



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

“CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENO CIRCULANTE DE *Taenia solium*
DETECTADO POR ANTICUERPOS MONOCLONALES ACOPLADOS A
PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN EL DIAGNÓSTICO DE NEUROCYSTICERCOSIS
HUMANA”

Línea de investigación:

Ciencias básicas, Microbiología, Parasitología e Inmunología.

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA**

Autor:

Toribio Salazar, Luz Milagros

Asesor:

Blgo. Guerra Santa Cruz, Alcides.

Jurados:

Mg. Robles Román, Margarita Elena.

Mg. Salas Asencios, Ramsés.

Dr. Iannacone Oliver, José Alberto.

LIMA - PERÚ

2019

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más profundos agradecimientos a las personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A mis padres, en especial a mi madre que siempre me apoyó en todas mis decisiones y supo comprender mi vocación por la ciencia.

A mis abuelos, que aunque ya no están conmigo representaron dos grandes pilares en mi desarrollo profesional y personal.

A mi hermano, que parece como si nunca hubiéramos estado en paz, sin embargo, siempre llegaron los momentos en los que nuestra lucha hacía tregua para unirnos y ser el soporte de mi madre.

A Iván por ser siempre aquella persona capaz de motivarme, tranquilizarme y ayudarme a sacar lo mejor de mí en cada momento; por siempre acompañarme, alentarme en los momentos más difíciles y por ser el mejor compañero de vida.

A mi asesor interno, Blgo. Alcides Guerra, por sus constantes palabras de aliento y motivación. A mi asesora externa, PhD. Yagahira Castro, por sus consejos y constante asesoría técnica en los ensayos realizados en este trabajo.

A mis amigos, los que conocí en pregrado y hasta ahora me siguen brindando su ayuda en todo momento y por los que conocí en la realización de la tesis, en especial Cindy y Yesica, por las palabras de aliento que nos dimos mutuamente hasta finalizar nuestros trabajos.

A mi universidad y mis profesores, porque gracias a su enseñanza y paciencia me inculcaron el amor por la ciencia y me demostraron que a pesar de las limitaciones materiales se puede realizar ciencia e investigación.

A la unidad de cisticercosis del Instituto de Ciencias Neurológicas (INCN), en especial a Erika y Karen, por la paciencia para capacitarme en las técnicas de laboratorio y por ayudarme durante todo el trabajo de mi tesis.

A los Doctores: Hugo García y Javier Bustos, por confiar siempre en mi capacidad para la realización de trabajos y por brindarme muchas oportunidades de aprendizaje.

Finalmente, a todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	6
1.1 DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	7
1.2 ANTECEDENTES	8
1.3 OBJETIVOS	11
1.4 JUSTIFICACIÓN	12
1.5 HIPÓTESIS.....	13

MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES	14
2.1.1 NEUROCISTICERCOSIS	14
2.1.1.1 TIPOS DE NEUROCISTICERCOSIS	15
2.1.1.2 BIOLOGÍA DE <i>Taenia solium</i>	17
2.1.1.2.1 MORFOLOGÍA	17
2.1.1.2.2 FISIOLÓGÍA	19
2.1.1.2.3 CICLO BIOLÓGICO	19
2.1.1.3 ANTIGENICIDAD	21
2.1.1.4 RESPUESTA INMUNITARIA DEL SER HUMANO	21
2.1.1.5 EPIDEMIOLOGÍA	22
2.1.1.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	23
2.1.1.6.1 DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES	24
2.1.1.6.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	24
2.1.1.6.2.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA DIAGNÓSTICO	25
2.1.1.6.2.2 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO	25
2.1.1.6.3 PROTEÓMICA APLICADA AL DIAGNÓSTICO	29

MÉTODO

3.1 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	31
3.2 CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	33
3.3 CONJUGACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS-mAb CON ORINA	33

3.4 ELUCIÓN DE ANTÍGENO CAPTURADO	36
3.5 ELECTROFORESIS SDS-PAGE	36
3.6 WESTERN BLOT	37
3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	38
 RESULTADOS	
4.1 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	39
4.2 CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	43
4.3 CONJUGACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS-mAb CON ORINA	43
4.4 ELUCIÓN DE ANTÍGENO CAPTURADO	44
4.5 CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENO CAPTURADO	46
4.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS	46
 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
4.1 PURIFICACIÓN Y USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	48
4.2 CONJUGACIÓN Y USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS	49
4.4 ELUCIÓN DE ANTÍGENO CAPTURADO	49
4.5 CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENO DE <i>Taenia solium</i>	50
4.7 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	52
 CONCLUSIONES	 53
 RECOMENDACIONES.....	 54
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 55
 GLOSARIO DE TÉRMINOS	 64

RESUMEN

El diagnóstico inmunológico de neurocisticercosis (NCC) tiene limitaciones como la dificultad para obtener la muestra y no distinguir una infección pasada de una actual. El diagnóstico basado en antígenos purificados ha mejorado notablemente la especificidad y sensibilidad; por ello se han estudiado nuevos métodos de purificación. El grupo de trabajo de cisticercosis de Perú diseñó anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra quistes de *Taenia solium*, sin embargo, el antígeno que reconocen es desconocido. En este estudio, se realizó la caracterización de este antígeno circulante en orina mediante el uso de partículas magnéticas acopladas a mAbs. Se realizó un ELISA basado en partículas magnéticas con muestras de orina para comprobar la capacidad de captura de las partículas. Para purificar el antígeno capturado, se compararon métodos de elución denaturantes y no denaturantes y fueron visualizados mediante ELISA directo, SDS-PAGE y Western Blot. Finalmente se realizó la espectrometría de masas (MS) del eluido. En el ELISA basado partículas magnéticas, se obtuvieron valores de $OD \geq 3.8$ demostrando la alta capacidad de los mAbs para capturar antígeno en orina. Al comparar los métodos de elución, el buffer no denaturante glicina permitió obtener bandas definidas entre 37-25 kDa; la MS identificó a dos proteínas: actina (~41.2 kDa) y subunidad β de ATP-sintasa (~27 kDa). En conclusión, esta investigación sugiere que los antígenos circulantes de *T. solium* excretados en orina de pacientes con NCC detectan dos proteínas específicas relacionadas a la estructura y metabolismo del parásito que podrían usarse como biomarcadores para mejorar el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la enfermedad.

Palabras clave: Neurocisticercosis, antígeno circulante, anticuerpos monoclonales.

ABSTRACT

The immunological diagnosis of neurocysticercosis (NCC) has limitations such as the difficulty in obtaining the sample and not distinguishing a past infection from a current infection. The diagnosis based on purified antigens has notably improved the specificity and sensitivity. Therefore, new methods of purification have been studied. The Peruvian cysticercosis working group designed specific monoclonal antibodies (mAbs) against *Taenia solium* cysts, however, the antigen they recognize is unknown. In this study, the characterization of this circulating antigen in urine was performed by the use of magnetic particles coupled to mAbs. An ELISA based on magnetic particles was made with urine samples to check the capture capacity of the particles. To purify the captured antigen, denaturant and non-denaturing elution methods were compared and visualized by direct ELISA, SDS-PAGE and Western Blot. Finally, the mass spectrometry (MS) of the eluate was performed. In ELISA based on magnetic particles, values of $OD \geq 3.8$ were obtained demonstrating the high capacity of mAbs to capture antigen in urine. When comparing the elution methods, the non-denaturing glycine buffer allowed obtaining defined bands between 37-25 kDa; MS identified two proteins: actin (~ 41.2 kDa) and β subunit of ATP-synthase (~ 27 kDa). In conclusion, this research suggests that circulating *T. solium* antigens excreted in urine of patients with NCC detect two specific proteins related to the structure and metabolism of the parasite that could be used as biomarkers to improve the diagnosis and follow-up of the treatment of the disease.

Key words: Neurocysticercosis, circulating antigen, monoclonal antibodies.

I. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad tropical parasitaria ocasionada por la larva de *Taenia solium*, se encuentra incluida en el grupo de enfermedades infecciosas desatendidas (EID), priorizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la región de las Américas; las EID comparten los mismos indicadores socio-sanitarios por estar estrechamente vinculadas con la pobreza, el aislamiento geográfico de las poblaciones, la falta de recursos financieros para su control, la escasez de fármacos y la dificultad que enfrentan los centros de salud para tener acceso a los métodos de diagnóstico (García H *et al*, 2005).

Actualmente la NCC es la infección más frecuente del sistema nervioso, endémica en América Latina, Asia y África, así como en naciones desarrolladas con flujo masivo de inmigrantes provenientes de áreas endémicas. En nuestro país, es considerada hiperendémica en la sierra y en algunas zonas de la costa y selva, según los resultados realizados por *The Cisticercosis Working Group of Perú* (García H, 1989; Gilman R, 2000).

Dependiendo de la finalidad se emplean diferentes herramientas para diagnóstico. Algunos de ellos se enfocan al detectar el parásito directamente: neuroimagen, detección de antígenos del parásito y los exámenes de heces para la detección de huevos y proglótides; mientras que otros ensayos se centran en la reacción del hospedero, por ejemplo: detección de anticuerpos mediante ELISA o Western Blot.

La detección de anticuerpos es generalmente más sensible en comparación con la detección de antígenos, pero falla para distinguir entre una infección activa, una infección pasada y el contacto o exposición. La detección de antígeno, por otro lado, solo detecta infecciones activas (quistes viables), pero los ensayos actuales se utilizan para detectar antígenos circulantes de cisticercos *T.saginata* en el ganado (Rodríguez S *et al*, 2009). Por lo que su uso en humanos y cerdos se podría verse afectado por reacciones cruzadas con otros parásitos.

Al detectar antígenos específicamente se mejoraría el diagnóstico de la enfermedad. Para desarrollar una técnica basada en la detección de antígenos, primero las proteínas diferenciales (es decir, las proteínas que son únicas para *T. solium*) deben ser identificadas. Por este motivo, este estudio permitirá caracterizar las proteínas excretadas por el parásito que estén presentes en orina y que reconozcan a anticuerpos monoclonales específicos contra quistes de *T.solium*.

1.1 DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La cisticercosis es una infección parasitaria producida por la larva o cisticerco de *Taenia solium* que afecta principalmente al sistema nervioso central, esto causa la neurocisticercosis (NCC). El hombre puede convertirse en hospedero intermediario de *Taenia solium* cuando ingiere accidentalmente los huevos en alimentos y aguas contaminadas. Los principales factores de riesgo asociados son: los inadecuados hábitos higiénicos, el consumo de alimentos contaminados con huevos, ausencia de saneamiento ambiental, carencia de tratamientos antiparasitarios y falta de campañas de educación comunitaria (Schanz PM, 1999). En el Perú la NCC tiene una prevalencia entre el 7- 8% en la selva y del 13-24% en poblaciones de la sierra y 20-31% en la costa (Escalante G, 2005).

La NCC puede ser asintomática o tener síntomas inespecíficos, esto complica mucho más el diagnóstico de la enfermedad a través de las manifestaciones clínicas del paciente; por lo que se recurren a otros métodos como las técnicas de imagenología y las pruebas serológicas. Las técnicas de neuroimagen no son de mucha utilidad cuando el número de cisticercos es bajo o las imágenes no son concluyentes, a esto se suma el costo y la accesibilidad del equipo requerido a los lugares endémicos (Del Brutto O, 1996); es por ello que las técnicas de inmunodiagnóstico son las más utilizadas, estas detectan la presencia de anticuerpos, sin embargo, puede ser confuso al determinar si se trata del parásito vivo o de una infección pasada (Rodríguez S. *et al.*, 2012). Es por ello que siempre resulta importante la búsqueda de antígenos específicos de alta sensibilidad y especificidad para utilizarlos en el diagnóstico de esta enfermedad.

En la constante búsqueda de mejorar las técnicas de diagnóstico de NCC y con el desarrollo de nuevas técnicas en inmunología se han propuesto diversas herramientas como el uso de anticuerpos monoclonales, la caracterización de antígenos excretorios, la producción y clonación de antígenos recombinantes para aumentar la sensibilidad y especificidad de las técnicas.

- FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las características del antígeno circulante de *Taenia solium* capturado por anticuerpos monoclonales acoplados a partículas magnéticas en muestras de orina de pacientes con NCC humana?

1.2 ANTECEDENTES

Al diagnóstico por métodos imagenológicos se agregó el uso de la serología. El uso combinado de serología e imágenes permite en la mayoría de casos llegar a un diagnóstico certero de neurocisticercosis (Rodríguez *et al*, 2012).

En 1989 Tsang *et al* describen la técnica de enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) o Western Blot, la aplicación del EITB a esta parasitosis mostró gran sensibilidad y especificidad (98% y 100%, respectivamente) a la presencia de infección por *Taenia solium*. El antígeno usado fue purificado por una columna de sefarosa con lectinas de lenteja, las cuales tienen afinidad por glicoproteínas. Se identificaron 7 bandas antigénicas que son reconocidas por suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con NCC confirmada.

Correa y colaboradores en 1989, desarrollaron un ELISA usando dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra un epítipo repetitivo de glicoproteínas de productos de excreción/secreción de cisticercos de *Taenia saginata*. Estos monoclonales presentaban reacción cruzada con antígenos circulantes de *Taenia solium*.

En 1990 Estrada J., mencionó la importancia de un diagnóstico de enfermedades parasitaria a través de la detección de antígenos, ya que este sería un diagnóstico definitivo de una infección viva. Resaltó la importancia de antígenos circulantes de parásitos y la facilidad de obtención de las muestras de orina.

Coonrod J., en 1992 resaltó la importancia de las muestras de orina como reservorios de antígenos de muchas enfermedades infecciosas causadas por parásitos. Indicó que es una muestra no invasiva muy fácil de obtener, que muchas veces necesita ser concentrada previamente y que los antígenos excretorios de orina son generalmente de bajo peso molecular (menor a 70 kDa); a pesar de ser pequeños son los suficientemente inmunorreactivos para ser detectados en pruebas serológicas.

En 1992 Chang-Yuan, realizó un estudio en muestras de LCR en humanos para detectar el antígeno circulante de pacientes con NCC, concluyó que el antígeno circulante de cisticercosis no es detectado por otras enfermedades del SNC y se le debe considerar como método de diagnóstico de una infección activa.

Kerckhoven V. y colaboradores en 1998, posteriormente y debido a la necesidad de mejorar la performance de la prueba de Western Blot, se probó Ac monoclonales de isotipo IgG, los que mostraron una mayor afinidad por los productos de secreción/excreción del parásito, mejorando de esta forma la sensibilidad de 56% a 92% y la especificidad de 93.4% a 98.7% para cisticercosis por *Taenia saginata*

García H. y colaboradores en el 2000; determinaron la sensibilidad y especificidad de la detección del antígeno circulante en suero de pacientes con NCC en una prueba de ELISA; obteniendo una sensibilidad del 85% y una especificidad del 92%; los falsos negativos resultaron de pacientes con quiste vivo único o parásitos en degeneración donde la sensibilidad es de 65%. También realizaron un seguimiento de pacientes con detección de antígeno circulante en suero a los tres meses de haber recibido tratamiento, observando la disminución de los niveles de antígeno circulante en pacientes curados y la persistencia de este en pacientes no curados.

Yamasaki H, en el año 2003 realizó una revisión sobre los avances en el diagnóstico serológico y molecular de cisticercosis y teniasis; destacando el uso de ensayos de inmunoblot usando antígenos recombinantes y purificados de *Taenia solium*. Resaltó la importancia de desarrollar ensayos serológicos que detecten poca cantidad de antígeno para la detección de NCC en pacientes con una sola lesión cerebral.

En el 2004 Parija M *et al.*, realizó un estudio para detectar antígeno circulantes excretado en orina para el diagnóstico de NCC a través de un test de coaglutinación, utilizando anticuerpo policlonal de conejo como detección, sin embargo, sus valores de sensibilidad fueron bajos (62%).

Lee E y col. En el 2008 determinaron el análisis proteómico de un complejo de proteína de 120 kDa en fluido de cisticercos de *Taenia solium*. Esta proteína fue purificada por cromatografía líquida, encontraron dos componentes en su mayoría: 42-46 y 22-28 kDa y 3 subunidades compartidas de 14, 16 y 18 kDa. Se identificaron glicoproteínas de bajo peso molecular. Las subunidades de 14 y 18 kDa fueron probadas con muestras de suero para la detección de anticuerpos y reaccionaron bien identificando infecciones vivas. Propone desarrollar nuevos ensayos serodiagnósticos a partir de estas proteínas identificadas.

Castillo Y, y colaboradores en el 2009 realizaron un estudio para detectar antígeno circulante de cisticercos en orina de pacientes con NCC mediante la técnica de ELISA, usando como captura anticuerpos monoclonales de tipo IgM dirigidos contra antígenos excretorio/secretorio de *Taenia solium*. Además se realizó un tratamiento a la muestra de orina concentrándola previamente y tratándola con anticuerpo monoclonal biotinilado. La población de estudio fueron pacientes con una sola lesión, con lesiones calcificadas, con NCC subaracnoida y NCC parenquimal. Se reportó una sensibilidad de 92%.

En el 2012, Victor B y colaboradores realizaron el análisis proteómico de proteínas de excreción/secreción de *Taenia solium*, siendo este el primer reporte de del proteoma de excreción/secreción de este parásito. Reportaron 76 proteínas, de las cuales 27 ya estaban descritas anteriormente, 17 proteínas de hospedero y 32 proteínas de origen de *Taenia solium* pero identificadas usando secuencias de otros parásitos.

En el 2013 Reamtong O, publicó una revisión de la importancia de la espectrometría de masas y la proteómica en enfermedades parasitarias. Describió todas las técnicas necesarias antes de realizar la MS y el análisis que se debe hacer, la MS muestra secuencias de aminoácidos y modificaciones postraduccionales. Mencionó que la proteómica es usada en muchas áreas de estudio, incluyendo la parasitología donde se podría elucidar la patología de la enfermedad, incluyendo las interacciones hospedero-parásito, el desarrollo de posibles vacunas, identificación de biomarcadores y diagnóstico de enfermedades parasitarias.

Sahu P., en el 2014 realizó un perfil comparativo de péptidos antigénicos circulantes en suero, LCR y orina de pacientes con NCC confirmada por inmunotransferencia. Los péptidos antigénicos se identificaron mediante electroforesis SDS-PAGE, para determinar de qué región del parásito provenían los antígenos se utilizaron policlonales anti somático y anti E/S purificados. Solo se encontraron antígenos de bajo peso molecular en las muestras de orina, excepto el de 5 kDa que se encontró en las 3 muestras; en orina también se encontraron los péptidos de 32 kDa y 15 kDa.

Gómez y colaboradores en el 2015 analizaron el genoma de proteínas excretorias/secretorias de *Taenia solium* y a través de un análisis bioinformático y determinaron sus regiones de antigenicidad. Hallaron glicoproteínas con posible función moduladora de respuesta inmunitaria.

Nhancupe N *et al.* En el 2016 evaluaron la performance de Tsol-p27, un antígeno recombinante para ser usado en Western Blot para el diagnóstico de NCC y ser comparado con la técnica de ELISA. Este antígeno fue previamente caracterizado por Salazar-Anton F, en el 2011 mediante electroforesis bidimensional Western blot y espectrometría de masas de un extracto soluble del parásito.

Paredes y colaboradores en el 2016, produjeron 22 anticuerpos monoclonales dirigidos contra quistes de *Taenia solium* para ser probados en un sistema de ELISA y así mejorar la especificidad y sensibilidad del diagnóstico de NCC. De los 22 monoclonales, se seleccionaron 3 pares de isotipo IgG e IgM que presentaron los OD (Densidad óptica) más altos en la prueba de ELISA tanto como anticuerpos de captura o de detección.

1.3 OBJETIVOS

- OBJETIVO GENERAL

- ✓ Caracterizar el antígeno circulante de *Taenia solium* capturado por anticuerpos monoclonales acoplados a partículas magnéticas en muestras de orina de pacientes con NCC humana.

- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Obtener anticuerpos monoclonales purificados a partir de un cultivo y acoplarlos a partículas magnéticas con grupos epoxy para detectar antígenos circulantes en pacientes con NCC.
- ✓ Evaluar el antígeno capturado por los anticuerpos monoclonales en muestras de orina de pacientes con NCC humana.
- ✓ Caracterizar el antígeno en estudio mediante espectrometría de masas (MS).
- ✓ Diseñar un modelo *in silico* del antígeno caracterizado mediante softwares bioinformáticos.

1.4 JUSTIFICACIÓN

La cisticercosis es endémica de Latinoamérica, India, Asia y África; en América Latina alcanza una prevalencia del 30% en zonas rurales dependiendo de hábitos higiénicos y el consumo de agua o vegetales contaminados con huevos de *Taenia solium* (García *et al.*, 2003). El diagnóstico de esta enfermedad requiere de métodos indirectos como el estudio imagenológico, la tomografía axial computarizada y la serología que detecta anticuerpos (Bailey y Masson, 1988).

El diagnóstico definitivo de la neurocisticercosis se hace con la comprobación anatomopatológica, debido a la gran variedad de signos y síntomas el diagnóstico clínico es difícil y en muchas ocasiones la radiología no es certera. La imagenología clásica consiste en la presencia de varios parásitos en diferentes estadios de evolución (quistes o parásitos calcificados); sin embargo, la presencia de quistes únicos puede confundirse con otras patologías del sistema nervioso central (SNC) (Estrada J, 1990). Por lo que se plantea la necesidad de métodos de diagnóstico específicos y sensibles; como la detección del antígeno circulante del parásito, ya que este es capaz de detectar y confirmar la presencia de parásitos vivos y también así se puede tener un control de los pacientes durante su tratamiento (Paredes A, 2016).

Los anticuerpos Monoclonales (mAbs) se presentan como una herramienta novedosa para el diagnóstico de diversas enfermedades, estos se producen de una única copia del Linfocito B y se pueden enlazar a un único punto de enlace del antígeno. Los ensayos con mAbs tienen mejor sensibilidad y muestran muy poca reactividad cruzada (Paredes A, 2016). La ventaja de usar partículas magnéticas es que generan uniones fuertes con moléculas como los anticuerpos y al tener forma esférica, es el soporte ideal para asegurar la unión antígeno-anticuerpo aunque este último se encuentre en menor cantidad. La conjugación de anticuerpos y partículas magnéticas unirá las características de ambas y generará mayor versatilidad de usos y especificidad. Al combinar estas dos novedosas técnicas: los anticuerpos monoclonales y las partículas magnéticas, es posible aumentar la sensibilidad de pruebas inmunodiagnósticas para la NCC para capturar antígenos circulantes.

La proteómica como la ciencia que estudia el proteoma es de vital importancia en la salud pública, ya que el conocimiento de las proteínas y moléculas efectoras de función celular permiten un mejor entendimiento del agente etiológico de la enfermedad (Pando-Robles, 2009). La principal herramienta de la investigación de la proteómica es la espectrometría de masas (MS) que mide la relación entre masa/carga de una molécula y de esta manera se pueden identificar compuestos desconocidos y elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas.

Analizar la proteómica del antígeno circulante en orina de pacientes con NCC permitirá conocer la estructura y posible función de este, y así proponer una molécula de antígeno específica para el diagnóstico en muestras de fácil acceso. También podría ser probada con la tecnología del DNA recombinante para la creación de posibles vacunas. Además, este trabajo generará nuevas líneas de investigación para mejorar el diagnóstico de NCC.

1.5 HIPÓTESIS

El antígeno circulante podrá ser capturado por los anticuerpos monoclonales, debido a su bajo peso molecular será capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y la barrera de filtración del riñón y así estar presente en orina.

El antígeno circulante no podrá ser capturado por los anticuerpos monoclonales, no será de bajo peso molecular por lo que no atravesará la barrera hematoencefálica ni la barrera de filtración del riñón y no estará presente en orina.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES

La cisticercosis es una infección parasitaria que afecta principalmente a porcinos y accidentalmente a humanos, al ingerir los huevos del céstodo *Taenia solium*. El cisticerco es el estadio larval y es una enfermedad que causa elevada morbilidad en países en vías de desarrollo donde la higiene y las condiciones sanitarias son precarias (García *et al.*, 2003). Esta zoonosis se distribuye a nivel mundial, existiendo zonas que presentan frecuencias altas principalmente en el continente americano. La transmisión ocurre en áreas urbanas y rurales; asociándose en esta última a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, hacinamiento y pobreza (Sarti *et al.*, 1998).

La localización de mayor frecuencia es el sistema nervioso central (SNC) o neurocisticercosis (NCC) y, en segundo lugar, la del ojo (cisticercosis ocular). El ser humano puede albergar desde un cisticerco a varios centenares. La sintomatología de la NCC varía con el número de cisticercos; el estado de desarrollo (jóvenes, maduros, intactos, degenerados); la variedad morfológica (vesiculosa o racemosa); la ubicación en el SNC; la respuesta inflamatoria que despierte y las reacciones del organismo del paciente (Ferrer, 2006).

Desde principios de este siglo se han empleado métodos inmunológicos para el diagnóstico de esta parasitosis. Iniciando en 1972 con la prueba de ELISA, sin embargo, esta carecía de especificidad al presentar reacciones cruzadas con otras parasitosis; en 1989 se desarrolló la electroinmunotransferencia blot (EITB) o más conocida como “Western Blot” que logró superar el problema de las reacciones cruzadas, esta prueba detecta 7 glicoproteínas específicas de *Taenia solium* con sensibilidad y especificidad cercanas al 100% (Tsang *et al.*, 1989).

2.1.1 NEUROCISTICERCOSIS

La neurocisticercosis (NCC) es la parasitosis humana más frecuente del SNC, y es endémica en prácticamente todos los países en desarrollo, con excepción del mundo musulmán. En Iberoamérica, India, partes de Asia y África es considerada una enfermedad endémica; en USA y Europa se presenta con cierta frecuencia, mayormente en inmigrantes (Rojas *et al.*, 2007).

Desde que se identificó esta enfermedad parasitaria, fue evidente que los estudios anatomopatológicos eran la base indispensable para comprender las variantes clínicas y la historia natural de la enfermedad, dado que no existían las modernas técnicas diagnósticas de neuroimagen (Escobedo *et al.* 1982). Escobar, en 1983, describió con detalle los estadios o fases por los que atraviesa el cisticerco desde que llega al sistema nervioso central hasta su calcificación. Estas fases son:

Fase vesicular: El parásito es viable, la membrana vesicular es delgada, líquido vesicular es transparente, el escólex es de aspecto normal y no se observan cambios inflamatorios en el tejido cerebral que le rodea.

Fase coloidal: La pared del quiste se engrosa rodeándose de una densa capa de colágeno y el escólex muestra signos de degeneración hialina. El parénquima cerebral circundante se encuentra edematoso y muestra un intenso infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas.

Fase granular: La reacción inflamatoria abarca al parásito propiamente dicho, el cual ya no es viable.

Fase calcificada: Finalmente el cisticerco llega a esta fase transformándose en un nódulo calcificado e inerte y los cambios inflamatorios suelen ser intensos y persisten así durante años.

Tabla 1.

Estadios evolutivos de la NCC (Tomado de Sarria, 2012)

Estadio	Fisiopatología	Características por RM
No quístico	Invasión tisular por el cisticerco	- Foco localizado de edema - Puede haber un realce nodular con contraste - Normalmente no se obtienen imágenes en este estadio
Vesicular	Mínima reacción inflamatoria Quiste con escólex	- Quiste: hipointenso T1/hiperintenso T2. Señal igual al LCR - Escólex: isointenso al parénquima en T1 y T2, hipointenso en T2*, hiperintenso en FLAIR
Vesicular-coloidal	Muerte del parásito Intensa reacción inflamatoria	- Edema vasogénico rodeando el quiste - Quiste: formación de cápsula hipointensa en T2. Aumento de la señal del líquido interior del quiste - Realce anular con contraste - Puede formarse nivel líquido-líquido
Nodular-granulomatoso	Absorción y retracción del quiste	- Quiste residual de menor tamaño, engrosamiento capsular. Isointenso al parénquima en T1/iso-hipointenso en T2 - Escólex calcificado (aspecto en diana) - Puede persistir un leve edema vasogénico
Nodular-calcificado	Involución final del quiste Mineralización	- Realce nodular o micronodular con contraste - Nódulo calcificado sin realce con contraste - Nódulo hipointenso en secuencias T2*

LCR: líquido cefalorraquídeo.

El cisticerco alojado en el sistema nervioso central es una parasitosis grave, con periodo de incubación largo de 4 a 5 años, variando los síntomas en función del sitio de ubicación, el estado, número de parásitos y la reacción inmunitaria. La epilepsia es la manifestación más común con 70% de frecuencia en áreas endémicas, en reacción tardía de la infección puede desarrollar intensos granulomas que conduce a la destrucción del cisticerco calcificándose gradualmente entre 2 a 7 años.

2.1.1.1 TIPOS DE NEUROCISTICERCOSIS

El cisticerco se puede presentar de dos formas: racemosa o quística. La forma racemosa, que se observa en la neurocisticercosis humana, es grande, con una vesícula multilobulada, a menudo con forma de racimo de uvas. El escólex en general no es visible, aunque en la mayor parte de los casos, una revisión microscópica exhaustiva permite la identificación del escólex o de sus restos. Por su parte, la forma quística es pequeña (Del Brutto, 1992).

Cisticercosis Quística: El cuadro clínico puede estar en relación con su ubicación en la corteza cerebral, pudiendo los síntomas variar según el grado de infestación; un cisticerco puede ser el origen de un foco epileptógeno. Pueden ubicarse en el límite meningocortical, subaracnoideos, parenquimatosos, es decir ocupar cualquier estructura encefálica donde lleguen vasos terminales. La hipertensión intracraneal (HIC) y las manifestaciones psíquicas se ve con más frecuencia en la racemosa de la base. Cuando los quistes se ubican en el parénquima cerebral y/o los ventrículos, según su tamaño y el grado de lesión obstructiva que produzcan, pueden dar lugar a la llamada “hidrocefalia interna”, con síntomas intermitentes. Los quistes dentro de los espacios ventriculares se fijan en la tela endotelial o están libres flotando en el LCR (Lobato et al 1981). El III y IV ventrículo son los que frecuentemente alojan cisticerco único, siendo probable por ello la solución quirúrgica (Proaño et al 1997).

Cisticercosis Racemosa: El cisticerco racemoso, morfológicamente diferente del quístico, aunque de estructura histológica similar. Se ha descrito la ubicación de estructuras correspondientes al escólex de *Taenia solium* (Rabiela et al 1985). En este tipo de NCC, la membrana invade las estructuras meníngeas ubicándose preferentemente en las cisternas basales; se forman vesículas sin escólex a manera de “racimo de uvas” de ahí su nombre, crecen y siguen los espacios subaracnoideos obstruyéndolos. El cuadro clínico predominante es de una hidrocefalia de tipo crónico y trastornos psíquicos de tipo confusional, desorientación, conducta pueril, indiferencia apatía falsos reconocimientos, manifestaciones que son fluctuantes, por los mecanismos de compensación de la hidrocefalia. Posteriormente, los trastornos de memoria se acentúan hasta llegar a un estado demencial, la marcha se hace insegura, oscilante.

Cisticercosis mixta (quística y racemosa): En este tipo predominan las manifestaciones clínicas relacionadas con el componente racemoso.

Cisticercosis Espinal: En la mayoría de los casos es una cisticercosis racemosa de la base, con extensión espinal. En raras oportunidades, al realizar examen de LCR, se logran extraer membranas por punción lumbar, después identificadas como membranas parasitarias de cisticerco.

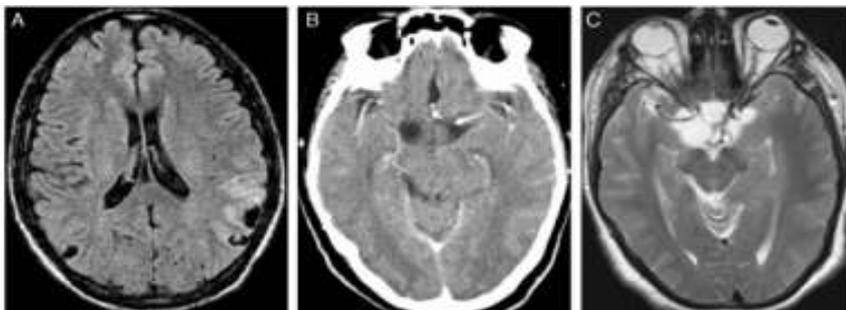


Figura 1.

Cisticercos subaracnoideos. Estudio de RM en el plano transversal (A) en la que se observan pequeños quistes en la profundidad de los surcos cerebrales biparietales. Lesiones quísticas en las cisternas basales. La TC con contraste (B) y la secuencia de RM (C), ambas en el plano transversal, muestran la ocupación de las cisternas basales por lesiones quísticas cuyo contenido es similar al líquido cefalorraquídeo.

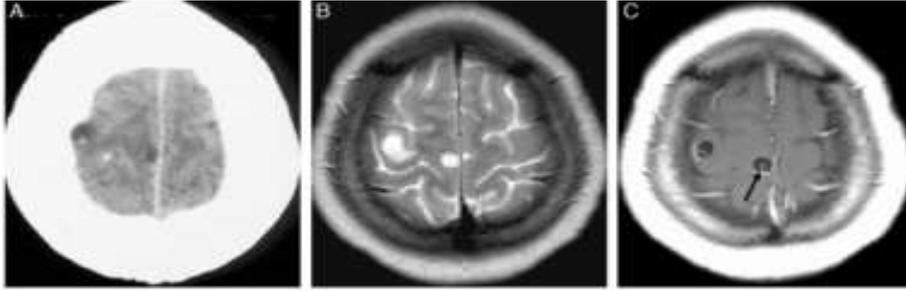


Figura 2.

Cisticercos parenquimatosos. TC con contraste (A) y RM (B) en el plano transversal (C). Se ven pequeñas lesiones quísticas corticales frontales derechas, con mínimo edema perilesional y escólex visible en su interior (flecha)

2.1.1.2 BIOLOGÍA DE *Taenia solium*

Taenia solium es un céstode que, conjuntamente con otras 20 especies, pertenecen a la familia *Taenidae* (Pawlowski *et al*, 2002). *Taenia solium* es también conocida como “solitaria” debido a su supuesta característica de que sólo un parásito se aloja en un hospedero. Sin embargo, el grupo de estudio de neurocisticercosis en el Perú encontró en un estudio previo que el 20% de los portadores de *Taenias* eliminan más de un parásito (Jeri *et al.*, 2004).

2.1.1.2.1 MORFOLOGÍA

Taenia solium presenta un adulto generalmente de 2 a 4 metros, dorso ventralmente comprimido, presenta un escólex (de 1mm de diámetro) acetabular, con 4 ventosas y un róstelo formado por una doble cadena de ganchos (Slais, 1970). Posee un estróbilo con 900 a 1000 proglótidos recubiertos por un tegumento con microtricas en su superficie exterior, constituyendo un tejido sincitial con funciones de secreción y absorción. Presenta tres tipos de proglótidos infértiles próximos al cuello, fértiles y maduros o grávidos estos últimos son grandes cuadrangulares contienen 40 mil a 60 mil huevos.

El cisticerco de *Taenia solium* está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (de 0.5 a 2 cm de diámetro mayor), con un pequeño escólex invaginado. Al igual que *Taenia solium* adulta, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un róstelo armado con dos hileras de ganchos. La superficie que presenta el cisticerco a su huésped humano o porcino es un tegumento citoplásmico sincitial en toda la cara externa de la pared vesicular. Como los cestodos carecen de tracto digestivo, obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumental. La superficie externa del tegumento aparece aumentada por proyecciones digitiformes llamadas como microtricas, las cuales permiten la absorción de nutrientes. Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de tejido muscular liso, así como los llamados citones subtegumentales. A mayor distancia de la superficie se encuentra

una serie de conductos o canales, aparentemente relacionados con células ciliadas, llamadas células flama, que constituyen un sistema protonefridial (Smyth, 1969).

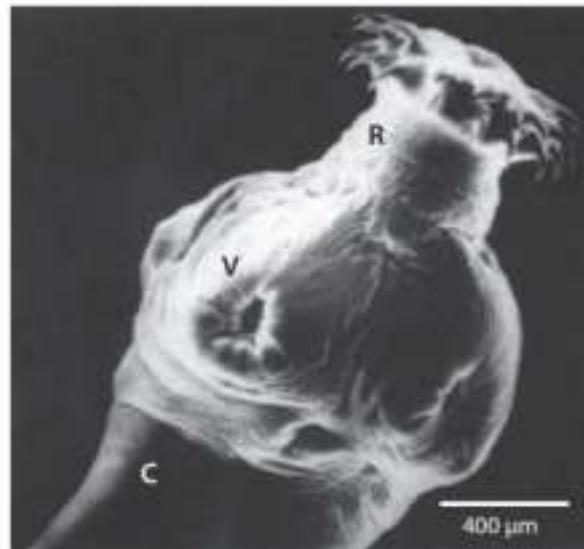


Figura 3.

Escólex de la *T. solium* observado en el microscopio electrónico de barrido. C: cuello, R: roseto, V: ventosas.



Figura 4.

Cisticercos de la *T. solium*. (izquierda) Representación esquemática de un corte de cisticerco. (derecha) Cisticercos disecados de músculo esquelético de cerdo.

2.1.1.2.2 FISIOLÓGÍA

Los cisticercos utilizan tanto rutas metabólicas aeróbicas como anaeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio y obtienen sus nutrientes por difusión facilitada a través de la pared vesicular. Se han identificado dos transportadores de glucosa (TGTP1 y TGTP2) que se localizan en estructuras de la pared vesicular y en la superficie tegumentaria, respectivamente (Smyth, 1969). Además se han identificado distintas glicoproteínas en la superficie tegumentaria de la pared vesicular de los cisticercos. El cisticerco también responde al estrés por temperatura, sintetizando diversas proteínas como HSP 80, HSP 70 y HSP 6 (Silverman, 1964) siendo esta última identificada en productos de excreción - secreción y es reconocida por los sueros de los pacientes con NCC.

La superficie del cisticerco en contacto con el huésped es una membrana plasmática del tegumento que es susceptible al daño por los diversos mecanismos defensivos del huésped, como el complemento, las células efectoras, los compuestos tóxicos. Los citones subtegumentales sintetizan activamente proteínas y otros componentes que son transportados hacia el tegumento a través de puentes citoplásmicos. Se han descrito proteínas del citoesqueleto, como la miosina tipo 11, y la actina, la cual se encuentra en siete isoformas distintas.

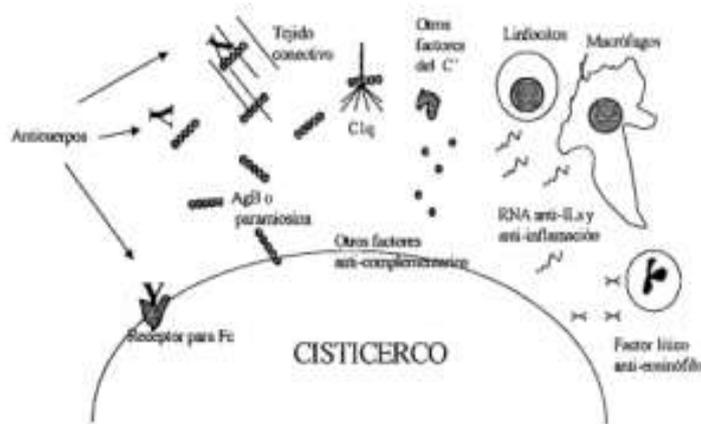


Figura 5.

Algunos mecanismos de evasión inmune del cisticerco.

2.1.1.2.3 CICLO BIOLÓGICO:

En el ciclo usual de transmisión, el estadio adulto de *T. solium* habita por periodos prolongados (hasta 25 años) en el intestino delgado del hombre infectado. El parásito se adhiere a la mucosa intestinal por medio del escólex (cabeza).

El hospedero intermediario normalmente es el cerdo quien es infectado por la ingestión de huevos de *T. solium* a través de las heces humanas (Correa et al., 1991). Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen al embrióforo (una de las envolturas que protegen al embrión para sobrevivir en el medio ambiente) liberando y activando al embrión denominado oncósfera. El embrión activado alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que

lo llevan al músculo, tejido subcutáneo, sistema nervioso central (SNC) o al ojo (White C, 1997).

