



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES ESPECÍFICOS DE *Taenia solium* EN SU CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE CISTICERCOSIS HUMANA Y PORCINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YULIET MARCELA DIAZ MASMELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Gladis del Carmen Fragozo González

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LOS ANTÍGENOS INMUNODOMINANTES ESPECÍFICOS DE *Taenia solium* EN SU CAPACIDAD DIAGNÓSTICA DE CISTICERCOSIS HUMANA Y PORCINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YULIET MARCELA DIAZ MASMELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de mayo del 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **DÍAZ MASMELA YULIET MARCELA** con número de cuenta **510450658** con la tesis titulada "Evaluación de los antígenos inmunodominantes específicos de *Taenia solium* en su capacidad diagnóstica de cisticercosis humana y porcina", realizada bajo la dirección del **DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUÍZ**:

Presidente: Dr. Juan Pedro Laclette San Román
Vocal: Dra. Laura Adalid Peralta
Secretario: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González
Suplente: Dr. Agustín Plancarte Crespo
Suplente: Dra. Agnès Odile Marie Fleury

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 29 de julio del 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos de investigación recibidos por PAPIIT-UNAM IT201613.

A la beca CONACYT (número de becario 240101)

A mi asesor, el Dr. Raúl José Bobes Ruiz, por su valioso apoyo y confianza en mi trabajo, y por la ayuda brindada para la realización y culminación del mismo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Gladis del Carmen Fragoso González y el Dr. Edgar Zenteno Galindo, por su apoyo y aporte de ideas para mejorar el desarrollo de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Juan Pedro Laclette San Román, por darme la confianza para trabajar y formar parte de su grupo de investigación, brindándome el apoyo y las facilidades para el desarrollo de mi proyecto.

Al Dr. Julio Cesar Carrero, por su amistad y también por su apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde, por su valioso apoyo y sus comentarios atinados para el avance de mi proyecto.

A la M. en C. Patricia de la Torre, por su amistad y colaboración durante el desarrollo de mi proyecto.

A Tzipe Govezensky, por su gran apoyo con el análisis de los datos, cuya contribución fue clave para la culminación de mi proyecto de investigación.

A la M. en C. Cristina Parada Colín, por su colaboración en la purificación de las proteínas recombinantes.

A la Dra. Rutilia Marisela Hernández González, por su contribución con las muestras de suero utilizadas en este trabajo.

A la Dra. Nelly Villalobos, por su apoyo en la recolección de las muestras de suero de cerdos.

Al licenciado en Matemáticas Karel Estrada Guerra, del grupo de Bioinformática proyecto IMPULSA 3 Genoma de *Taenia solium*.

A mis amigas, Milka Luna Nácar, Babara Moguel, Adriana Ayón y Diana Ríos Valencia, por su apoyo incondicional, gran amistad y valiosa compañía durante toda mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, José Navarrete, Jeanette Flores, César Díaz Godínez y Christian García por su apoyo y amistad.

DEDICATORIA

A mis padres Adolfo Díaz Perdomo y Graciela Másmela Quijano, mi esposo Guillermo Aquino Jarquín y mis hermanos Gustavo Adolfo Díaz y Adriana Vanessa Díaz, por su apoyo incondicional cada día, sus consejos y creer siempre en mí y en mis capacidades para alcanzar esta gran meta en mi vida. Agradezco a Dios por darme esta hermosa familia y esta oportunidad.

TABLA DE CONTENIDO.

1. RESUMEN.	1
2. ABSTRACT.	3
3. INTRODUCCIÓN.	5
3.1 <i>Taenia solium</i> .	5
3.2 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	6
3.3 Neurocisticercosis.	7
3.4 Cisticercosis porcina.	9
3.5 Métodos de detección de anticuerpos.	11
3.6 Métodos de detección de antígenos.	11
3.7 Nuevas estrategias para el diagnóstico de la cisticercosis humana y porcina.	14
3.8 Antecedentes.	15
4. JUSTIFICACIÓN.	18
5. HIPÓTESIS.	19
6. OBJETIVOS.	20
6.1 Objetivo general.	20
6.2 Objetivos específicos.	20
7. METODOLOGÍA.	21
7.1 Identificación de los péptidos con mayor índice de antigenicidad.	21
7.2 Clonación de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	21
7.2.1 Extracción de RNA de cisticercos de <i>T. solium</i> .	21
7.2.2 Amplificación de las secuencias codificadoras de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	22
7.2.3 Clonación de la proteína cinasa dependiente de AMPc.	23
7.2.4 Clonación de la proteína anexina B1.	23

