeños de aproximadamente 3 mm. Luego proceder a llenar cada tubo con buffer de elución.

**Nota:** La altura del gel dentro del tubo de vidrio no debe ser mayor a 1 cm ya que, de lo contrario, el tiempo de elución puede extenderse.



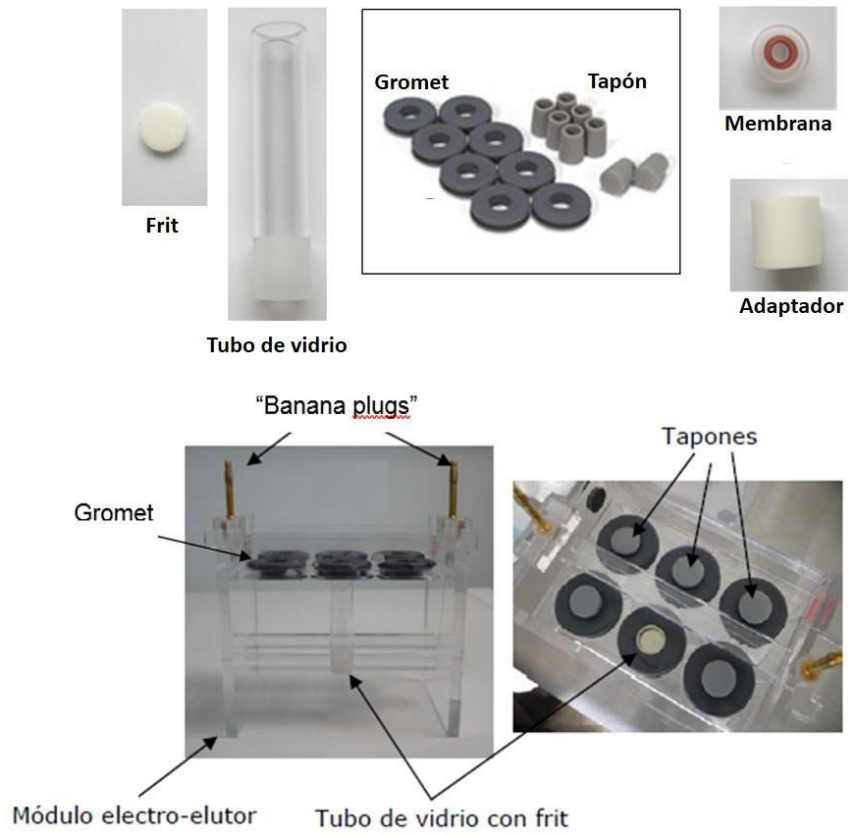
- f. Colocar el módulo completo dentro de la cámara y llenar la cámara inferior con aproximadamente 600 ml de buffer de elución. El nivel del buffer debe de cubrir la parte superior del adaptador de silicona para evitar que se formen burbujas en el fondo de la membrana de diálisis.
- Nota:** Es importante evitar que se formen burbujas en el fondo de la membrana pues alteraría el campo de corriente eléctrica.
- g. Introducir una barra magnética en el fondo del tanque de la cámara. La agitación vigorosa durante la corrida prevendrá que las burbujas se coloquen en el fondo de la membrana de diálisis.
- h. Ubicar el equipo de electroelución sobre un agitador magnético.
- i. Llenar la cámara superior con aproximadamente 100 ml de buffer de elución.
- j. Colocar la tapa de la cámara de electro elución y conectar los cables a una fuente de poder universal.