El embrión ya establecido aumenta de tamaño y en aproximadamente 10 semanas se desarrolla a cisticerco de *T. solium*. Cuando el ser humano ingiere carne de cerdo infectada cruda o mal cocida que contiene los cisticercos viables, el cisticerco es activado por las enzimas y sales biliares del tubo digestivo, y luego de 12 semanas desarrolla el gusano adulto. Cuando el portador es infectado por el gusano adulto, puede liberar proglótidos grávidos a través de las heces completando así el ciclo (Pawlowski *et al*, 2002).

Cabe resaltar que el hombre puede actuar como un hospedero intermediario “accidental” cuando ingiere material contaminado con los huevos del parásito, las oncosferas son liberadas, penetran la mucosa intestinal, migran a través del cuerpo y se localizan principalmente en el sistema nervioso central causando la neurocisticercosis.

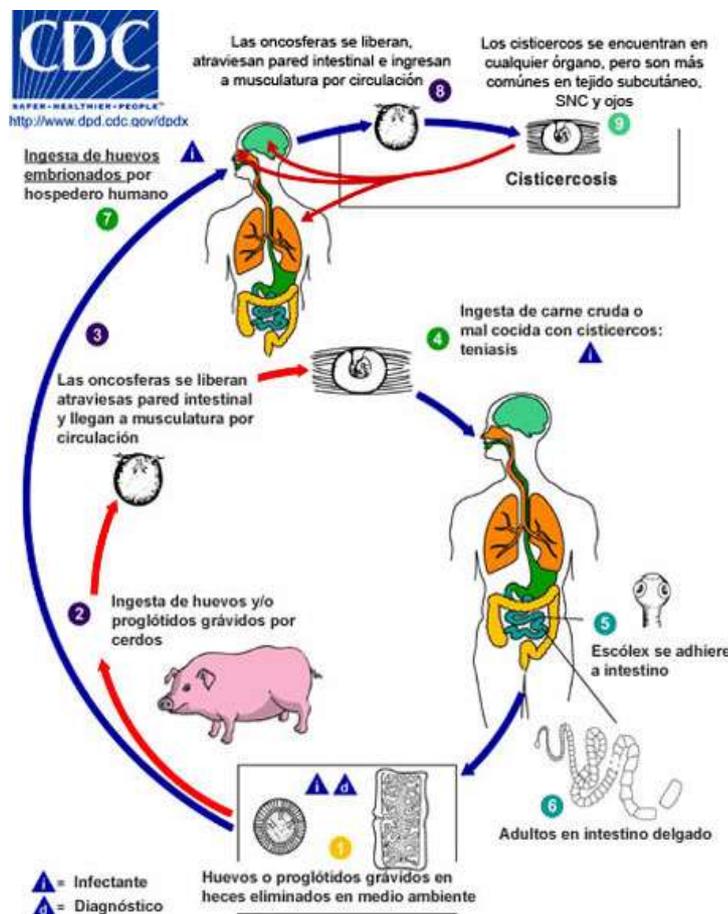


Figura 6.

Ciclo biológico de *Taenia solium*.

2.1.1.3 ANTIGENICIDAD

Los antígenos de diversas preparaciones de cisticercos de *T. solium*, de músculo esquelético de cerdos infectados, han sido empleados para la obtención de las diversas preparaciones antigénicas usadas con fines diagnósticos.

Antígenos totales: Consisten en un extracto total de membranas y escólex y el líquido vesicular, son los antígenos más empleados. Sus componentes han sido caracterizados por Western Blot y por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se ha observado que algunos componentes de estos antígenos son compartidos por varias taenias y son los causantes de las reacciones cruzadas.

Antígenos Purificados: El antígeno B es uno de los principales, su peso molecular oscila entre 95-105 Kd y debido a su afinidad por el colágeno puede purificarse con facilidad y alto rendimiento. Una gran proporción de enfermos de cisticercosis tiene anticuerpos contra el antígeno B, pero dado que está ampliamente distribuido en otros cestodos puede dar reacciones cruzadas (Rivera, 2006)

2.1.1.4 RESPUESTA INMUNITARIA DEL SER HUMANO

Poco se conoce acerca de la inmunología de la cisticercosis, pero se cree que en el hospedero intermediario, el cisticerco puede vivir y evadir la actividad inmunológica por años. La respuesta del huésped parece ser más efectiva contra el estado larval de la parasitosis, e igualmente disminuye el establecimiento parasitario en el huésped.

Respuesta inmune humoral: Existe un conocimiento parcial referente a la respuesta inmune humana respecto al parásito. Así, la respuesta inmune humoral se ha estudiado en enfermos con neurocisticercosis. La mayoría de los pacientes 0%-90% desarrollan una gran variedad de anticuerpos frente al estado larvario, de la clase IgG. Dichos anticuerpos presentes en el suero y líquido cefalorraquídeo son capaces de detectar, tras electroforesis y posterior “Western-Blot”, al menos 50 bandas proteicas diferentes, algunas de ellas específicas de *T. solium*, usando un extracto antigénico completo del parásito (Tsang, 1983). Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes con neurocisticercosis confirmada que no tienen anticuerpos (Larralde et al, 1992). Estos pacientes, negativos serológicamente, por lo general exhiben un único quiste, pocos quistes o formas calcificadas. En este último caso, relacionado con la neurocisticercosis inactiva, se sabe que los anticuerpos desaparecen de forma natural tras la calcificación del cisticerco (García *et al*, 2003).

Respuesta inmune celular: Por otro lado, existen pocos estudios de la respuesta inmune celular en cisticercosis. Así, se ha podido observar un incremento en linfocitos CD8+, una disminución de IFN- γ y una activación policlonal de los linfocitos B. También se ha observado un aumento de interleuquina 12 (IL-12), así como el predominio de IL-5 e IL-10 en líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis activa (Rodríguez, 2012).

Se han planteado diferentes teorías relacionadas con las posibles estrategias desarrolladas por el parásito para evitar dicha reacción inmune local. Para sobrevivir el parásito desarrolla diversos mecanismos de evasión y depresión de la respuesta inmune: establecimiento en sitios

inmunológicamente privilegiados, como el ojo y el cerebro; enmascaramiento de la respuesta inmunitaria, al cubrirse con anticuerpos del hospedador; producción de moléculas que suprimen o desvían la respuesta inmunitaria y procesos de mutagénesis. Algunos de estos mecanismos, incluyen también la inactivación del sistema de complemento, la disminución en el número de linfocitos, la liberación de enzimas con gran potencial lítico de tejidos del hospedador y la producción y liberación de inhibidores de la respuesta inflamatoria (Damián, 1987). También presenta mimetismo molecular con proteínas del hospedador, lo que dificulta el reconocimiento por el sistema inmune innato y específico de los hospedadores animales.

En NCC más del 95% de los pacientes exhibe respuesta humoral frente a antígenos basados en carbohidratos y el tegumento de *T. solium* es rico en glicoproteínas. El tegumento de *T. solium* consiste en un sincytio organizado en dos zonas: un área anucleada denominada citoplasma distal y un área nucleada conocida como citoplasma proximal. Mediante marcaje diferencial de las glicoproteínas, se pudo establecer que tanto la liberación rápida como la liberación persistente de los glicoproteínas tegumentales, juegan un papel clave en la inmunomodulación por el parásito, incluyendo la evasión de respuesta inmune y las secuelas inflamatorias de larga evolución observada en los pacientes con NCC.

La superficie externa del parásito responde dinámicamente a los cambios del medio ambiente en el hospedador, además la alta antigenicidad de los GCs de *T. solium* pueden jugar un papel en reacciones de hipersensibilidad y en última instancia en los síntomas de la enfermedad. Estos resultados fueron corroborados en los modelos murino, porcino y humano de NCC (White et al., 1997).

2.1.1.5 EPIDEMIOLOGÍA

La cisticercosis ha sido denominada como una parasitosis perteneciente al tercer mundo (García *et al*, 2000); aun cuando la diferencia es notable, naciones desarrolladas como Rusia, China, Polonia y España, entre otras, reportan casos de esta parasitosis con relativa frecuencia. De cualquier forma, la frecuencia es mucho mayor en los países de Latinoamérica, Asia y Europa del Este, probablemente como resultado de pobres condiciones de vida, malos hábitos higiénicos e inadecuado control sanitario en la cria de cerdos.

En América, los estudios de seroprevalencia basados en la detección de anticuerpos con la técnica de Western blot (WB) mostraron las siguientes valores: 2-9% en Bolivia (Jafri *et al*, 1998), 5-11% en México (Sarti *et al*, 1999), 7-24% en Perú, 10-17% en Guatemala (Allan *et al*, 1996) y 34% en Honduras (Sánchez *et al*, 1997). Adicionalmente, en Brasil, Colombia, Ecuador y Perú la neurocisticercosis es causa importante de epilepsia de inicio tardío (Carpio, 2002).

Respecto a la distribución de los pacientes según el lugar de nacimiento y procedencia, en Perú, existe mayor frecuencia en pacientes nacidos en Lima, la zona de sierra (Ayacucho / Cajamarca / Junín / Huancavelica / Apurímac) y costa norte (La Libertad / Piura / Ancash) (Escalante, 1973) y en la selva alta (San Martín, Amazonas); por lo que se considera que toda la sierra, la costa norte, y la selva alta son las zonas de mayor endemicidad en el Perú (García, 1989).



Figura 7.

Zonas endémicas de NCC en el Perú.

2.1.1.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico específico de la cisticercosis implica la demostración histológica de la presencia del parásito en el individuo afectado, solamente posible en los casos de cisticercosis subcutánea, ocular y en algunos casos de cisticercosis cerebral que mantienen indicación quirúrgica como los quistes únicos superficiales, susceptibles de ser extirpados por abordaje directo (Escobedo et al 1982). La alternativa restante es la opción de la prueba terapéutica, probablemente menos riesgosa y de mayor beneficio para el paciente. La confirmación histológica de la parasitosis no es posible en la gran mayoría de los casos, y la variada gama de presentación clínica de esta enfermedad no permite hacer un diagnóstico con solamente ésta base, obligando al médico a apoyarse en los datos epidemiológicos, de laboratorio (serológicos y/o moleculares) y radiológicos a fin de corroborar su opinión

2.1.1.6.1 DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES

Los exámenes radiológicos incluyen radiografía simple de cráneo y radiografías de partes blandas, además de la tomografía axial computarizada (TAC) y las imágenes por resonancia magnética (RM).

Radiografía Simple: Es un procedimiento sencillo y de bajo costo, aunque raramente proporciona información de gran utilidad. Probablemente las alteraciones más frecuentemente encontradas son aquellas relacionadas con hipertensión intracraneana.

Radiografía con contraste: La arteriografía cerebral, carotídea y/o vertebral, procedimiento antes muy usado, puede ser de ayuda en situaciones específicas, como descartar un proceso vascular asociado a neurocisticercosis.

Tomografía Axial Computarizada (TAC): Representa un importante avance en el diagnóstico, por su condición de procedimiento no invasivo, su alta sensibilidad y su capacidad para exponer los tejidos blandos intracraneales y el sistema ventricular. Los quistes viables se observan en la TAC como imágenes hipodensas, bien delimitadas y ocasionalmente con una pequeña imagen hiperdensa anexa, correspondiente al escólex. Las calcificaciones se visualizan como imágenes hiperdensas nodulares o puntiformes, dado que corresponden a quistes muertos que han experimentado degeneración y depósitos de calcio (Lobato, 1981).

Imágenes por Resonancia Magnética (RM): La RM utiliza un campo magnético de gran intensidad, lo que hace que los tejidos emitan una señal que permite una gran definición de imagen. Es superior a la TAC en el diagnóstico de imágenes. De otro lado, la señal exagerada que produce el calcio en la TAC hace que la TAC sea superior a la RM en el diagnóstico de calcificaciones.

2.1.1.6.2 DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Se han desarrollado diversas pruebas a fin de evaluar la respuesta inmunológica a esta parasitosis, que incluyen inmunoelectroforesis (Flisser *et al*, 1975), doble inmunodifusión inmunofluorescencia indirecta (Gomez, 1981), hemaglutinación Indirecta (Rabiela, 1985), reacción de fijación del complemento (Slais, 1970) y ELISA (Larralde, 1992). Todos ellos presentan de alguna forma reacciones cruzadas principalmente con hidatidosis.

La prueba de ELISA para cisticercosis tiene aceptable rendimiento cuando se utiliza LCR, pero no con suero. La introducción de la técnica de Inmunoelectrotransferencia (Western Blot), proveyó una prueba de mejor rendimiento, superando el 95% de sensibilidad y especificidad, tanto en suero como en LCR (Tsang, 1989); es por ello que es considerada la actual “prueba de oro”, la cual combina el gran poder de resolución del SDS-PAGE y la sensibilidad del ELISA para el estudio de la detección de la unión de antígeno-anticuerpo.

En este método, las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana. Trabajar con las proteínas fijadas sobre una membrana tiene ventajas sobre emplearlas dentro del propio gel (Yábar, 2003):

- Son más rápidas de teñir.
- Se detectan cantidades menores de proteínas pues se concentran en la superficie y no se diluyen en todo el espesor del gel

- Las membranas son mucho más fáciles de manipular que el propio gel.
- Alta especificidad, en la determinación de la respuesta inmune a determinados antígenos de los microorganismos.

Como desventajas tenemos:

- Requiere de una intensa y delicada labor que puede durar varios días.
- Los resultados necesitan ser interpretados usando un criterio estricto ya que se basa en la observación de bandas coloreadas.

2.1.1.6.2.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA DIAGNÓSTICO

Los anticuerpos presentes en el suero sanguíneo se incuban con tales antígenos y la detección de los anticuerpos reaccionantes se hace por medio de segundos anticuerpos marcados con enzimas, específicos contra el anticuerpo que se quiere identificar. La reacción de la enzima unida al segundo anticuerpo con un substrato correspondiente, da como resultado una reacción colorimétrica que al ser cuantificada permite determinar la cantidad de anticuerpos reaccionantes con el antígeno.

Es importante tener en cuenta que la detección de anticuerpos indica exposición a la infección y no necesariamente una infección activa, ya que los anticuerpos pueden persistir por mucho tiempo después que el parásito ha sido eliminado, bien por el sistema inmune o por tratamiento (García, 2003). En zonas endémicas, más del 10% de la población puede tener anticuerpos anti-*T.solium* y no reflejar la verdadera prevalencia de la cisticercosis.

Durante años, la mayoría de los ensayos para la detección de anticuerpos han utilizado como antígeno extractos crudos o fluido vesicular del parásito (Larralde, 1992), pero estas pruebas carecen de la adecuada sensibilidad y especificidad debido a la gran reactividad cruzada con otras parasitosis, tales como hidatidosis, esquistosomiasis, himenolepiasis, y otras helmintiasis.

2.1.1.6.2.2 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO

Las moléculas de los agentes patógenos que son reconocidas por el sistema inmune se conocen con el nombre de antígenos. Las moléculas antigénicas son complejas y están compuestas por porciones o determinantes antigénicos que comprenden, en la mayoría de los casos, varios aminoácidos o glicoproteínas de pequeño tamaño. A nivel molecular, el sistema inmune posee una gran capacidad de discriminación. Los determinantes antigénicos pueden estar repetidos en muchos microorganismos, es decir, un antígeno determinado se repite en varias bacterias o en varios parásitos (Rodríguez *et al*, 2012).

Además, debido a la "reacción cruzada" que exhiben los determinantes antigénicos se ha visto que personas infectadas o no infectadas pueden tener anticuerpos naturales que reconocen muchos antígenos. De ahí que para la medicina es de vital importancia la detección, diferenciación y caracterización bioquímica de los determinantes antigénicos que son exclusivos para cada uno de los agentes patógenos para el hombre (Gilman, 2000).

Las técnicas de inmunodiagnóstico incluyen la detección de antígenos circulantes del parásito y de anticuerpos anti-cisticercosis tanto en suero como en líquido céfalo-raquídeo (LCR) y

resultan de gran utilidad para la identificación de cisticercosis (Del Brutto *et al*, 1992). Se han obtenido antígenos purificados, sintetizados y clonados. Algunos de los antígenos utilizados en el inmunodiagnóstico se encuentran descritos en la tabla 2.

Tabla 2.

Principales antígenos identificados para el inmunodiagnóstico de NCC

Antígeno	Preparación	Autor/Año	Descripción
Antígeno B	Corresponde a paramiosina, una proteína de músculo del ténido. Antígenos de 21, 18, 14 kd	Plancarte et al., 1983	Describió por primera vez antígeno B
		Lanotte et., 1991	Paramiosina de <i>Taenia solium</i>
		Greene et al., 2000	Corresponde a antígenos de bajo peso molecular (8-30 kd) y los anticuerpos reaccionan principalmente con el extremo carboxilo-terminal de la molécula
		Sciutto et al., 2007	Detección de anticuerpos en LCR en pacientes con NCC
Catepsina L	Se purifica del líquido intraquistico del cisticerco mediante precipitación y concentración con etanol. Esta se separa por exclusión de tamaño mediante cromatografía y finalmente se selecciona por cromatografía de intercambio iónico.	Zimic et al., 2009	Corresponde a una Endopeptidasa lisosómica secretada por el parásito. Ag de 53 y 25 kd. Útil por ELISA y para WesternBlot.
Antígeno de Excreción/ Secreción de oncosferas	Las oncosferas (embriones hexacantos) provenientes de cerdo se lavan con medio de cultivo esencial mínimo (MEM). Se incuban con presencia de penicilina y gentamicina. Cada día se centrifugan y el sobrenadante (antígeno de excreción/secreción) se colecta. Se le determina la concentración de proteínas por el método de Bradford	Verastegui et al., 2003.	Proteínas 22.5 y 32 Kd. Reactividad 95.5% entre portadores de <i>Taenia solium</i> . Reactividad 20% en casos de NCC.