7.3 Expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	24
7.4 Purificación de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	25
7.5 Ensayo de Western blot para la detección del tallo de histidina en las proteínas recombinantes.	25
7.6 Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes.	26
7.7 Análisis de los datos.	26
8. RESULTADOS.	28
8.1 Péptidos con el mayor índice de antigenicidad de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	28
8.2 Clonación de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	30
8.2.1 Extracción de RNA de cisticercos de <i>T. solium</i> .	30
8.2.2 Amplificación de las secuencias codificadoras de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	31
8.2.3 Clonación de la proteína cinasa dependiente de AMPc.	32
8.2.4 Clonación de la proteína anexina B1.	33
8.3 Expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	34
8.4 Purificación de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	35
8.5 Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes.	37
8.5.1 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de los péptidos sintéticos utilizando muestras de suero de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis.	37
8.5.2 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de las proteínas recombinantes utilizando muestras de suero de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis.	41
8.5.3 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de los péptidos sintéticos utilizando muestras de suero de humanos positivos para NCC, negativos para NCC y con otras alteraciones neurológicas.	42

8.5.4 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de las proteínas recombinantes utilizando muestras de suero de humanos positivos para NCC, negativos para NCC y con otras alteraciones neurológicas.	43
9. DISCUSIÓN.	50
10. CONCLUSIONES.	58
11. BIBLIOGRAFÍA.	59
12. ANEXOS.	71
13. ARTÍCULO CIENTÍFICO	77

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Mapa que muestra la distribución a nivel mundial de <i>T. solium</i> .	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. solium</i> .	7
Figura 3. Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de <i>T. solium</i> , contra la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos a diferentes intervalos de pH.	16
Figura 4. Gráficas que muestran los índices de antigenicidad de los péptidos de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	28
Figura 5. Alineamiento de la secuencia de la proteína cinasa dependiente de AMPc de <i>T. solium</i> , con las secuencias de otros parásitos relacionados.	29
Figura 6. ARN total aislado a partir de cisticercos de <i>T. solium</i> .	31
Figura 7. Amplificación de las regiones codificantes para las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	31
Figura 8. Restricción enzimática del vector pET23a, que muestra la liberación del inserto correspondiente a la región codificante de la proteína cinasa dependiente de AMPc.	32
Figura 9. Restricción enzimática del vector pET23a, que muestra la liberación del inserto correspondiente a la región codificante de la proteína anexina B1.	33
Figura 10. Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc a diferentes tiempos.	34
Figura 11. Expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc a las 6 horas de inducción.	35

Figura 12. Purificación de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	36
Figura 13. Detección de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc por Western blot con anticuerpo anti-histidina.	37
Figura 14. Péptidos de la proteína anexina B1 que presentaron un mayor reconocimiento de verdaderos positivos.	38
Figura 15. Péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc que presentaron un mayor reconocimiento de verdaderos positivos.	39
Figura 16. Reconocimiento de los péptidos de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc por parte de las muestras de suero de humanos positivas y negativas para neurocisticercosis.	42
Figura 17. Reconocimiento de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc por parte de las muestras de suero de humanos positivas y negativas para neurocisticercosis.	44
Figura 18. Reconocimiento de las combinaciones entre péptidos y proteínas recombinantes por parte de las muestras de suero de cerdos cisticercosos y no cisticercosos.	46
Figura 19. Reconocimiento de las combinaciones entre péptidos y proteínas recombinantes por parte de las muestras de suero de humanos positivos y negativos para neurocisticercosis.	48