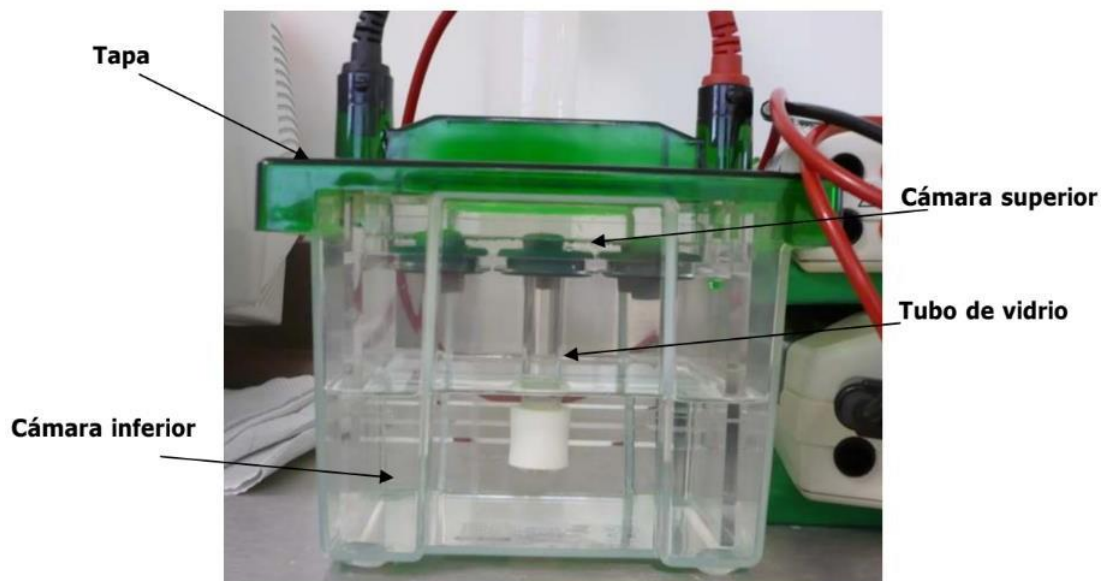
- k. Conectar el equipo a una fuente de poder universal. La elución se deberá realizar a una corriente constante de 10 mA por tubo de vidrio durante 3 horas.
- Nota:** El tiempo de elución puede variar dependiendo del porcentaje de acrilamida en el gel y del peso molecular de la proteína de interés.
- l. Después de que la elución está completa, apague la fuente de poder universal, luego retire la tapa de la cámara y remueva el módulo electro-elutor de la cámara inferior.
- m. Colocar el módulo sobre una placa Petri grande y remueva los tapones de jebes empleados para permitir el drenaje del buffer de la cámara superior. Si no colocó tapones, remueva cuidadosamente uno de los tubos de vidrio (sin quitar el adaptador de silicona y la membrana) fuera de la cámara de buffer superior y permitir que el buffer se escurra.
- n. Utilizando una pipeta, remueva y deseche el buffer que quede en cada uno de los tubos de vidrio hasta el nivel del frit. Trabaje rápidamente y cuidadosamente para evitar que tanto el adaptador de silicona como la tapa de membrana sean removidos. Asegúrese de que el buffer debajo del frit no se agite durante el proceso.
- o. Remueva el adaptador de silicona con la tapa de membrana colocada (el nivel del líquido interior debe de cubrir ligeramente la tapa de membrana). Use una pipeta y tip nuevo para obtener el líquido remanente en la tapa de membrana y colóquelo en un tubo para microcentrífuga, el volumen obtenido debe de ser de aproximadamente 400  $\mu$ l, luego lave la membrana con 200  $\mu$ l de buffer de elución nuevo y adicione este volumen al tubo para microcentrífuga. Esta solución contiene la proteína eluída. Repetir este procedimiento para cada tubo de vidrio.
- Nota: La tapa de membrana puede ser reusada durante 5 corridas completas sin disminución en el rendimiento. Refrigere la tapa de membrana en buffer con 0.05% de azida de sodio
- p. Las fracciones proteicas eluidas son evaluadas por electroforesis SDS-PAGE y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### E.3 Partes del Equipo Electroelutor

#### PARTES DEL ELECTROELUTOR



#### Equipo Electro-Elutor modelo 422



## ANEXO F

### Cuantificación de proteínas para cada protocolo.

#### F.1 Método de Bradford.

(Fuente: Manual de kit Quick Start Bradford Protein Assay– BIO RAD)

La concentración de proteínas en el líquido hidatídico y de las proteínas purificadas obtenidas por los diferentes métodos se determina mediante el método de Bradford.

Se utiliza el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD).

- a. Primero realizar una curva de calibración con el set de albúmina sérica bovina estándar en concentraciones de 0.125, 0.250, 0.5, 0.750, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/ml.
- b. Para realizar la curva estándar incubar 20 µl de cada estándar en 1ml de reactivo de Bradford.
- c. Tomar 20 µl de muestra a cuantificar e incubar con 1ml de reactivo de Bradford.
- d. Dejar reposar las soluciones por 30 minutos a temperatura ambiente.
- e. Posterior a ello se realizar las lecturas al espectrofotómetro Nanodrop, utilizando el software del equipo.
- f. Primero se establece la curva de calibración, y posterior a ello se calcula la concentración de las proteínas.

## ANEXO G

### SOLUCIONES PARA LA ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNOBLOT

#### G.1 Tampón de transferencia (solución madre)

Tris 205,6 g.

Agua desionizada c.s.p. 1000 mL.

Ajustar pH 9,18 con HCl concentrado.

#### G.2 Tampón de transferencia para uso

Buffer de transferencia 1:4 500 mL (125 mL solución madre +375 mL agua desionizada)

Metanol 200 mL.

Agua desionizada 300 mL.

#### G.3 Tampón fosfato salino 0,01M, pH 7,2 (PBS)

##### Solución madre

A.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1M) 14,196g/L.

B.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1M) 11,999g/L.

#### G.4 PBS para uso (PBS 0,01 M pH 7,2)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1M) (sol. madre) 77,2 mL.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,1M) (sol. madre) 22,8 mL.

NaCl (0,15M) 8,77 g.

$\text{H}_2\text{O}$  desionizada c.s.p. 1000 mL.

#### G.5 Tampón de lavado

Tampón fosfato salino + *tween* 20 al 0,3%.

Buffer PBS 100ml

*Tween* 20 300µl

#### G.6 Tampón de bloqueo y diluyente

Tampón fosfato salino + *tween* 20 al 0,3% + leche descremada al 5%.

Buffer PBS-*Tween* 100ml

Leche 5gr

#### G.7 Solución reveladora

Buffer PBS 10 mL.

3,3' diaminobenzidina tetracloridrato 1 mL

Peróxido de hidrógeno 30% 10 µL.