Antígeno somático	<p>Proteínas de 10 a 26 kd.</p> <p>Extracto de quiste de cisticerco, previamente liofilizados.</p> <p>El extracto (antígeno) se obtiene de quistes de larva de <i>Taenia solium</i> (cisticercos) realizando homogenización y extracción de lípidos con éter anhidro y solución reguladora de veronal o con solventes orgánicos (éter-acetona 1:1) en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 25 mM).</p>	Kagan & Agosin, 1968	Primera descripción
		Lopez et al., 1988	<p>Estandarización y evaluación de prueba ELISA usando antígeno somático. (INS)</p> <p>En suero</p> <p>Sensibilidad: 100%</p> <p>Especificidad 97.6%</p> <p>En LCR</p> <p>Sensibilidad : 100%</p> <p>Especificidad 100%</p>
		Pinilla et al., 2003	<p>EITB pacientes Colombianos, sanos y con NCC.</p> <p>En suero:</p> <p>Sensibilidad 79%</p> <p>Especificidad 85%</p> <p>En LCR:</p> <p>Sensibilidad 85%</p> <p>Especificidad 100%</p> <p>No reacciones cruzadas</p>
Glico proteínas	<p>Se obtienen de quistes extraídos de tejido porcino, homogenizados y parcialmente purificados sobre una columna de lectina de lenteja-sefarosa®.</p> <p>El resultado es un grupo de glicoproteínas (LLGP)</p> <p>Separadas por electroforesis resultadndo en siete antígenos de: 13 kd, 14 Kd, 18 Kd, 21 Kd, 24 kd, 39-42 kD y 50 Kd.</p> <p>Método de Bradford.</p>	Tsang et al., 1989	<p>GP21, GP18, GP14 y GP13.</p> <p>EITB en suero ó LCR de pacientes con NCC.</p> <p>Sensibilidad 98%.</p> <p>Epecificidad 100%.</p> <p>Cualitativas</p>
		Ito et.,al 1998	<p>GP 10-26 Kd de quiste intacto ó fluido intraquistico</p> <p>Alta sensibilidad y especificidad en suero ó LCR de pacientes con NCC.</p> <p>No reacción cruzada. Cualitativa</p>

Proteínas sintéticas	<p>No dependen de la extracción del antígeno nativo.</p> <p>Inmunodiagnóstico cuantitativo.</p> <p>Pertenece al complejo LLGP.</p>	Ito et al., A5 1998	Se ha evaluado péptidos sintéticos logrando especificidad pero no sensibilidad.
		Scheel et al., 2006	<p>Antígenos del LLGP: 13,14,18 y 21kd.</p> <p>Proteínas de la familia de 8 kd:</p> <p>TS14, TS18var1, TSRS1 y TSRS2var1</p> <p>Pacientes con NCC y pacientes sanos nunca expuestos.</p> <p>Usando ELISA: S y E mayor que el EITB de LLGP.</p> <p>Usando WesternBlot tiene similar E y S que EITB de LLGP</p>
Antígenos recombinantes y Genes que codifican antígenos	<p>Los genes que codifican antígenos de bajo peso molecular se clonan de genotecas de expresión de cisticercos de <i>Taenia solium</i>.</p> <p>Algunos antígenos recombinantes se obtienen en el sistema de expresión de virus ó bacterias</p>	Tsang., 1989	<p>Ag recombinantes</p> <p>rT24H específicos para cisticercosis</p> <p>rES33 específico para tenosis producidas por CDC</p>
		Sako et al., 2000	<p>Proteínas recombinantes:</p> <p>Ag1, Ag1V1, Ag2, Ag 2V1.</p> <p>Usando sistema de expresión <i>E.coli</i></p> <p>Sensibilidad 97% , Especificidad 98%; En NCC crónica disminuye un 14%.</p>
		García et al., 2006	<p>Proteín rGP50.</p> <p>Mediante el sistema de expresión de baculovirus.</p> <p>Con EITB con sueros de pacientes de NCC:</p> <p>Sensibilidad 90%</p> <p>Especificidad 100%</p>
Antígenos recombinantes y Genes que codifican antígenos	<p>Los genes que codifican antígenos de bajo peso molecular se clonan de genotecas de expresión de cisticercos de <i>Taenia solium</i>.</p> <p>Algunos antígenos recombinantes se obtienen en el sistema de expresión de virus ó bacterias</p>	Hancock et al., 2006	<p>Clonación y expresión del Ag T24 del complejo LLGP.</p> <p>Con EITB con sueros de pacientes de NCC con dos ó más quistes viables:</p> <p>Sensibilidad 94%</p> <p>Especificidad 98%</p>
		Ferrer et al., 2007	<p>Proteínas recombinantes: Ts8B1, Ts8B2, Ts8B3 Sensibilidad 96%, Especificidad 91.5%</p>

Se han desarrollado varios ensayos para la detección de antígenos circulantes tanto en suero como en LCR y algunos en orina, pero los mejores son los basados en el uso de anticuerpos monoclonales.

Uno de los antígenos mejor caracterizados del cisticerco de *T. solium* es el antígeno B (AgB). AgB fue identificado como un arco de precipitación en inmunoelectroforesis al confrontar un extracto de cisticercos con sueros de pacientes con neurocisticercosis y fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos de los sueros de pacientes con la enfermedad (Flisser et al., 1975). Estudios moleculares demostraron que AgB corresponde a paramiosina, una proteína de músculo del ténido (Laclette et al., 1991). Las glicoproteínas han sido señaladas como antígenos específicos en cisticercosis, al respecto Tsang et al. (1989) logró purificar por cromatografía de afinidad con lectina de lenteja, siete glicoproteínas (GP13, GP14, GP18, GP21, GP24, GP39-42, GP50) de metacéstodes de *T. solium*, que exhibían un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad en el diagnóstico de cisticercosis, empleándolas en la técnica de EITB. Dicho ensayo fue reconocido por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como el método inmunológico de elección para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis.

Los antígenos de excreción/secreción (E/S) de cisticercos de *T. solium* también han sido evaluados en el diagnóstico de la enfermedad, obteniendo buenos resultados. Posteriormente se ha descrito que antígenos de E/S de 14 y 18 kDa son reconocidos por sueros de pacientes con cisticercosis, y un anticuerpo monoclonal anti-E/S es capaz de detectar estos antígenos en LCR de pacientes con cisticercosis. A su vez se debe destacar que los antígenos E/S han mostrado tener la capacidad de discriminar entre cisticercosis activa e inactiva (Sahu, 2014).

Los antígenos de bajo peso molecular de cisticercos de *T. solium* (8-30 kDa) han sido muy estudiados debido a su alta especificidad (Lee, 2008).

2.1.1.6.3 PROTEÓMICA APLICADA AL DIAGNÓSTICO

En las últimas décadas se han realizado esfuerzos para caracterizar antígenos que puedan mejorar la especificidad de los ensayos y utilizar estos antígenos purificados en el inmunodiagnóstico de la enfermedad. El proteoma es definido como el conjunto de proteínas expresadas por el genoma; en la actualidad la proteómica es una ciencia madura posterior al campo de investigación de la genómica y no solo tiene por objetivo el estudio de las proteínas producidas por una célula sino también sus isoformas, modificaciones, estructuras e interacciones (Martins-de Souza, 2014).

El proteoma está formado con todas las proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo. La proteómica es una rama de la genómica que estudia los proteomas, es decir, la identificación de las proteínas, el conocimiento de su estructura primaria (secuencia de a-a), la identificación de sus modificaciones postraduccionales, su localización y la cuantificación de la expresión proteica (proteómica cuantitativa).

La principal herramienta de la investigación proteómica es la espectrometría de masas (EM), una tecnología que incluye la instrumentación (espectrómetros de masas), los métodos de adquisición y los softwares de análisis de datos. Los espectrómetros de masas constan de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. De la combinación de estos tres elementos depende la sensibilidad, exactitud y nivel de confianza que se tiene en la identificación de una proteína. La EM es una técnica analítica que mide la relación masa/carga de una molécula (Reamtong, 2013).

Los enfoques de proteómica y nanotecnología son herramientas valiosas para detectar patógenos y marcadores de alteración del hospedador dentro de las plataformas de detección de microfluidos. Estos nuevos dispositivos podrían proporcionar soluciones novedosas para combatir las enfermedades parasitarias. Los nuevos productos específicos derivados de parásitos con propiedades inmunomoduladoras se han postulado como los mejores candidatos para la detección temprana y precisa de infecciones parasitarias, así como para el bloqueo del desarrollo del parásito (Nhancupe, 2016).

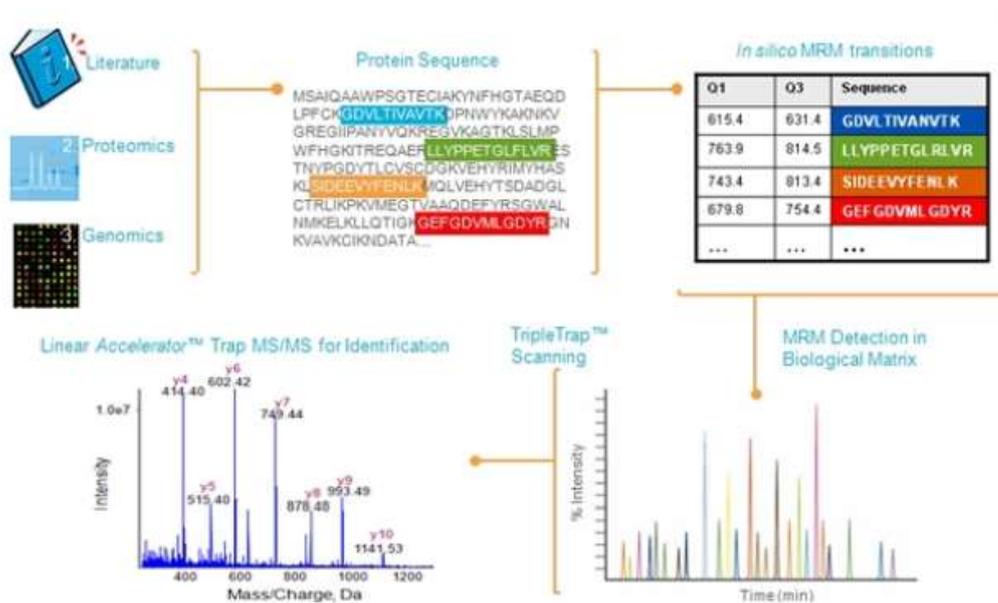


Figura 8.

Proceso de identificación de proteínas a partir de un análisis de espectrometría de masas.

III. MÉTODO

3.1 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales de isotipo IgM fueron purificados a partir de sobrenadante de cultivo celular mediante el uso de partículas magnéticas ligadas a proteína L (Thermo Scientific 8849), esta es una proteína recombinante utilizada por su afinidad a las cadenas ligeras de tipo kappa de los anticuerpos de humano y ratón. La purificación del sobrenadante de cultivo celular se optimizó teniendo en cuenta los siguientes parámetros: cantidad de partículas magnéticas, concentración de muestra a purificar y rendimiento de partículas magnéticas. Para todos los ensayos se siguió un protocolo general y se modificó de acuerdo a los parámetros de evaluación. Se probaron los parámetros de concentración de muestra: 50 ul de sobrenadante de cultivo concentrado 50 veces por el método de Minicon y 50 ul de sobrenadante de cultivo celular sin concentrar, ambos con 450 ul de Buffer de unión (TBS-Tween 0.05%). También se probó 2.5 ml de sobrenadante de cultivo con y sin buffer de unión. Para determinar la cantidad de partículas magnéticas óptima, se probaron dos cantidades de partículas de 0.0125 mg y 0.0375 mg. Se evaluaron también purificaciones sucesivas con las mismas partículas para evaluar su rendimiento.

Para realizar la purificación se colocaron las cantidades descritas anteriormente de las partículas magnéticas en un vial con 500 ul de buffer TBS Tween 0.05%, se homogenizó con movimientos suave, se colocaron en el soporte magnético para coleccionar las partículas y se descartó el sobrenadante. De esta manera se repitió el lavado por dos veces más. Se agregó la muestra de sobrenadante de cultivo celular, previamente filtrado (Millipore 0.45 μm), y se incubó durante una hora en rotor. El sobrenadante de cultivo fue retirado y guardado para posteriores análisis. Se agregó 300 ul de buffer de elución (Glicina 0.1M pH 2) e incubó durante 45 minutos. Se colectó el sobrenadante que contenía a los anticuerpos eluidos y se agregó 45 ul de buffer de neutralización (Tris 1M pH 8.8). Las partículas fueron lavadas y guardadas en 150 ul de PBS Tween 0.05% Azida de Sodio 0.05% a 4°C para ser reutilizadas.

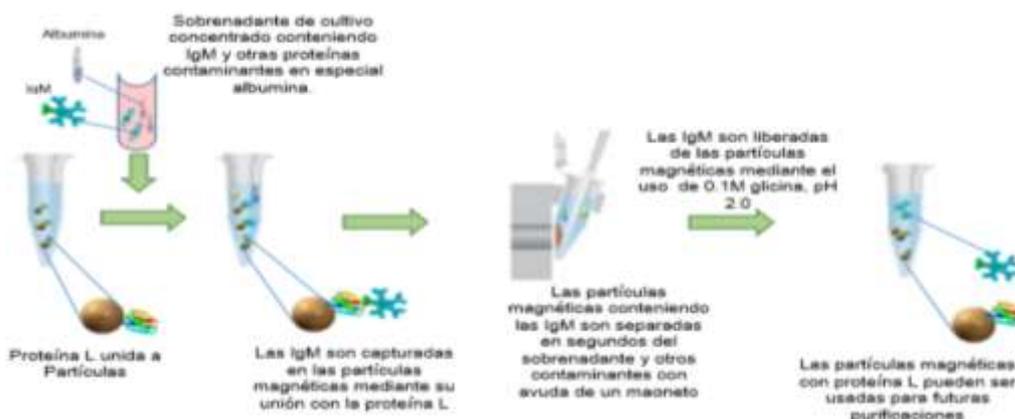


Figura 9.

Procedimiento de purificación con beads proteína L.

Los anticuerpos monoclonales resuspendidos en la solución de Tris-Glicina se concentraron e intercambiaron al buffer PBS mediante el uso de Amicon Ultracell 10K, este método es un tipo de concentración por ultracentrifugación donde las proteínas mayores a 10 kDa (como los anticuerpos) se quedan suspendidas en la parte superior del tubo y las de menos tamaño pasan a través de la membrana hacia la parte inferior del tubo. Siguiendo ese principio se colocó 10 ml de anticuerpo purificado en el tubo Amicon Ultracell 10k y se centrifugó a 4000 g por aproximadamente 15 minutos hasta llegar al volumen de 1 ml, se agregó 5 ml de PBS y se volvió a centrifugar, se repitió este intercambio de buffer 3 veces, hasta llegar al volumen de 500 ul.

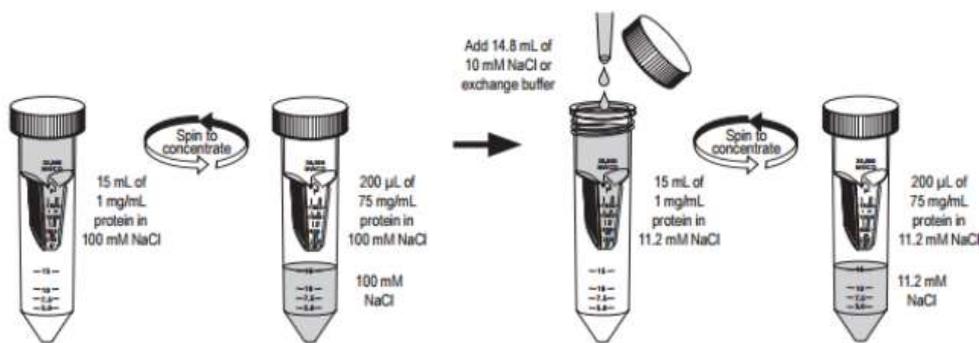


Figura 10.

Procedimiento de concentración con Amicon Ultracell 10K. (Tomado de Millipore ©)

La cuantificación de anticuerpos monoclonales purificados se realizó mediante el método de Lowry con el kit DC Protein Assay, basado en la reacción del tartato de cobre alcalino y el reactivo de Folin con la presencia de tirosina y triptófano de los aminoácidos, y también se utilizó una curva estándar de Gamma globulinas de 0-2000 ug/ml. Se agregó 5 ul de cada concentración de la curva estándar en los pocillos de la placa, por duplicado y se agregó 5 ul de reactivo A, rápidamente se adicionó 200 ul de reactivo B y se dejó incubando en oscuridad y movimiento constante durante 15 minutos. Finalmente, se realizó la lectura a 650 nm en el espectrofotómetro y con el programa Softmax Pro 4 se obtuvieron los valores estimados de la concentración de cada anticuerpo.

El control de calidad de los anticuerpos monoclonales purificados se realizó mediante la técnica de ELISA, Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot. Para la primera técnica se realizó un ELISA de tipo indirecto, para lo cual se sensibilizó una placa con 100 ul de antígeno somático de quiste de *T.solium* [5 ug/ml] resuspendido en buffer Bicarbonato y se incubó 2 horas a temperatura ambiente en movimiento. Luego de lavar con 170 ul de PBS-Tween 0.05%, se bloqueó con 200 ul de PBS Tween 0.05% leche 5% e incubó 30 min a 37°C en movimiento, luego se adicionó 100 ul de anticuerpo monoclonal purificado y concentrado a una dilución de 1/10 y se incubó durante 45 minutos. Se agregó el 100 ul de conjugado anti IgM mouse - Biotinilado (dilución 1/4000) y se incubó 30 minutos, se añadió 100 ul de Streptavidina-HRP (dilución 1/10000), se incubó 15 minutos y finalmente la reacción se evidenció con 100 ul del

sustrato TMB (Tetrametilbenzidina), el cual se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La lectura se realizó en el espectrofotómetro a 650 nm.

También se realizó una corrida en SDS-PAGE en un gel de 15% para evidenciar bandas que representen al anticuerpo IgM. El gel se coloreó con Azul de Coomasie.

3.2 CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Los Dynabeads® M-270 Epoxy M-270 son partículas magnéticas (beads magnéticos) que tienen una medida de 2.8 μm , conteniendo en su superficie el grupo epoxy, lo que le permite unirse covalentemente a través de un enlace de tipo amino primario a los grupos sulfhidrilo de las proteínas o péptidos sin alterar su estructura o funcionalidad; estas características hacen a estas partículas magnéticas ideales para el acoplamiento de anticuerpos, proteínas y enzimas funcionales. Además poseen una superficie hidrofílica que ayuda a la dispersión y fácil manejo con una amplia variedad de buffers. Para el acoplamiento de las partículas magnéticas a los anticuerpos monoclonales purificados se utilizó el kit Dynabeads® Antibody Coupling, se conjugó 25 μg de anticuerpo monoclonal (IgM) con 2.5 mg de Dynabeads® M-270 Epoxy siguiendo las instrucciones del proveedor: Los beads fueron lavados 3 con ayuda del magneto y el buffer C1, se agregó el volumen de anticuerpos correspondiente a 2.5 mg y se completó hasta 250 μl con buffer C1, se homogenizó manualmente por 1 minuto y se agregó 250 μl de buffer C2 para obtener un volumen final de 500 μl en el tubo, finalmente se incubó *overnight* (16-24 horas) a 37°C en movimiento constante. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante y se guardó para posteriores análisis, se realizó un lavado con 800 μl de buffer HB y LB (previamente suplementados con 0.01% de Tween), se realizaron tres lavados más con 800 μl del buffer SB, se resuspendió en 250 μl de este mismo buffer y se guardó a -4°C para su uso.

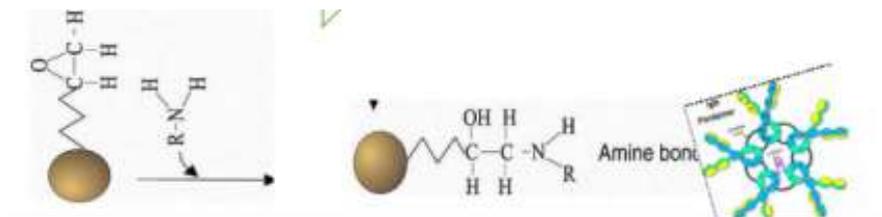


Figura 11.

Enlace tipo amino formado luego de la conjugación del mAb con las partículas magnéticas epoxy.

El control de calidad de la conjugación y determinación de cantidad óptima de beads para posteriores ensayos, se realizó detectando los anticuerpos acoplados a los beads con un conjugado anti IgM en un tubo. Se alicuotó 5, 10 y 15 μl de beads conjugados en 3 tubos y luego de realizar 3 lavados con 500 μl de PBS-Tween 0.05%, se bloqueó con 500 μl de PBS-Tween 0.05% leche 5% durante 45 minutos en rotor. Se agregó 100 μl de conjugado anti IgM mouse - Biotinilado (dilución 1/4000) e incubó 30 minutos, se añadió 100 μl de Streptavidina-HRP (dilución 1/10000) y se incubó 15 minutos a 37°C. Finalmente se agregó 100 μl de sustrato TMB. Se traspasó los 100 μl a una placa de ELISA y se leyó en el espectrofotómetro a 650 nm.

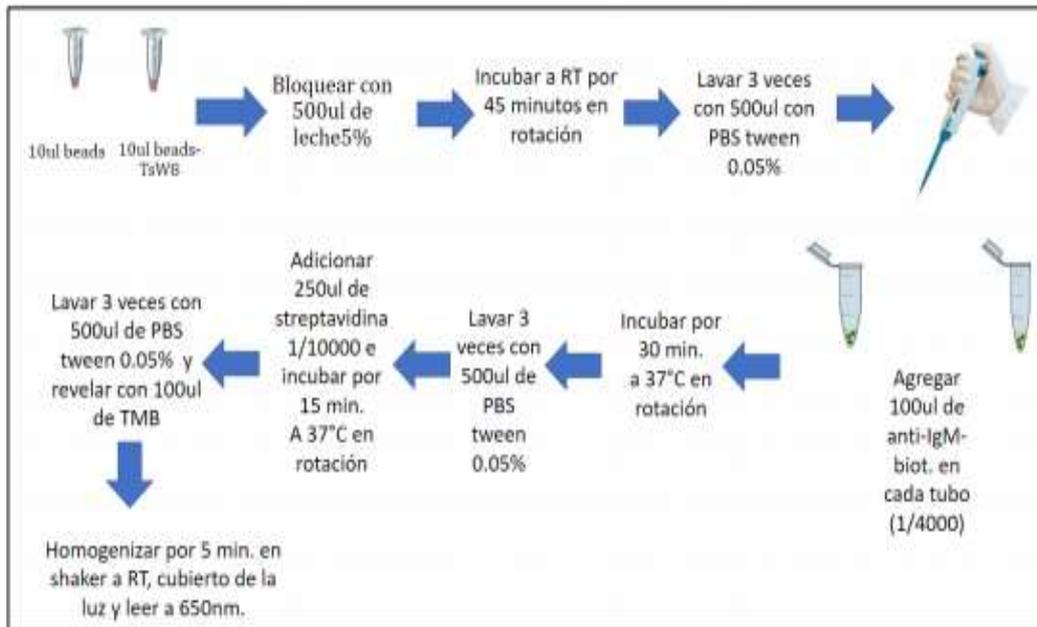


Figura 12.