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Estudios relevantes para la detección de anticuerpos y antígenos de <i>T. solium</i>	12
Tabla 2. Proteínas inmunodominantes del cisticerco de <i>T. solium</i> identificadas por LC/ESI-MS/MS.	17
Tabla 3. Lista de péptidos sintéticos, identificados para las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	30
Tabla 4. Reconocimiento de las muestras de suero de cerdos y humanos verdaderos positivos (VP) y verdaderos negativos (VN) para cisticercosis, por los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	45
Tabla 5. Reconocimiento de las muestras de suero de cerdos y humanos positivos y negativos para cisticercosis, por las diferentes combinaciones entre péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.	49

1. RESUMEN.

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el estado larvario de *Taenia solium*. Esta parasitosis es un problema de salud pública en países en vías de desarrollo como México, y también en países industrializados debido al aumento de la inmigración desde áreas endémicas. Diversos reportes señalan que en nuestro país aún persisten las condiciones para que el ciclo de vida de *T. solium* se desarrolle.

En la actualidad existen diferentes formas para realizar el diagnóstico de la cisticercosis, y entre ellas son comunes los criterios clínicos junto con las técnicas de neuroimagen en humanos, la inspección en lengua en cerdos y las técnicas de inmunodiagnóstico para ambos. Estas últimas identifican la presencia de antígenos, indicativa de la viabilidad del parásito, y la presencia de anticuerpos, indicativa del contacto con el parásito. Si bien estas herramientas resultan muy atractivas en cuanto a costos y tiempo, no tienen una capacidad predictiva de una prueba diagnóstica adecuada, por lo que la optimización del inmunodiagnóstico para la cisticercosis continúa siendo un desafío. Por esta razón resulta necesario generar nuevas herramientas diagnósticas, altamente sensibles y específicas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades de dos proteínas inmunodominantes de *T. solium*: la anexina B1 y la cinasa dependiente de AMPc, en su capacidad diagnóstica para la cisticercosis humana y porcina.

Con la finalidad de identificar epítomos que pudieran ser útiles en el diagnóstico, se identificaron *in silico* péptidos antigénicos a partir de las secuencias de aminoácidos, de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc. Los péptidos con el mayor índice de antigenicidad para cada proteína, así como las dos proteínas expresadas en forma recombinante, fueron evaluados y comparados en su capacidad diagnóstica para la cisticercosis humana y porcina. Para ello se emplearon ensayos de ELISA, utilizando muestras de sueros de humanos y cerdos, positivos y negativos para la cisticercosis. Adicionalmente, se

utilizaron muestras de suero de cerdos afectados por otras parasitosis y sueros de individuos no infectados con alteraciones neurológicas. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, presentaron epítomos que fueron reconocidos por las muestras de suero de cerdos y humanos positivos para cisticercosis. En el caso de los péptidos, éstos presentaron un reconocimiento de hasta 62%; mientras que para las proteínas recombinantes el reconocimiento alcanzó hasta 58%. Por otro lado, cuando se emplearon combinaciones de las proteínas recombinantes y los péptidos sintéticos, se observó que el reconocimiento de los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, alcanzó hasta 85% y 70% respectivamente al usar las muestras de suero de humanos positivos para cisticercosis.

Adicionalmente, los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes evaluados de manera individual, lograron discriminar muestras negativas para cisticercosis de las positivas (de 93% a 100%). Se obtuvo seropositividad con 2 de las 6 muestras de suero de cerdos con otras parasitosis, así como con 1 de las 9 muestras de suero de humanos con otras neuropatologías, empleando proteínas recombinantes, y en 4 de 9 sueros analizados con péptidos sintéticos. Considerando que los sueros utilizados provienen de México, país endémico para la cisticercosis, no puede descartarse que estos falsos positivos resulten de contactos previos con el parásito.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que los antígenos recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc en conjunto con los péptidos sintéticos, presentan epítomos que podrían considerarse para el desarrollo de un kit diagnóstico de cisticercosis humana y porcina con utilidad para estudios seroepidemiológicos.