Proceso del control de calidad de conjugación.

Se realizó el control de calidad también mediante la técnica de Western Blot, eluyendo el complejo beads-mAb con 15 ul de sample buffer (Glicerol, Azul de bromofenol, SDS y DTT) y calentando a 96°C por 5 min en baño maría, con la ayuda del magneto se retiró el sobrenadante y se corrió en un gel de acrilamida de 15%. Luego se transfirió a un papel de nitrocelulosa y se incubó *overnight* con conjugado anti IgM mouse, se realizaron 3 lavados con PBS Tween 0.3% y 2 con PBS de 5 minutos cada uno. Se reveló con una solución de DAB (Diaminobencidina), Peróxido de hidrógeno y PBS, se incubó durante 15 minutos hasta observar la aparición de bandas de color marrón.

3.3 CONJUGACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS-mAb CON ORINA

Las partículas magnéticas se conjugaron con pool de orina positiva de pacientes con neurocisticercosis, para comprobar la capacidad de captura de los anticuerpos monoclonales acoplados a partículas magnéticas se realizó un control de calidad mediante la técnica de ELISA-bead based. Para ello, se colocó 5 ul de beads conjugados en cada pocillo de la placa y se lavó 3 veces con PBS Tween 0.05% con la ayuda de un lavador magnético. Se bloqueó con 150 ul de PBS Tween 0.05% NBCS 1% durante 15 minutos a 37°C, luego se colocó el lavador magnético debajo de la placa y se esperó a que los beads se unan formando un botón, se descartó el sobrenadante y se agregó 100 ul de pool de orina positiva y negativa, se incubó 15 minutos a 37°C en movimiento y luego se colocó la placa a 4°C *overnight*. Al día siguiente, se lavó 3 veces, se agregó 100 ul [5 ug] de anticuerpo monoclonal contra *T. solium* biotinilado y se incubó 45 minutos a 37°C en movimiento. Se adicionó 100 ul de Streptavidina-HRP (1/10000) y se incubó 15 minutos. Para terminar, se agregó 100 ul de TMB y luego de incubarlo 5 minutos

en oscuridad, se adicionó 50 ul de solución de parada (HCl 1N) y se leyó en el espectrofotómetro a 450 nm.

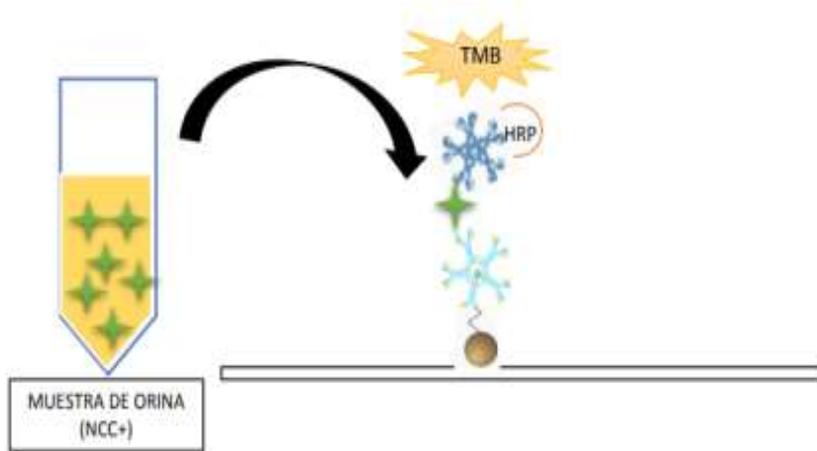


Figura 13.

Esquema de captura y detección del antígeno en orina. (Derecha) Complejo formado en el ELISA ELISA-bead based.

Para obtener el complejo bead-mAb-antígeno, se alicuotó 5 ul de beads conjugados por tubo y se lavó 3 veces con 500 ul de PBS Tween 0.05% con la ayuda de un magneto, se bloqueó con PBS Tween 0.05% leche 2% durante 2 horas en rotor a temperatura ambiente. Se conjugaron varios volúmenes de pool de orina (1 ml, 1.5 ml y 5 ml) con los beads y se incubó *overnight*. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los beads en 20 ul de PBS para luego ser eluidos.



Figura 14.

Proceso de conjugación de partículas magnéticas epoxy-mAbs a muestras de orina.

3.4 ELUCIÓN DE ANTÍGENO CAPTURADO

Para eluir el antígeno del complejo formado en la conjugación se probaron varios métodos de elución: denaturantes (DTT, Urea 7M, EDTA-SDS, CTAB-SDS), no denaturantes por bajo pH (Glicina 0.2 M, Ácido cítrico 0.01M) y no denaturantes por fuerza iónica (Acetato). Se retiró los 20 ul de PBS en los que fueron resuspendidos los beads con la ayuda del magneto, y se adicionó 20 ul de cada solución para eluir, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente en movimiento y luego se calentaron a 96°C por 10 minutos. Se colocaron los tubos en el magneto y los 20 ul de eluidos se traspasaron a tubos limpios, neutralizando con 3.75 ul de buffer Tris-HCl 1M pH 8.8.

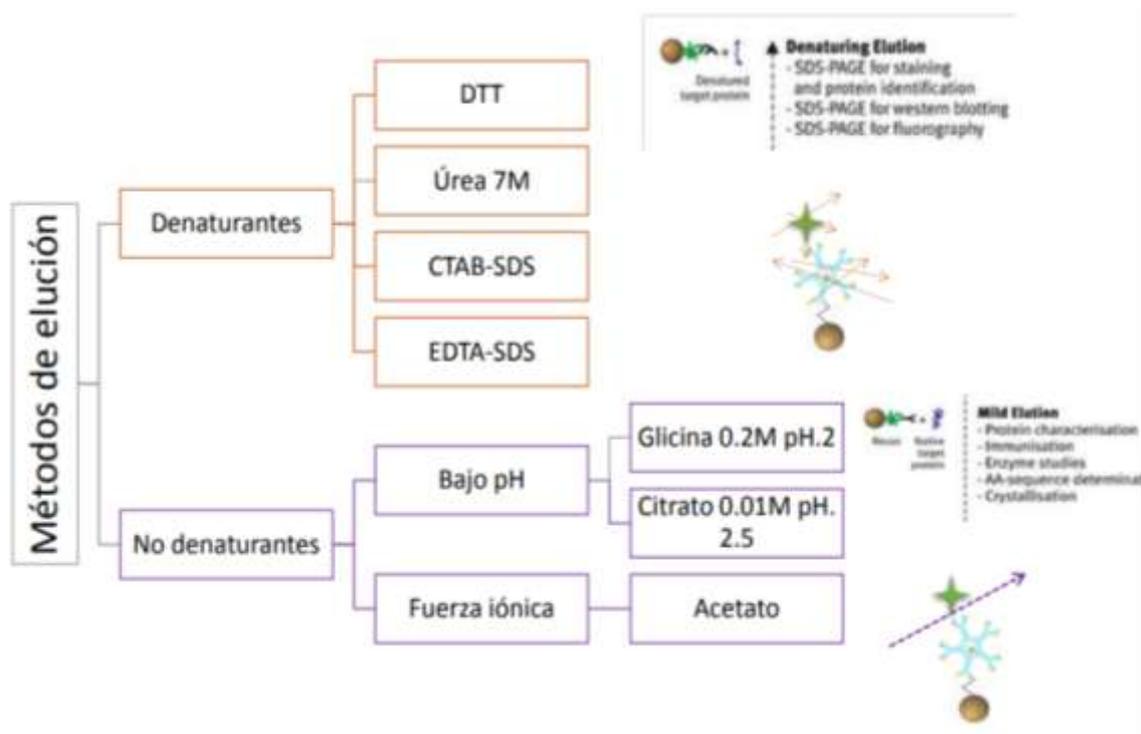


Figura 15.

Esquema de los métodos de elución utilizados en el estudio.

El control de calidad de las eluciones se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida de gradiente de 15-25 % y geles de 18%, y evaluando el sobrenadante post-conjugación mediante un ELISA directo con anticuerpos monoclonales utilizando anticuerpo monoclonal biotinilado como detección.

3.5 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La caracterización del antígeno eluido se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida de 18% y 15-25%. Se adicionó a cada tubo de eluido 2.5 ul de sample buffer no denaturante (glicerol, SDS, azul de bromofenol) y se homogenizó. Se cargó 15 ul en cada pocillo del gel y se corrió a 5 mA por gel en la fase stacking y 7.5 mA por gel

en la fase de resolving. Al finalizar la corrida, se retiró el gel de los vidrios y se realizó la coloración con nitrato de plata con el kit Silver Stain BioRad ©, para el cual se incubó el gel en una solución fijadora *overnight* en movimiento constante. Luego, se enjuagó con agua ultra pura y se agregó la solución Oxidizer durante 8 minutos, se realizaron lavados durante 15 minutos hasta retirar la coloración naranja del gel y se agregó la solución de nitrato de plata por 20 minutos, se realizó un lavado rápido de 2 minutos y finalmente se agregó la solución Developer y se dejó incubando por 40 minutos, cambiándola continuamente. Cuando las bandas del gel aparecieron, se detuvo la reacción con solución de parada (ácido acético 5%).

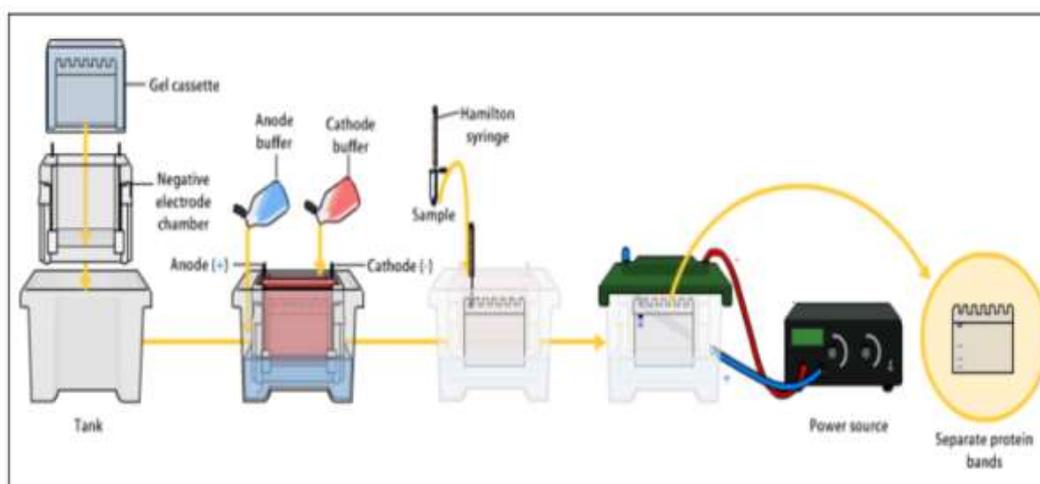


Figura 16.

Procedimientos para la electroforesis SDS-PAGE.

3.6 WESTERN BLOT

Luego de realizar la corrida electroforética, los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa de 7x7cm, se transfirió a 2 A° durante 2 horas. Al finalizar la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con PBS-Tween 0.3%. La membrana de nitrocelulosa transferida, se incubó *overnight* con sobrenadante de cultivo celular de anticuerpo monoclonal IgM diluido 1/5 con PBS Tween 0.3% leche 1%. Al día siguiente, luego de lavar se agregó el conjugado anti IgM mouse (dilución 1/4) y se incubó durante 2 horas en movimiento. Luego se agregó streptavidina-HRP (dilución 1/10000) e incubó por 30 minutos. Para evidenciar las bandas, se adicionó la solución reveladora con DAB.

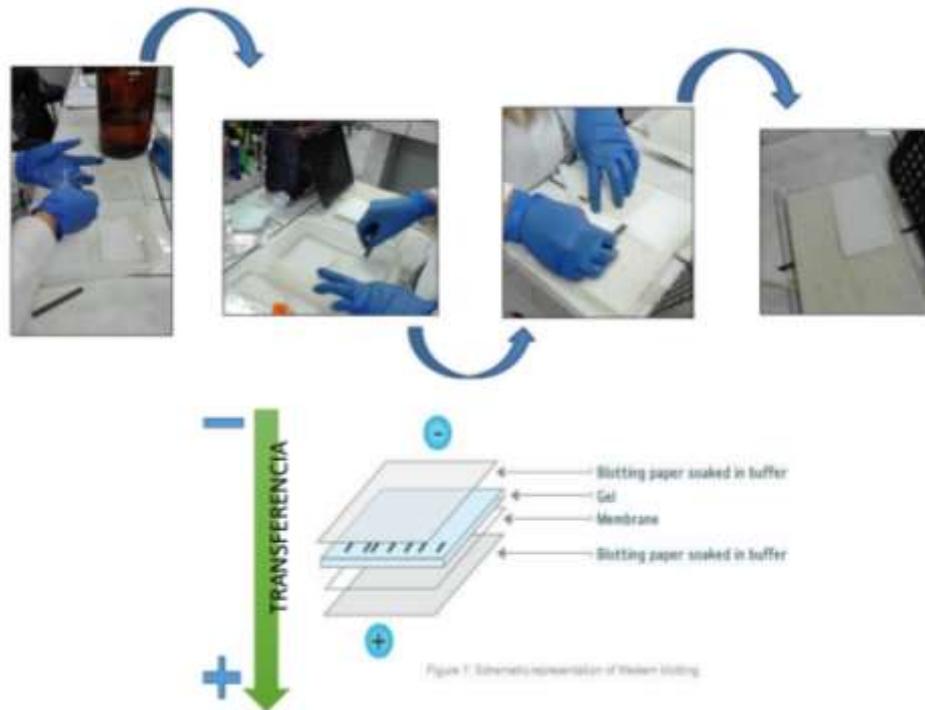


Figura 17.

Procedimiento y fundamento de transferencia en la técnica de Western Blot.

3.7 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El análisis de la espectrometría de masas a los eluidos se realizó en el laboratorio de proteómica en la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, USA). Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Scaffold versión 4.0 y contrastados con las bases de datos de *Taenia* disponibles en NCBI.

IV. RESULTADOS

4.1 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

En la purificación de anticuerpos monoclonales por el método de partículas magnéticas unidas a proteína L se evaluaron tres parámetros:

Los resultados de los ensayos para determinar las condiciones de la muestra de sobrenadante de cultivo, las mayores lecturas de OD (2.202 y 2.201) en la prueba de ELISA, se obtuvieron para los tubos donde se conjugó 1.5 ml de sobrenadante de cultivo sin concentrar y sin buffer de unión (TBS-Tween 0.05%) y en el que se concentró previamente (Tabla 3). Se evaluaron también los sobrenadantes pos conjugación y se obtuvieron valores de OD menores a 0.1. Por lo que el paso de la concentración de sobrenadante de cultivo y la presencia de buffer de unión no es necesario para la purificación de anticuerpos por este método.

Tabla 3.

Resultados de experimentos para determinar condiciones óptimas de la muestra a purificar.

	Muestra sin concentrar	Muestra concentrada	Buffer de unión TBS	Beads proteína L	Eluido (OD)
Experimento A	1.5 ml	SI (factor 50X: 50ul)	450ul	0.0125 mg	2.202
Experimento B	50ul	NO	450ul	0.0125 mg	0.932
Experimento C	1.5ml	NO	-	0.0125 mg	2.201
Experimento D	1.5ml	NO	5ml	0.0125 mg	2.035

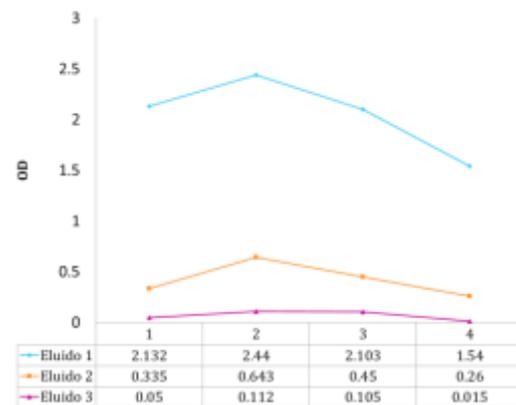
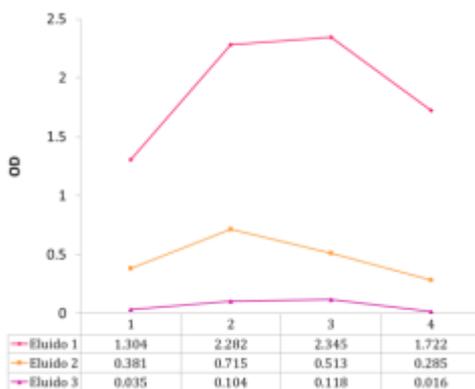
Para demostrar la cantidad de conjugaciones que se le pueden realizar a los mismos beads sin afectar su rendimiento y la cantidad de beads óptima, se utilizaron dos cantidades (0.0125 mg y 0.0375 mg) y se realizaron 12 conjugaciones durante 4 días, la primera conjugación del día se realizó con 1.5 ml de sobrenadante de cultivo nuevo y 300 ul de buffer de elución y dos pasadas más conjugando el sobrenadante pos conjugación de la pasada anterior. En la tabla 4 se muestran los resultados del ELISA donde para todos los primeros eluidos del día (1°, 4°, 7° y 10° uso) se observan OD similares oscilando entre 2.4 y 1.5 indistintamente del número de uso de los beads. Como se muestra en el gráfico 1 para los beads de volumen de 0.0375 ul y para los beads de volumen 0.0125 mg, los valores de los primeros eluidos se mantienen estables en el segundo y tercer día de uso y los valores de los segundos y terceros eluidos son menores a 0.7, demostrando que no se recupera anticuerpo después de la primera conjugación del día. En la figura 19 se comparan los OD de ambos volúmenes de beads en el primer eluido del día y estos se mantienen relativamente estables (oscilando entre 1.3 y 2.4) a pesar de llegar hasta

la décima pasada, sin embargo, en la capacidad de captar IgM de ambos volúmenes de beads se determinó evaluando los sobrenadantes pos conjugación; se muestran valores mayores de OD (0.29 a 0.1) para el volumen de 0.0125 mg de beads que para la otra cantidad.

Tabla 4.

Resultados de eluidos durante 4 días de uso continuo hasta su 12vo uso.

	N° de uso de beads	N° de pasadas	Elución	
			0.0375 mg	0.0125 mg
			OD	OD
Día 1	1° uso	1° pasada	1.304	1.958
	2° uso	2° pasada	0.381	0.525
	3° uso	3° pasada	0.035	0.055
Día 2	4° uso	1° pasada	2.282	2.287
	5° uso	2° pasada	0.715	0.737
	6° uso	3° pasada	0.104	0.095
Día 3	7° uso	1° pasada	2.345	2.128
	8° uso	2° pasada	0.513	0.789
	9° uso	3° pasada	0.118	0.13
Día 4	10° uso	1° pasada	1.722	1.596
	11° uso	2° pasada	0.285	0.603
	12° uso	3° pasada	0.016	0.067

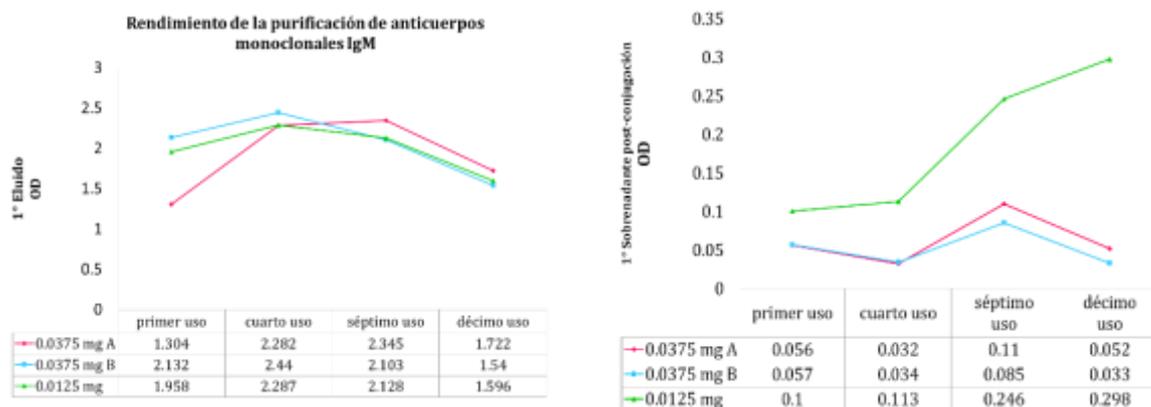


Gr

Figura 18.

Resultados de eluciones de 0.0375 mg de beads durante los 4 días. Resultados de eluciones de 0.0125 mg de beads durante los 4 días.

Figura 19.



Rendimiento de la purificación de anticuerpos monoclonales IgM en los dos volúmenes de beads. Aprovechamiento de IgMs en la purificación con 0.0375 mg y 0.0125 mg de beads.

Se observó que en los sobrenadantes pos conjugación no existía grandes cantidades de anticuerpo por lo que se probó 1.5 ml de sobrenadante de cultivo nuevo en cada conjugación. En la figura 20 se observa el rendimiento de los beads con sobrenadante de cultivo nuevo en cada conjugación, los valores de OD van desde 1.24 a 0.961 para los sobrenadantes nuevos.

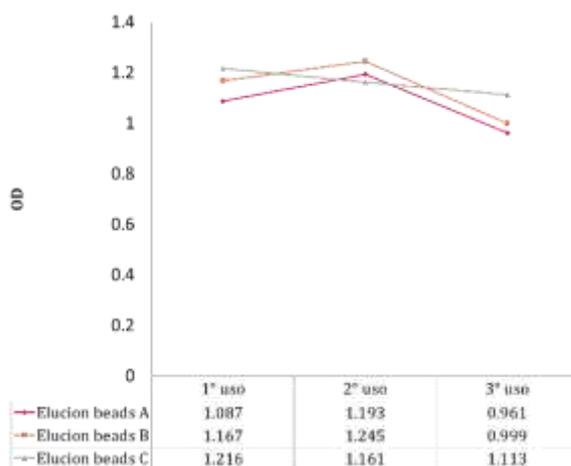


Figura 20.

Resultados de elución en los 3 usos con sobrenadante de cultivo nuevo.

Los resultados de la purificación se muestran en la tabla 5 donde se obtuvo 0.660 ug/ a partir de 70 ml de sobrenadante de cultivo celular. En los resultados de ELISA de control de calidad se realizaron diluciones seriadas desde 1/100 hasta 1/1600 manteniendo ODs desde 2.5 hasta 1.5 a diferencia de las del sobrenadante de cultivo antes de ser purificado, que muestra valores bajos; los valores de OD aumentan significativamente en los anticuerpos purificados y concentrados de 1.14 a 3.38.

Tabla 5.

Resultados de cuantificación y ELISA de purificación de anticuerpos monoclonales

	Volumen inicial	Dilución de muestra	Sobrenadante	Anticuerpos	Volumen final	Concent final
			de cultivo celular SIN PURIFICAR	PURIFICADOS		
			ELISA (OD)	ELISA (OD)		
TSW8	70 ml	1/100	0.862	2.108	800 ul	0.660 mg/ml
		1/200	0.460	1.551		
		1/400	0.275	1.899		
		1/800	0.159	1.936		
		1/1600	0.075	1.789		

Además se realizó la electroforesis SDS-PAGE comparando los anticuerpos purificados y sobrenadantes (1/100), se colocó un control de medio de cultivo en el cual se observa gran cantidad de restos de albúmina (aproximadamente 67 kDa) y otras proteínas en el carril. Al comparar las bandas de sobrenadantes y purificados, se observa una banda tenue de 75 kDa en los sobrenadantes y en los purificados la misma banda perteneciente a la cadena pesada del anticuerpo pero más gruesa y definida (Figura 21-izquierda). La purificación también se comprobó al colocar medio de cultivo en un carril y observar la presencia de muchas proteínas contaminantes propias del medio, comparado con el anticuerpo purificado en el carril 3 de la figura 21 (derecha).

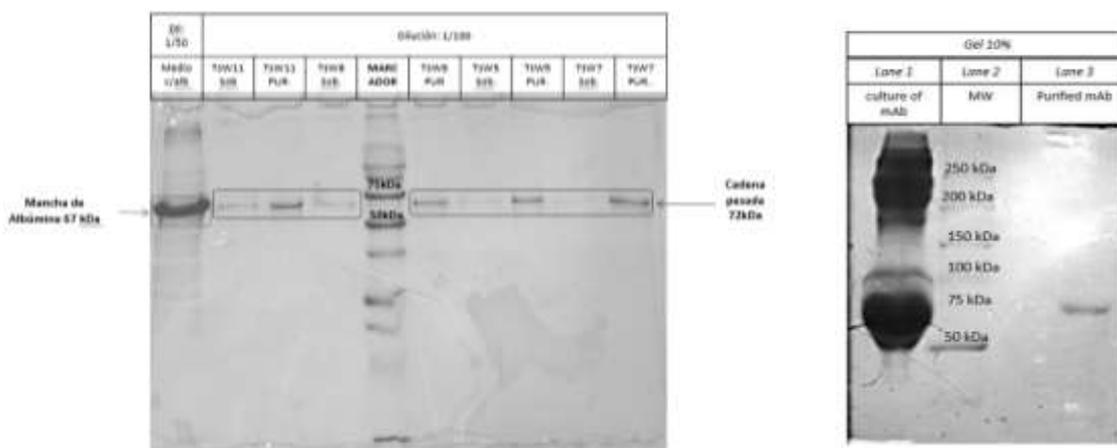


Figura 21.

Electroforesis en SDS-PAGE de anticuerpos purificados y sobrenadantes teñido con Azul de Coomasie.

4.2 CONJUGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES A PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La evaluación de la conjugación de partículas magnéticas epoxy con los anticuerpos monoclonales purificados obtuvo valores de OD de ± 3.9 para 0.2 mg de partículas conjugadas, de ± 2.5 para 0.1 mg y de ± 0.5 para 0.05 mg de partículas. En la Tabla 6 se muestra la reacción de unión del anticuerpo acoplado a las partículas con el anti-IgM mediante la coloración azul, se puede diferenciar la intensidad de color en cada volumen de partículas usadas.

En la reacción de Western Blot, se observaron dos bandas pertenecientes a la cadena pesada del anticuerpo (75 kDa) y a la cadena ligera (25 kDa). Las bandas aumentan en grosor y nitidez al aumentar el volumen de las partículas magnéticas conjugadas.

Tabla 6.

Resultados de evaluación de volúmenes de partículas magnéticas conjugadas con mAbs.

Beads	OD		Beads-mAbs	OD	
0.2 mg	± 0.229		0.2 mg	± 3.919	
0.1 mg	± 0.256		0.1 mg	± 2.579	
0.05 mg	± 0.169		0.05 mg	± 0.530	

4.3 CONJUGACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNETICAS-mAb CON ORINA

El control de calidad de la conjugación que se realizó mediante la técnica de ELISA-bead based, mostró OD de ± 3.9 en orina positiva y ± 0.7 en orina negativa, el control positivo (ag.somático) obtuvo OD de ± 4.0 y el control negativo (PBS) de ± 0.2 , demostrando así que el anticuerpo monoclonal acoplado a las partículas magnéticas era capaz de capturar altas cantidades de antígeno presente en pool de orina de pacientes con NCC.

Tabla 7.

Resultados de evaluación de volúmenes de partículas magnéticas conjugadas con mAbs.

BEADS EPOXY CONJUGADOS CON ORINA		
Beads- mAb (0.1mg)	Muestra	OD
Epoxy-TsW8	Orina +	3.987
Epoxy-TsW8	Orina -	0.755

Epoxy-TsW8	Ag. somático (5 ug/ml)	4
Epoxy-TsW8	PBS	0.208

4.4 ELUCIÓN DEL ANTÍGENO CAPTURADO

Los métodos de elución de tipo denaturantes (DTT, Urea 7M, EDTA-SDS, CTAB-SDS), en la electroforesis no se mostraron bandas (figura 23) o aparecían pero de alto peso molecular (sobre los 100 kDa), en el caso del buffer CTAB-SDS y buffer Acetato no se mostraron bandas en la corrida electroforética, solo rastros de proteínas degradada. Los métodos no denaturantes por bajo pH (Glicina 0.2 M, Ácido cítrico 0.01M) obtuvieron un mismo patrón de tres bandas de bajo peso molecular, menores a 50 kDa; sin embargo, el buffer glicina mostró bandas más nítidas y fuertes. A diferencia de la elución del antígeno somático con métodos de elución denaturantes que sí mostraban un patrón de bandeó y con el método de elución no denaturante (Glicina) no mostraban bandas (Figura 25).

En el control de calidad mediante ELISA directo de los eluidos, no hubo diferencias significativas entre los métodos de elución con buffer glicina y ácido cítrico, obteniendo OD de ± 2.5 y ± 2.4 , respectivamente. El ELISA de los segundos eluidos se realizó para comprobar que en la primera elución se recuperaba el máximo de antígeno, en este ensayo los valores para glicina y citrato también resultaron muy similares, ambos con $OD \leq \pm 0.5$ (Tabla 8).

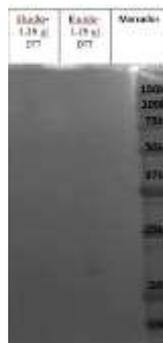
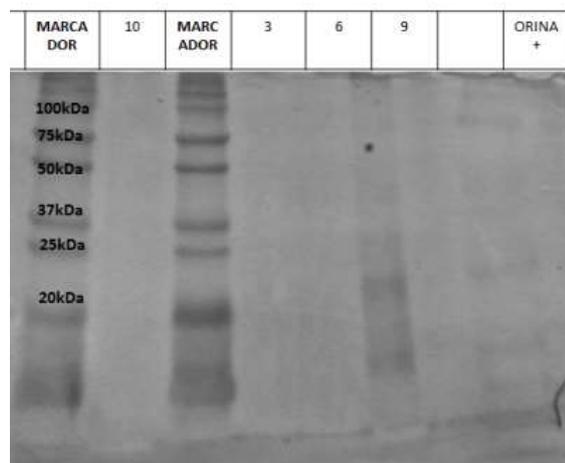


Figura 22.

Electroforesis en SDS-PAGE de antígeno eluido con DTT.



LEYENDA:

- 10: Elución DTT/Orina +
- 3: Elución Citrato/Ag.somático
- 6: Elución Glicina/Ag.somático
- 9: Elución DTT/Ag.somático

Figura 23.

Comparación de la elución de antígeno somático y antígeno de orina con buffers de elución: DTT y Glicina.

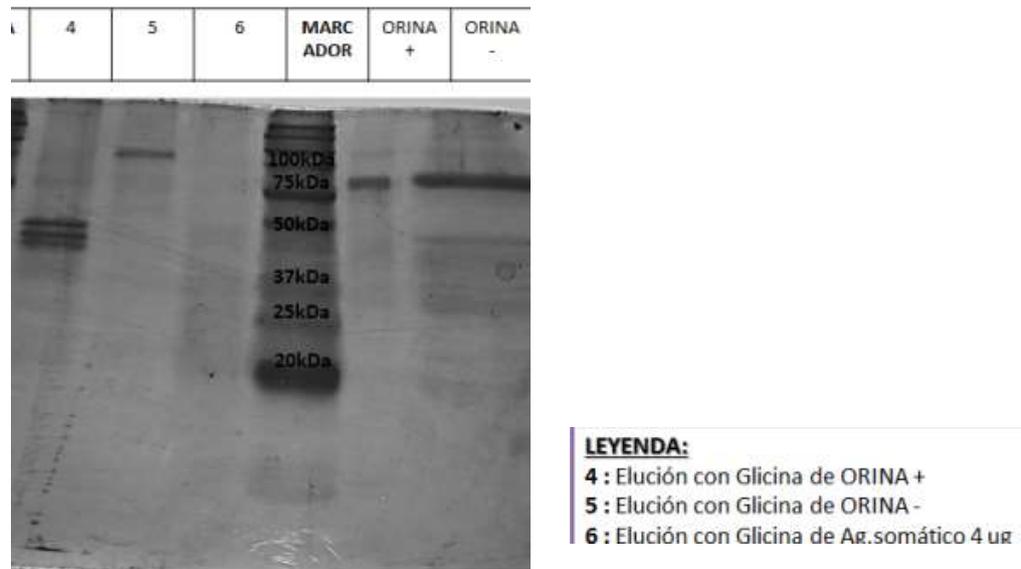


Figura 24.

Elución de antígeno de orina con buffer Glicina.

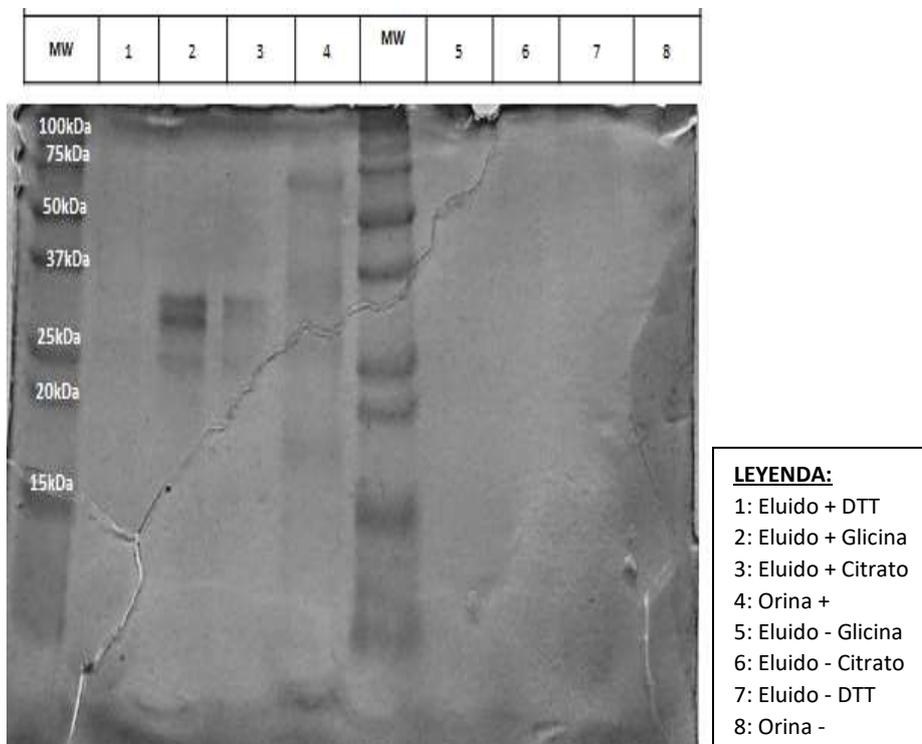


Figura 25.

Comparación de la elución de antígeno de orina con buffers glicina y ácido cítrico.

Tabla 8.

Resultados de evaluación mediante ELISA de segundos eluidos con buffer glicina y citrato.

Segundos Eluidos			
Método de elución	Muestra	Dilución	OD
Glicina	Orina +	1/10	0.505
			0.464
0.492			
0.488			
Citrato			0.471

4.5 CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENO

Al realizar la caracterización del antígeno mediante Western Blot, se identificaron tres bandas de ~40.7 kDa, ~33.4 kDa y ~27.1 kDa. El Western blot confirmó la presencia de estas tres bandas, luego de ser enfrentado con anticuerpo monoclonal.

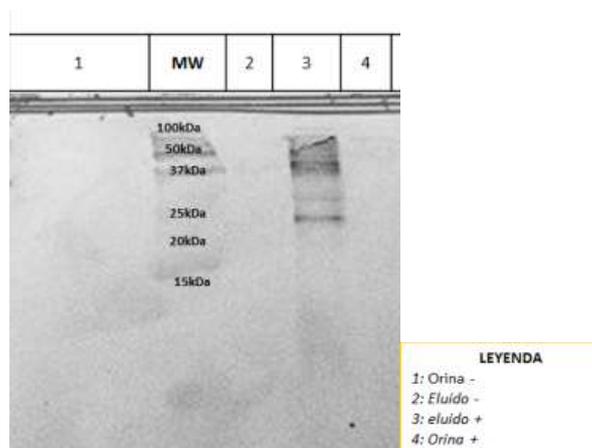


Figura 26.

Western Blot realizado al antígeno de orina eluido.

4.6 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los resultados de espectrometría de masas analizados en Scaffold 4.0 identificaron alrededor de 100 proteínas presentes en los eluidos, de las cuales solo 2 de ellas tenían sobre el 95% de similitud con proteínas presentes del género *Taenia*. Las proteínas halladas fueron actina (~41.2 kDa) y la subunidad β de ATP-sintasa (~27 kDa).

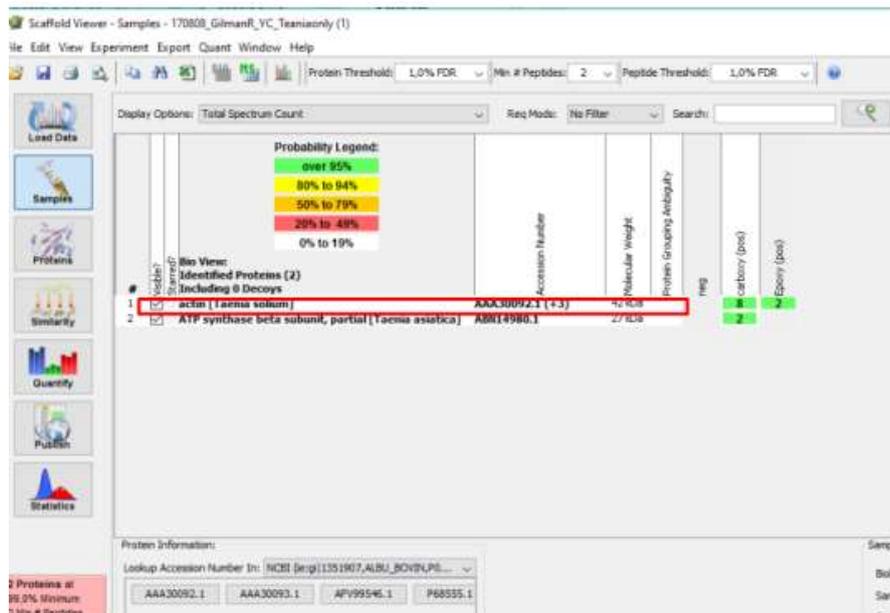


Figura 27.

Resultados de espectrometría de masas (MS) en el programa Scaffold.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 PURIFICACIÓN Y USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los métodos actuales de purificación de proteínas (en especial anticuerpos) se basan en la purificación por afinidad, que consisten en la purificación mediante la unión específica por una molécula a la cual presenta alta afinidad. En este estudio se utilizó este tipo de purificación donde la proteína L se une por afinidad a la cadena ligera del anticuerpo (Nilson *et al*, 1993); esto es de mucha ayuda cuando las regiones Fc no están expuestas como en el caso de las IgM. Además se usaron micropartículas magnéticas como soporte de la proteína L, como menciona el Arruebo (2009) las micropartículas magnéticas presentan ventajas en la purificación ya que acorta los tiempos del proceso ya que requiere solo de una etapa de unión y otra de elución, a diferencia que el método convencional en una columna de agarosa que requiere 4 etapas y una concentración previa del sobrenadante de cultivo celular, y correría el riesgo de contaminarse o diluir mucho la muestra afectando al rendimiento de la purificación (Lee *et al*, 2008), otra ventaja es que no necesita de equipos especializados para realizarse y posee una baja unión a proteínas no específicas; con estas características la purificación de anticuerpos monoclonales es más sencilla.