2. ABSTRACT.

Cysticercosis is a parasitic disease caused by the larval stage of *Taenia solium*. This parasitic disease is a public health issue in developing countries such as Mexico, and also in industrialized countries due to increased immigration from endemic areas. Several reports in our country reflect that conditions favoring the life cycle of *T. solium* still persist.

To date, different ways to perform cysticercosis diagnosis are available; among them, clinical criteria with neuroimaging techniques in humans, tongue inspection in pigs, and immunodiagnostic techniques for both are very common. These latter rely on identifying the presence of antigens, indicative of parasite viability, and the presence of antibodies, indicative of contact with the parasite. While these tools are very attractive in terms of cost and time, they lack an adequate diagnostic predictive ability, so immunodiagnostic optimization remains a challenge. Therefore, new highly sensitive and specific diagnostic tools are required.

The objective of this work was to evaluate the properties of two immunodominant proteins of *T. solium*: annexin B1 and cAMP-dependent kinase, with respect to their capacity to diagnose human and porcine cysticercosis.

In order to identify epitopes that may be useful in diagnosis, antigenic peptides were identified by *in silico* analysis employing the amino acid sequences of the proteins annexin B1 and cAMP-dependent kinase. Those peptides with the highest antigenicity score for each protein, along with the two proteins recombinantly expressed, were evaluated and compared in their ability to diagnose human and porcine cysticercosis. Sera from humans and pigs with a confirmed diagnosis (infected/non-infected) were assayed for detection by ELISA. Sera from pigs with other parasitoses and from human patients with different non-infectious neuropathologies were also assayed.

Our results showed that annexin B1 and cAMP-dependent kinase antigens have epitopes which were recognized by a significant fraction of cysticercosis-positive human and pig serum samples. In the case of peptides, this recognition reached 62%; while for recombinant proteins such recognition was up to 58%. Furthermore, when combinations of recombinant proteins and synthetic peptides were used, the rate of recognition of the annexin B1 and Camp-dependent kinase antigens was up to 85% and 70% respectively, using serum samples positive for human cysticercosis.

In addition, the synthetic peptides and recombinant proteins were able to discriminate between negative and positive cysticercosis samples (93% to 100%). Two out of 6 serum samples from pigs with other parasitoses yielded a positive result when assayed with recombinant proteins, as well as 1 out of 9 serum samples from human patients with unrelated neuropathologies, while 4 out of 9 serum samples were positive when assayed with synthetic peptides. Considering that all sera employed came from Mexico, a country endemic for cysticercosis, it is feasible that these false positives resulted from a previous contact with the parasite.

Finally, our results suggest that the recombinant antigens annexin B1 and cAMP-dependent kinase in conjunction with synthetic peptides, present epitopes that could be suitable candidates to develop a diagnosis test for human and porcine cysticercosis.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1 *Taenia solium*.

Taenia solium es el parásito causante de la teniasis/cisticercosis. En su estado adulto (causante de la teniasis), es un gusano plano con escólex, cuello y una cadena de muchos segmentos denominados proglótidos. Este se desarrolla en el intestino delgado del ser humano, donde se adhiere al epitelio intestinal por medio de una doble corona de ganchos, seguido de esta, se encuentra el cuello a partir del cual se producen segmentos de proglótidos inmaduros, maduros y grávidos. Estos últimos son los más distales al cuello y pueden contener miles de huevos, muchos de ellos maduros, que son liberados con las heces del hospedero y contaminan al medio ambiente. Por otro lado el cisticerco de *T. solium*, (estado larvario del parásito), es una vesícula blanquecina con una pared translúcida y llena de líquido, que mide alrededor de 1-2 cm y a través de la cual se puede observar el escólex invaginado.

La teniasis y la cisticercosis son parasitosis que causan problemas de salud y pérdidas económicas en países en vía de desarrollo de Latinoamérica, África y Asia (1-3) (Figura 1). En países industrializados, la incidencia de la cisticercosis humana se ha reportado como una enfermedad importada, debido al aumento de la inmigración desde áreas endémicas, aun así, se han reportado casos autóctonos debido a la transmisión de los portadores asintomáticos de la *Taenia*, que probablemente adquirieron la infección en el extranjero (4-6).