El uso de anticuerpos monoclonales para mejorar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico ha sido reportado por Kerckhoven y col. (1998), quien utilizó anticuerpos monoclonales de isotipo IgG, producidos contra *Taenia saginata*, para mejorar la performance del WB; los monoclonales presentaron mayor afinidad por los productos de secreción/excreción del parásito, mejorando de esta forma la sensibilidad de 56% a 92% y la especificidad de 93.4% a 98.7% para cisticercosis por *T. saginata*.

Los anticuerpos monoclonales utilizados para este estudio fueron producidos por el grupo de trabajo de Neurocisticercosis del Perú; Paredes (2016) realizó la producción de 21 clonas de mAbs, siendo este el primer reporte de mAbs generados contra quistes y permitiendo así el desarrollo de ensayos específicos para *T. solium*, a fin de evitar la detección de otros antígenos de reacción cruzada de céstodos en cerdos, el desarrollo de ensayos sensibles para permitir la detección de todas las infecciones por *T. solium* y el descubrimiento de antígenos únicos cuya presencia y niveles se correlacionan con información clínicamente útil, como una medida de daño agudo del quiste o muerte del parásito. La elección del anticuerpo codificados como TsW8 se realizó en base a un ensayo previo realizado por el grupo de trabajo donde se identificó el mejor par de estos mAbs para un ELISA directo tipo sándwich en orina; la inmunolocalización de esta clona de mAb indica que el antígeno capturado está presente en estructuras superficiales del cuello (escólex) y pared del quiste.

La optimización del protocolo de purificación mediante beads magnéticos con proteína L, permitió acortar los pasos de concentración antes de la purificación y demostró que de los beads magnéticos son reutilizables sin afectar el rendimiento de la purificación. Para el anticuerpo monoclonal purificado TsW8 a partir de un volumen de 70 ml de sobrenadante de cultivo celular se purificó y concentró hasta obtener 800 ul a una concentración de 660 ug/ml y la reactividad de los anticuerpos purificados se evaluó mediante la técnica de ELISA, donde hasta en la dilución 1/1600 mostró valores de OD elevados (1.79).

El análisis de purificación mediante electroforesis SDS-PAGE nos permitió comprobar la alta afinidad de la proteína L con las cadenas del anticuerpo, pues en el gel solo aparecieron las bandas pertenecientes a la cadena pesada de la IgM, no aparecieron proteínas inespecíficas. A fin de comprobar que el medio de cultivo posea alta carga de proteínas se colocó medio de cultivo, el cual mostró abundantes proteínas de diferentes pesos moleculares, y principalmente una banda muy gruesa de 67kDa perteneciente a la albúmina (Prieto *et al*, 2006). Además al comparar una muestra de sobrenadante de cultivo celular y una muestra purificada y concentrada (en la misma dilución) se observaron bandas más definidas y fuertes en el purificado pues en el sobrenadante de cultivo hay poca cantidad de mAbs en comparación con otras proteínas presentes. Para corroborar que las bandas que aparecían en la electroforesis pertenecían al anticuerpo purificado se realizó un western blot que además de mostrar la cadena pesada de la IgM, también mostró la cadena ligera de 25 kDa y confirmó así que los anticuerpos no habían perdido funcionalidad por ello fueron detectados por los anti IgM del conjugado.

5.2 CONJUGACIÓN Y USO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Los epóxidos son grupos funcionales que permiten inmovilizar covalentemente proteínas. Son grupos muy estables en condiciones de pH neutro. Los epóxidos son capaces de reaccionar con distintos componentes de la superficie proteica (amino, hidroxilo, sulfhidrilo, imidazol), dando lugar a uniones multipuntuales muy estables. Para favorecer la reacción con los epóxidos, es preferible trabajar en condiciones donde el pH de la reacción sea básico y la temperatura del sistema moderadamente elevada (Mateo y col., 2000). La conjugación de los anticuerpos con con el grupo epoxy ha sido ampliamente utilizada en otros estudios. Además, las partículas magnéticas facilitan el proceso de conjugación a los anticuerpos ya que esta plataforma permite un fácil manejo y no requiere equipos especializados para ser utilizada. Al determinar la concentración de partículas epoxy conjugadas con IgM ideal se observó que para un volumen de 0.2 mg la reacción llegaba a un punto de saturación por lo que se decidió trabajar con el volumen de 0.1 mg que mostraba una OD más estable (± 2.5).

La conjugación de partículas magnéticas-mAb con orina se realizó de manera exitosa, comprobándose con el ELISA basado en partículas magnéticas que se elaboró como control de calidad. El complejo partículas magnéticas-mAb-antígeno se dio gracias a muchos factores como: el uso de partículas magnéticas que permite concentrar la muestra de orina ya que posee una superficie esférica que acoplada a los IgM genera mayor capacidad de captura, los anticuerpos utilizados para capturar el antígeno son monoclonales lo cual asegura la especificidad y son IgM que al ser un pentámero tiene mayor superficie de captura

5.3 ELUCIÓN DE ANTÍGENO CAPTURADO

Los métodos para eluir proteínas se pueden dividir en dos tipos: los denaturantes que implica la ruptura de enlaces de unión no solo entre las dos proteínas, sino también la ruptura de la misma molécula target y los no denaturantes que debilitan la unión específica de ag-mAb permitiendo obtener una molécula target en su estructura nativa y su funcionalidad completa. En este estudio, con los métodos de elución denaturantes se obtuvieron bandas de alto peso molecular que no pertenecían al antígeno (Nascimento, 1987).

La purificación de afinidad implica interacciones de unión no covalentes específicas entre el ligando y las moléculas target. Primero, las moléculas de ligando se inmovilizan en un soporte sólido, tal como partículas magnéticas. Entonces este complejo que contiene el las moléculas target (es decir, la molécula que se purifica) se agregan al soporte sólido, permitiendo que las que estas se unan por su afinidad específica a las moléculas de ligando inmovilizadas. Después de lavar los componentes no ligados de la mezcla compleja, las moléculas target capturadas se liberan y se recuperan (es decir, se eluyen) de las moléculas de ligando utilizando condiciones de tampón que interrumpir la interacción de afinidad (Kumar, 2015).

Las condiciones apropiadas del buffer de elución en la purificación por afinidad son tan variadas y dependen de las características de moléculas target y sus propiedades de unión química. Existen condiciones únicas de vinculación / elución para ciertos sistemas de afinidad, como entre lectinas y azúcares, metales divalentes quelados y etiquetas de histidina, y sustratos y enzimas; sin embargo, las condiciones para la elución de las interacciones de afinidad anticuerpo (mAb)-antígeno (ag) (inmunofinidad) son más predecibles. La unión mAb-ag generalmente es más eficiente en buffers acuosos a pH fisiológico y fuerza iónica, como en tampón fosfato solución salina (PBS). En consecuencia, la elución se puede lograr elevando o disminuyendo el pH o alterando el estado iónico para interrumpir la interacción de enlace (Thermo Scientific, 2009).

Los anticuerpos policlonales y monoclonales difieren en su interacción con antígenos, que requieren diferentes estrategias para la elución. Los anticuerpos policlonales por definición son una mezcla de muchas variedades de anticuerpos, cada una de las cuales responde a diferentes epítomos por mecanismos diferentes. Por el contrario, los anticuerpos monoclonales se unen a un epítomo específico mediante una combinación uniforme de enlaces no covalentes, permitiendo una elución efectiva por una condición específica.

El buffer de elución más utilizado para la purificación por afinidad de proteínas es 0,1 M de glicina -HCl, pH 2-3. Este buffer disocia eficazmente la mayoría de las interacciones proteína-proteína y unión mAb-ag sin afectar permanentemente la estructura de la proteína. Sin embargo, algunos anticuerpos y proteínas se dañan por un pH bajo, por lo que las fracciones eluidas se neutralizan inmediatamente después de la recuperación mediante la adición del buffer alcalino Tris- HCl 1 M, pH 8.5 (Kumar, 2015). Este fue el método que mejor funcionó en este estudio, pues los métodos denaturantes degradaron completamente al antígeno en orina pues no aparecían bandas de bajo peso molecular en el gel teñido, el buffer ácido cítrico también obtuvo el mismo patrón de bandas que el método de glicina, además de obtener valores muy similares en el control de calidad de los eluidos y segundos eluidos; sin embargo las proteínas eluidas con el buffer glicina mostraron bandas más intensas que las otras.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Taenia solium*

Los antígenos comerciales utilizados para diagnosticar la neurocisticercosis humana (NCC) se obtienen a partir de un extracto de parásito soluble o una fracción de glicoproteína derivada del parásito, por ejemplo los antígenos de baja masa molecular, excretores/secretores, extracto soluble crudo extracto salino total, antígeno B, glicoproteínas de lectina de lenteja (LLGP), fluido vesicular, extractos de membrana y escólex, antígenos somático, proteínas recombinantes, y péptidos sintéticos.

Existen numerosos reportes sobre la caracterización de antígenos a partir del parásito crudo, productos de excreción/secreción y CSF: Lee E (2008) realizó el análisis proteómico de un complejo de proteína de 120 kDa en fluido de cisticercos de *T. solium* y otros complejos de 42-46, 22-28 kDa y 3 subunidades compartidas de 14, 16 y 18 kDa, las cuales se catalogaron como glicoproteínas de bajo peso molecular y al ser enfrentadas a muestras de suero reaccionaron identificando infecciones vivas. Salazar-Anton (2011) caracterizó antígenos presentes en suero proveniente de pacientes centroamericanos a través de la técnica de electroforesis 2D y un posterior análisis de espectrometría de masas y determinó 6 proteínas inmunoreactivas: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, proteína 14-3-3, actina, paramiosina, proteína heat shock (TsolHSP36) y una nueva proteína que llamó Tsol-p27; este nuevo antígeno posee un peso entre 27-36 kDa. Más tarde en Nhancupe (2013) caracterizó 6 proteínas inmunoreactivas presentes en suero de pacientes africanos, encontrando nuevamente el antígeno Tsol-p27, actina, TsolHSP36 y 3 nuevas (tropomiosina, enolasa y antígeno Cc1 de 38 kDa). Hancock (2009) realizó la caracterización la proteína recombinante GP50 purificada a partir de cisticerco, esta proteína ha sido ampliamente utilizada en el inmunodiagnóstico por WB. Levine (2004) caracterizó dos proteínas de la familia TSES provenientes de un cultivo de *Taenia* adulta; mencionó la importancia de la técnica de electroforesis 2D para los estudios en proteómica, pues con la electroforesis SDS-PAGE las bandas obtenidas pueden ser un complejo de varias proteínas a diferencia de la 2D que permite separar una mezcla de proteínas por su punto isoeléctrico.

Se han reportado estudios de caracterización de antígeno también en LCR (Chang-Yuan, 1992) y se encontró que el antígeno detectado es específico para NCC y no es detectado por otras enfermedades del sistema nervioso central. García H. (2000) diseñó una prueba de ELISA basada en el uso de anticuerpos monoclonales para detectar antígeno en suero de pacientes con NCC, esta técnica obtuvo alta especificidad (95%) y una sensibilidad de 85%; luego del análisis de pacientes con diferentes tipos de NCC, determinó que la detección del antígeno es un marcador importante para conocer el curso de la enfermedad o el tratamiento basado en los niveles de antígeno. Sin embargo, el problema con los estudios anteriores es que las muestras en las cuales se detecta el antígeno son invasivas para los pacientes, el volumen que se puede obtener es limitado y quizás la cantidad de antígeno detectado es menor por el poco volumen de muestra; es por ello que la caracterización del antígeno circulante en orina también podría servir para identificar un marcador proteico y ayudar a mejorar el diagnóstico de la enfermedad.

Como menciona Coonrod (1992), la orina es reservorio de antígenos de muchas enfermedades infecciosas causadas por parásitos, es una muestra no invasiva y muy fácil de obtener, que muchas veces necesita ser concentrada previamente; en este estudio se utilizaron las partículas magnéticas para evitar este paso de concentración previo. Además Coonrod reportó que los antígenos excretorios de orina son generalmente de bajo peso molecular (menor a 70 kDa), pero a pesar de ser pequeños son los suficientemente inmunorreactivos para ser detectados en pruebas serológicas; es por ello que fueron capaces de unirse fuertemente al anticuerpo acoplado a las partículas magnéticas.

La detección por anticuerpos monoclonales de antígenos de *T. solium* presentes en orina fue reportada por Castillo (2009), quien estandarizó la técnica de ELISA basada en anticuerpos monoclonales de tipo IgM dirigidos contra antígenos excretorios/secretorios del parásito, se necesitó un paso previo de concentración de orina para que los antígenos puedan ser detectados

y de esta manera incrementó la sensibilidad de la prueba a un 92%; sin embargo, el antígeno detectado no fue caracterizado en este estudio.

Sin embargo, la literatura de la caracterización de antígenos a partir de muestras de orina es limitada, uno de los pocos estudios es un reporte de Sahu (2014) menciona un perfil comparativo entre péptidos antigénico circulantes en suero, LCR y orina de pacientes con NCC, en orina se encontraron antígenos de bajo peso molecular (péptidos de de 32, 15 kDa y 5 kDa).

En este estudio se caracterizaron 3 bandas de ~40.7 kDa, ~33.4 kDa y ~27.1 kDa mediante electroforesis SDS-PAGE con tinción de nitrato de plata. Se puede afirmar con certeza que son proteínas antigénicas de orina, pues son de bajo peso molecular y son capaces de atravesar la barrera de filtración del riñón, está reportado que las proteínas de orina deben ser menores de 70 kDa (Nwape, 2011). Además se confirmó la especificidad de estas bandas mediante la técnica de WB, transfiriéndolas y enfrentándolas al mismo mAb que las había capturado, al revelarlo se obtuvieron estas tres mismas bandas.

5.5 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La importancia de la caracterización del antígeno hasta identificación del proteoma fue descrita por Reamtong (2013) quien resaltó las ventajas de la espectrometría de masas y la proteómica en enfermedades parasitarias, la cual es ampliamente usada en muchas áreas de estudio, incluyendo la parasitología donde se podría elucidar la patología de la enfermedad, las interacciones hospedero-parásito, el desarrollo de posibles vacunas, identificación de biomarcadores y diagnóstico de enfermedades parasitarias. Nuevos antígenos para el inmunodiagnóstico de la NCC han sido desarrollados incluyendo la re evaluación de técnicas comunes con nuevos antígenos o el uso de diferentes muestras menos invasivas como orina y saliva. A la actualidad estas muestras no han obtenido buenos resultados en sensibilidad o especificidad, es por ello que las investigaciones en este campo están centradas en la búsqueda y producción de antígenos recombinantes o péptidos sintéticos.

Para el análisis de espectrometría de masas se prefirió enviar el eluido total para obtener un análisis completo e identificar posibles proteínas que estén en baja expresión y no sean detectadas por la tinción de plata. Los resultados identificaron alrededor de 100 proteínas, sin embargo la mayoría de ellas están relacionadas a proteínas humanas que serían productos de contaminación; se identificaron dos proteínas con un porcentaje por encima del 95% de similaridad con *T.solium* que además coincidían con el peso molecular de la electroforesis, estas proteínas fueron: la actina (~41.2 kDa) que ha sido anteriormente reportada en muestras de suero, esta proteína es de tipo estructural y la subunidad β de ATP-sintasa (~27 kDa) que no ha sido reportada hasta el momento en los estudios de caracterización de antígeno; a pesar de obtener estas dos proteínas coincidentes con el peso molecular de la electroforesis, aún hay una banda de ~33.4 kDa que no logró ser identificada en la espectrometría, esta podría ser una banda de parte anticuerpo monoclonal que quizás se desprendió al momento de la elución o una proteína de *T.solium* que no ha sido descrita anteriormente.; se necesitará continuar con más análisis en este estudio.

VI. CONCLUSIONES

- El método de purificación con proteína L es efectivo para aislar anticuerpos debido a su alta afinidad por las regiones kappa de sus cadenas ligeras, esto también le permite unirse a cualquier isotipo de anticuerpo, como el caso de las IgM donde la cadena pesada no está expuesta y la plataforma de las partículas facilitó el proceso de purificación. Se optimizó el proceso de purificación eliminando el paso de concentración de la muestra, acortando así el tiempo del proceso y obteniendo 660 ug/ml de anticuerpo monoclonal TsW8 purificado, libre de albúmina y otras proteínas del cultivo celular.
- La formación del complejo partícula magnética-mAb-antígeno se realizó satisfactoriamente gracias a los grupos epóxidos de las partículas magnéticas, los cuales permitieron unirse covalentemente al mAb (TsW8) y usando la cantidad óptima determinada para conjugarlos con orina (0.1 mg) se produjo la unión de mAb-ag.
- Los mAbs fueron capaces de detectar antígenos del parásito en un pool de muestras de orina de pacientes con NCC, confirmando que el parásito libera antígenos tan pequeños que son capaces de atravesar la barrera de filtración del riñón y ser excretados por la orina. Además la concentración previa de la muestra de orina, no fue necesaria gracias a la superficie esférica de las partículas magnéticas, que permitió acoplar más cantidad de mAbs.
- Los métodos denaturantes de elución degradan al antígeno de orina, ya que este es lábil y de bajo peso molecular; sin embargo la elución del antígeno con métodos no denaturantes como el buffer Glicina, que actúa por la disociación de la unión mAb-ag debido al bajo pH, permitió la identificación de tres bandas de ~40.7 kDa, ~33.4 kDa y ~27.1 kDa, las cuales fueron confirmadas como proteínas inmunorreactivas a través de la técnica de Western Blot.
- Los resultados de espectrometría de masas identificaron dos de las 3 proteínas caracterizadas por electroforesis: actina y la subunidad β de ATP-sintasa de *T.solium*, relacionadas a la estructura del citoesqueleto y metabolismo. Ambas de importancia vital para el parásito, por lo que podrían ser propuestas como antígenos de diagnóstico para esta enfermedad.

VII. RECOMENDACIONES

- La identificación de las dos proteínas caracterizadas y confirmadas por espectrometría de masas, sugiere nuevos blancos para desarrollar pruebas de inmunodiagnóstico. Sin embargo, se recomienda replicar el protocolo de conjugación y elución de antígeno en muestras individuales de pacientes con diferentes tipos de NCC, diferenciando número y estadio de quistes, para confirmar la presencia de las proteínas.
- En la secuenciación del eluido total se identificaron proteínas contaminantes, sin embargo se lograron obtener 2 proteínas del género *Taenia*. Por este motivo es necesaria la confirmación de este primer análisis de MS del eluido total con un nuevo análisis de cada banda obtenida en la electroforesis, el cual es más específico y evita el background por contaminación del eluido.
- Al tener los antígenos presentes en orina identificados se podría implementar una prueba de diagnóstico directo basada en la tecnología de las partículas magnéticas, como un bead based ELISA o un dipstick ELISA.
- Mejorar las pruebas de inmunodiagnóstico facilitará una mejor comprensión de la prevalencia y la epidemiología de NCC en áreas endémicas, ello será posible con la identificación de antígenos específicos del parásito. Por lo que se recomienda seguir en la búsqueda de proteínas importantes para el parásito y reconocerlas como moléculas blancas para el diagnóstico de NCC, a partir de las cuales se pueden mejorar las técnicas de diagnóstico actual o ser candidatos a vacunas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allan JC, Velásquez M, Torres R, et al. (1996). Field trial of diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by coproantigen enzyme linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 35(7), 44-61.

Arruebo M, Valladares M, Gonzalez-Fernandez A (2009) Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials.* 35(2), 111-116.

Baily GG, Mason PR, Trijssenar FE, Lyons NF. (1988). Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 10(4), 74–80.

Carpio, A. Neurocysticercosis: an update. (2002). *Lancet Infectious Diseases.* 12(2), 751–762.

Castillo Y, Rodriguez S, García HH, Brandt J, Van Hul A, Silva M, Rodriguez-Hidalgo R, Portocarrero M, Melendez DP, Gonzalez AE, Gilman RH, Dorny P; Cysticercosis Working Group in Perú. (2009). Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Journal Trop Med Hyg.* 80(3), 379-383.

Chang-Yuan W, Hong-Hua Z, Ling-Yun G. (1992). A MAb-based ELISA for detection circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma.* 11(6), 825-7.

Escobar, A., Nieto M., Hauser, W.A. (1972). Cysticercosis and epilepsy: a critical review. *Epilepsia.* 7(39), 1025–1040.

Coonrod J, Ellis D, Becker DJ et al. (1992). Choice of urine sample predictive of microalbumin in patients with diabetes mellitus. *Journal kidney disease.* 5(11), 756-762.

Correa D, Sandoval MA, Harrison LJ, Parkhouse RM, Plancarte A, Meza-Lucas A, et al. (1991). Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 83(6), 814-816.

Damian NA, Hussain R, Ottesen EA. (1987). Excretory-secretory and somatic antigens in the diagnosis of human filariasis. *Clin Exp Immunol.* 56(3), 567-576.

Del Brutto O, Wadia N, Dumas M, Cruz M, Tsang V, Schantz P. (1992). Proposed of diagnostic criteria for human neurocysticercosis. *J Neurol Sci.* 57(2), 177-183.

Escalante G. (2005). Neurocysticercosis in child. A clinical and epidemiologic Analysis. *Rev. de Neuro-Psiquiat.* 42(6), 107-111.

Escalante G. (1973). Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Rev. de Neuro-Psiquiat.* 10(12), 218-224

Escobedo B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. (1982). Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 28(11), 476-482.

Estrada J. (1990). Inmunobiología y Diagnóstico de Neurocisticercosis. *Acta Médica colombiana.* 15(1), 86-91.

Ferrer, E., Gonzalez, L.M., Foster-Cuevas, M., Cortez, M.M., Davila, I., Rodriguez, M., Sciutto, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T. (2006). *Taenia solium*: characterization of a small heat shock protein (Tsol-sHSP356) and its possible relevance to the diagnosis and pathogenesis of neurocysticercosis. *Exp. Parasitol.* 30(12), 655-662.

Flisser A, Williams K, Lacleste JP, et al. (1975). Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium* in Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press. 11 (7), 82-90.

Garcia, H.H., Evans, C.A., Nash, T.E., Takayanagui, O.M., White Jr., A.C., Botero, D., Rajshekhar, V., Tsang, V.C., Schantz, P.M., Allan, J.C., Flisser, A., Correa, D., Sarti, E., Friedland, J.S., Martinez, S.M., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Del Brutto, O.H. (2000). Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(7), 747–756.

Garcia HH, Del Brutto OH, Cysticercosis Working Group in Peru. (2005). Neurocysticercosis: Updated Concepts About An Old Disease. *Lancet Neurol.* 4(10), 653–661.

Garcia H, Harrison LJ, Parkhouse RM, et al. (1989). A specific antigen detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Trans Soc Trop Med Hyg.* 92(4), 411-414.

Garcia HH, Parkhouse RM, Gilman RH, Montenegro T, Bernal T, Martinez SM, Gonzalez AE, Tsang VC, Harrison LJ; Cysticercosis Working Group in Peru. (2003). Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 88(11). 547-552.

Gilman RH, Del Brutto OH, García HH, Martínez M, and The Cysticercosis Working Group in Peru. (2000). Prevalence of taeniosis among neurocysticercosis patients is related to the severity of cerebral infection. *Neurology.* 10(55), 1062-1068.

Giménez-Roldán S, Díaz F, Esquivel A. (2003). Neurocysticercosis e inmigración. *Neurología.* 8(3), 114-119.

Gómez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Sciutto E, Fragoso G, Bobes RJ, Lacleste JP, Yauner Ldel P, Ochoa-Leyva A. (2015). Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). *Sci Rep.* 32(9), 789-796.

Gómez, R., González-Barranco D, González-Angulo A. (1981). Presence of esterases and peptidases in the intact tegument of vesicles of *Cysticercus cellulosae*. Arch Invest Med. 8(2), 81-88.

Hancock, S. Pattabhi, F.W. Whitfield, M.L. Yushak, W.S. Lane, H.H. Garcia, A.E. Gonzalez, R.H. Gilman, V.C. Tsang. (2009). Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. Mol. Biochem. Parasitol. 4(12), 119-125.

Jafri EC, Snege M, Vaz AJ, Leser PG. (1998). Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. Clin Diagn Lab Immunol. 21(8), 75-80.

Jeri A, Gupta RK, Nath K, Pradhan S, Tripathi M, Pandey CM, et al. (2004). What triggers seizures in neurocysticercosis? – A MRI based Study in Pig Farming Community from a District of North India. Parasitol Int. 2(5), 36-39.

Kerckhoven I, Vansteenkiste W, Claes M, Geerts S, Brandt J. (1998). Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. Vet Parasitol. 76(4), 269-274.

Kumar D & Gaur SN. (2015) Comparative evaluation of various immunodiagnostic tests for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in pigs, using fractionated antigens. J Helminthol. 63(1), 13-17.

Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholson-Weller, A. (1991). Paramyosin inhibits complement C1. J. Immunol. 148(2), 124–128.

Larralde, M. , R.T. Bryan, J.A. Fried, D.A. Ware, P.M. Schantz, J.B. Pilcher, V.C. Tsang. (1992). Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J. Infect. Dis.* 164(5), 1007-1009.

Lee, Y. C., Block, G., Chen, H., Folch-Puy, E., Foronjy, R., Jalili, R. & Lu, J. (2008). One-step isolation of plasma membrane proteins using magnetic beads with immobilized concanavalin A. *Protein expression and purification.* 62(2), 223-229.

Levine MZ, Calderón JC, Wilkins PP, Lane WS, Asara JM, Hancock K, et al. (2004). Characterization, cloning, and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. *J Parasitol.* 90(3), 631-638.

Lobato M, Nari A, Amanfu W. (1981). *Taenia solium* cysticercosis / taeniasis: Potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. *Acta Trop.* 87(1), 145-148.

Martins-Souza PE & Hafeez M. (2014). Detection of *Taenia solium* cysticercosis in pigs by ELISA with an excretory-secretory antigen. *Vet Res Commun.* 57(2), 111-115.

Mateo, C, Abian, O, Fernandez-Lafuente, R, Guisan, J. (2000). Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb Technol* 26(7), 509-515.

Nascimento E, Tavares CA, Lopes JD. (1987). Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 102(6), 725-731.

Nash TE & Garcia HH. (2011). Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nature reviews Neurology.* 7 (1), 584-594.

Nwape EC, Scheel CM, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Takayanagui OM, et al. (2011). Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *13*(12), 1202-1215.

Nhancupe N, Noormahomed EV, Afonso S, Falk KI, Lindh J. (2016). Performance of Tsol-p27 antigen for the serological diagnosis of cysticercosis in Mozambique. *J Helminthol.* *90*(5), 630-633.

Nilson, B. H., Lögdberg, L., Kastern, W., Björck, L., & Åkerström, B. (1993). Purification of antibodies using protein L-binding framework structures in the light chain variable domain. *Journal of immunological methods.* *26*(1), 33-40.

Pando-Robles RV & Lanz-Mendoza H. (2009). The significance of proteomics in public health. *Salud Pública Mex.* *24*(13), 197-201.

Paredes A, Sáenz P, Marzal M, Orrego M, Castillo Y, Rivera A, et al. (2016). Anti-*Taenia solium* monoclonal antibodies for the detection of parasite antigens in body fluids from patients with neurocysticercosis. *Experimental Parasitology.* *166*(1), 37-43.

Parija M, Biswas R, Harish BN, Parija SC. (2004). Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop.* *13*(8), 63-70.

Pawlowski NC, Johansen MV, Carabin H. (2002). Simulating transmission and control of *Taenia solium* infections using a Reed-Frost stochastic model. *Int J Parasitol.* *33*(1), 65-73.

Prieto, LH, & Fernández, ED. (2006). Caracterización y análisis de la actividad antigénica de proteínas de la membrana germinal de *Echinococcus granulosus*. *InVet,* *8*(1), 51-58.

Proano-Narvaez, J.V., Meza-Lucas, A., Mata-Ruiz, O, Garcia-Jeronimo, R.C., Correa, D. (1997). Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of

enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J. Clin. Microbiol.* 11(8), 1175-1183.

Rabiela, Y. Hornelas, C. Garcia-Allan, E. Rodriguez-del-Rosal, A. Flisser. (1985). Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. *Arch. Med. Res.* 54(4), 161-167.

Reamtong O. (2013). Review: Mass spectrometry-based parasitic proteomics. *J Trop Med Parasitol.* 2(12), 51-62.

Rivera, A, Singhi PD, Khandelwal N, Malla N. (2006). Evaluation of lower molecular mass (20-24 kDa) *Taenia solium* cysticercus antigen fraction by ELISA and dot blot for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. *Parasitol Res.* 30(6), 175-179.

Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, Pretell EJ, Brandt J, Lescano AG, et al. (2009). Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *The Journal of infectious diseases.* 199(9), 1345-1352.

Rodriguez, S., Wilkins, P., & Dorny, P. (2012). Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathogens and Global Health.* 106(5), 286-298.

Rojas, M, Maia AA, Espíndola NM, Machado Ldos R, Vaz AJ, Henrique-Silva F. (2007). Recombinant expression of *Taenia solium* TS14 antigen and its utilization for immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop.* 54(1), 172-174.

Sarria JA, Garcia E, Cortes IM, Sotelo J, Tato P, Molinari JL. (2012). Neurocysticercosis: relationship between the developmental stage of metacestode present and the titre of specific IgG in the cerebrospinal fluid. *Ann Trop Med Parasitol.* 39(5), 625-633.

Sanchez, J. Garcia, F. March, N. Cardenosa, P. Coll, C. Munoz, C. Auladell, G. Prats. (1997). Ultrastructural localization of major hydatid fluid antigens in brood capsules and

protoscoleces of *Echinococcus granulosus* of human origin *Parasite Immunol.* 83(2), 413-415.

Sahu, H. Sako, M. Nakao, T. Ikejima, X.Z. Piao, K. Nakaya, A. Ito. (2014). Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J. Clin. Microbiol.* 36(11), 229-236.

Salazar-Anton & J. Lindh. (2011). *Taenia solium*: a two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp. Parasitol.* 54(1), 72-75.

Sarti E. (1998). La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Revista de Salud Pública de México.* 8(2), 89-92.

Silverman N, Sotelo J, Nieto D. (1964). ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch Neurol.* 4(11), 33-38.

Slais, M, Hernandez, J, Ibarra, S. (1970) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. *J Clin Microbiol.* 12(8), 170-173.

Smyth MK. (1969). Reliability of immunoassays in diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol.* 8(4), 125-128.

Tsang, V, Peralta, J, Simons R. (1983). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods of Enzymology.* 2(8), 89-99.

Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of infectious diseases.* 14(11), 122-129.

Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, Deelder AM, Palmblad M. (2012). Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics*. 6 (1), 62-71.

White Jr. (1997). Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin. Infect. Dis.* 24(4), 101–113.

Yábar VC. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

Yamasaki, H, Nakao, M, Sako, Y, Nakaya, K, Sato, M. O, & Ito, A. (2003). Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cysticercosis. In *Parasitology International*. 17(7), 148-153.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **CISTICERCOSIS:** Es una infección ocasionada por un parásito llamado *Taenia solium*, que es una solitaria del cerdo que produce quistes en diferentes zonas del cuerpo. La cisticercosis se adquiere cuando se ingieren proglótides o huevos. Después las larvas migran por el cuerpo y forman quistes en los tejidos. Esto es lo que sucede en el cerdo y la vaca, pero, en el caso de *Taenia solium* también puede afectar al ser humano, por lo general cuando ingiere tierra, agua o alimentos (principalmente hortalizas) contaminados con huevos.
- **TENIASIS:** La teniasis es una infección intestinal provocada por dos especies de cestodos. Las infecciones más importantes son las causadas por *Taenia solium* (tenia del cerdo) y *Taenia saginata* (tenia del vacuno). La teniasis se transmite al ser humano a través de la ingestión accidental de cisticercos presentes en la carne de cerdo o de vacuno poco cocinada. Una vez en el cuerpo humano, los cisticercos se transforman en tenias adultas que viven en el intestino y liberan proglótides (segmentos) grávidas que se excretan con las heces.
- **ESCOLEX:** Se le llama escólex a la porción cefálica de los parásitos miembros adultos de la clase céstoda. En el escólex, se encuentran ventosas o ganchos (dependiendo de la especie), que le permiten adherirse a la mucosa del intestino de su hospedador. Todas las tenias tienen escólex.
- **NEUROCISTICERCOSIS (NCC):** La neurocisticercosis (NCC) es la parasitosis humana más frecuente del sistema nervioso central y es causada por las larvas del céstodo *Taenia solium*. La NCC es endémica en prácticamente todos los países en vías de desarrollo. En general se presenta como formas intraparenquimales asociadas con convulsiones o formas extraparenquimales asociadas con hipertensión endocraneana. La sospecha clínica y epidemiológica es importante pero el diagnóstico se realiza primariamente por imágenes y se confirma con serología.
- **BARRERA HEMATOENCEFÁLICA:** La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura histológica y funcional que protege al Sistema Nervioso Central, se encuentra constituida por células endoteliales especializadas que recubren el sistema vascular cerebral y tiene una importancia capital en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas, las células gliales y en el bloqueo del acceso de sustancias tóxicas endógenas o exógenas.
- **PARTÍCULAS MAGNÉTICAS:** Las partículas magnéticas tienen gran variedad de aplicaciones en el campo de la biomedicina, fundamentalmente en el área del diagnóstico y la terapia. Están compuestas por un núcleo magnético y una envoltura polimérica, su tamaño final es la suma del tamaño del núcleo magnético más la capa del polímero que las recubre. El interés actual de las partículas magnéticas radica en las fundamentales propiedades físicas de su núcleo magnético, de su alta relación superficie/tamaño y de la capacidad que poseen para unir moléculas de interés biológico a su superficie.
- **PARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON PROTEÍNA L:** Son un tipo de partículas magnéticas unidas a una proteína recombinante (proteína L) que es específica para unirse a las cadenas ligeras kappa presentes en los anticuerpos de humanos y ratones. Es ideal para la

purificación de anticuerpos monoclonales, son estables y compatibles con métodos automatizados y manuales.

- **PARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON GRUPOS EPOXY:** Los Dynabeads epoxy son ideales para el aislamiento celular o aplicaciones moleculares. Los anticuerpos purificados pueden ser usados para conjugarse con este tipo de beads gracias a la afinidad del grupo químico epoxy a los extremos amino de los anticuerpos.
- **ANTICUERPOS POLICLONALES:** Los anticuerpos Policlonales (pAbs) son una mezcla compleja de varios anticuerpos que se han producido generalmente por diversas copias del Linfocito B de un animal. Estos anticuerpos pueden reconocer y atar a diversos epítomos de un único antígeno y por lo tanto puede formar uniones con los antígenos.
- **ANTICUERPOS MONOCLONALES:** Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son específicos para un tipo de antígeno, es decir, reconocen un solo epítomo. Debido a que están altamente capacitados en contra de una proteína celular, son más eficaces contra enfermedades específicas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se utilizan contra las células cancerosas para destruir tumores y mantener las células sanas intactas.
- **ISOTIPO:** Un isotipo es cada uno de los cinco tipos de anticuerpos, determinado por una de las cinco formas distintas de cadena pesada que los constituyen. Los isotipos de anticuerpos son IgM, IgE, IgG, IgD, IgA y cada uno de ellos tiene un grupo de funciones efectoras. Los subtipos IgM e IgA se caracterizan por variaciones estructurales adicionales (formar pentámeros y dímeros respectivamente)
- **INMUNORREACTIVIDAD:** Es la reacción de inmunidad, a través de la formación de anticuerpos, en respuesta a un antígeno específico.
- **ANTÍGENO SOMÁTICO (CRUDO):** Es aquel tipo de antígeno que se extrae de un extracto del cisticerco completo. Para obtenerlo se realizan lavados con una solución de buffer fosfato salino (PBS) y centrifugaciones.
- **ANTÍGENO EXCRETORIO/SECRETORIO:** Este tipo de antígeno se encuentran proteínas de excreción/secreción del cisticerco, para obtenerlo se realiza un cultivo celular que desarrolle el cisticerco, luego de 48 horas aproximadamente se recupera el sobrenadante del cultivo celular y a partir de este se obtienen los antígenos. Es el tipo de antígeno uno de los más usados para diagnóstico, ya que puede detectar infecciones vivas.
- **ANTÍGENO DE FLÚIDO VESICULAR:** Este tipo de antígeno pertenece a proteínas contenidas en el fluido vesicular del cisticerco, para la obtención de este antígeno se realiza punción en cada cisticerco y se extrae el fluido vesicular.
- **ANTÍGENO CIRCULANTE:** Es aquel antígeno conformado por proteínas que se encuentran circulando en fluidos como orina, suero, etc. Es el más usado para el diagnóstico de infecciones vivas.

- **ANTÍGENO RECOMBINANTE:** Con el desarrollo de la biología molecular en los últimos años y por medio de la tecnología del DNA recombinante ahora es posible obtener antígenos específicos. De esta forma, un gen que codifica una proteína inmunogénica puede ser aislado y clonado en bacterias, levaduras o células de mamífero.
- **EPÍTOPO:** Un epítipo o determinante antigénico es la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente la secuencia a la que se unen los anticuerpos, que son los receptores de las células B o de las células T.
- **GLICOPROTEÍNA:** Son aquellas que contienen cadenas de azúcares ligadas a ellas, que aumentan su estabilidad, determinan su forma en el espacio, facilitan su interacción con otras proteínas y también la diferenciación y desarrollo de las células. Estas cadenas de azúcares se llaman glicanos.
- **FOSFOPROTEÍNA:** Una fosfoproteína es una proteína unida covalentemente a una sustancia que contiene ácido fosfórico, a través del mismo, es decir, es una molécula compuesta de proteínas y lípidos. El aminoácido que es fosforilado suele ser serina, treonina, tirosina, aspartato o histidina.
- **PROTEÓMICA:** La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma). Permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. La proteómica se está aplicando en la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en la patogenia de enfermedades y el análisis de procesos de transducción de señales.
- **VACUNA SINTÉTICA:** La estrategia para la obtención de estas nuevas vacunas se basa en la identificación de la proteína o proteínas de un agente infeccioso capaces de inducir una respuesta inmune protectora de forma semejante a la que induciría el agente infeccioso completo; o bien, en la identificación de aquellas proteínas que no tienen interés ni inmunológico ni replicativo, o que pudieran estar relacionadas con la virulencia y por tanto no necesarias. De esta manera y mediante técnicas de ingeniería genética, se pueden seleccionar los genes correspondientes clonarlos y expresarlos en diferentes vectores o eliminarlos mediante una deleción selectiva. Una variante de este sistema sería, una vez identificada la proteína de interés inmunológico, la obtención de la proteína o proteínas por síntesis proteica.
- **WESTERN BLOT:** El Western blot, inmunoblot o electrotransferencia es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas, luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos.

- **ELISA:** Es el acrónimo en inglés para enzimoimmunoanálisis de adsorción, es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.
- **ELECTROFORESIS SDS-PAGE:** SDS-PAGE es el acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico). Es una técnica ampliamente utilizada para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética (en función de la longitud de la cadena polipeptídica y masa molecular). Gracias al SDS las proteínas se desnaturalizan, perdiendo su conformación tridimensional. De este modo se obtiene un fraccionamiento que obedece a: la diferencia de peso; la longitud de la cadena (tamaño); y la forma de la proteína.
- **ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL:** La electroforesis en gel bidimensional, abreviado como electroforesis en 2-D, es una forma de electroforesis en gel comúnmente utilizada para analizar proteínas. Las mezclas de proteínas son separadas por diferentes propiedades y en dos dimensiones en estos geles 2D. Las dos dimensiones en que las proteínas se obtienen por esta técnica, aprovechan propiedades como son el punto isoeléctrico, la masa de las proteínas complejas y el estado de la proteína.
- **ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS):** Se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por un dispositivo adecuado. Un espectro de masas es una información bidimensional que presenta un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.