La cisticercosis es una parasitosis que está relacionada con pobreza, condiciones sanitarias inadecuadas, falta de higiene, a cerdos que deambulan libres por las calles en busca de alimento y antecedentes de teniasis dentro del núcleo familiar (7, 8).

Endemicity of *Taenia solium*, 2015

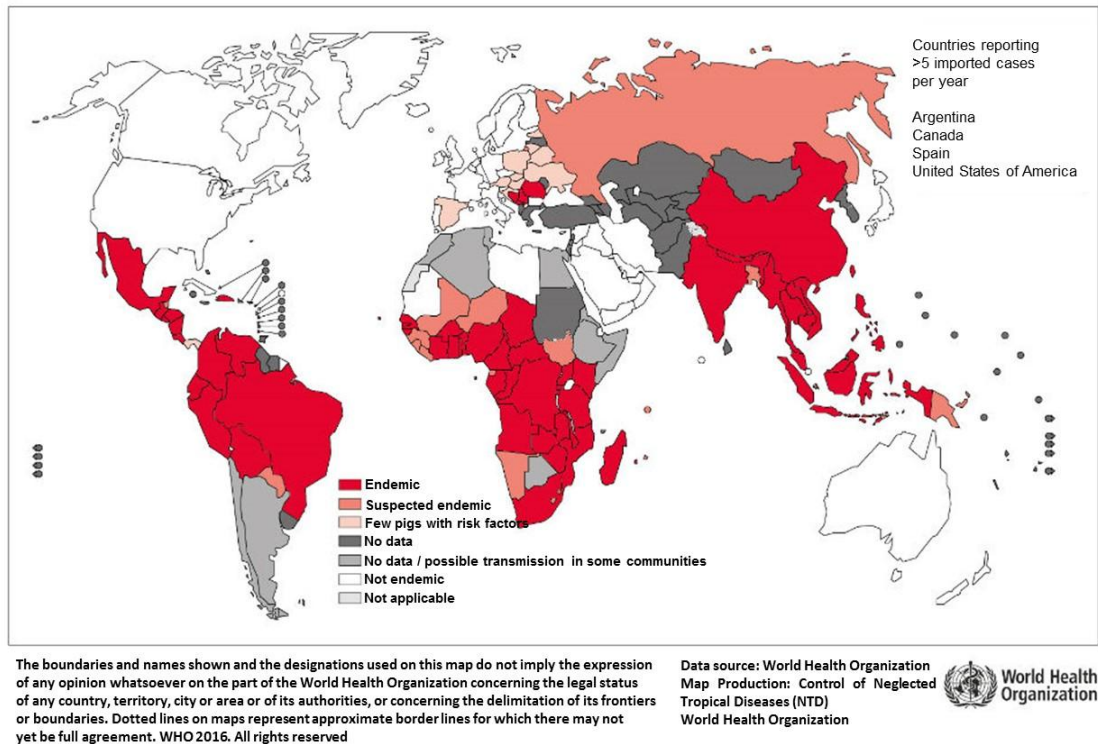


Figura 1. Mapa que muestra la distribución a nivel mundial, de *T. solium*.

3.2 Ciclo de vida de *Taenia solium*.

El ciclo de vida del parásito involucra a dos hospederos, al humano como hospedero definitivo y al cerdo como hospedero intermediario. El humano se infecta y desarrolla la teniasis (estado adulto del parásito), cuando ingiere carne de cerdo mal cocida y contaminada con cisticercos viables. Por otro lado, los cerdos adquieren la cisticercosis (estado larval del parásito) al ingerir los huevos o proglótidos grávidos liberados en las heces de humanos portadores del estado adulto del parásito. En el cerdo, el cisticerco puede llegar a localizarse en diferentes tejidos como el músculo esquelético, ojos, corazón y cerebro. Adicionalmente, el humano también puede adquirir la cisticercosis cuando ingiere accidentalmente huevos de *T. solium*; en este caso, el cisticerco puede llegar a localizarse a nivel del sistema nervioso central (SNC) causando la

neurocisticercosis (NC), que es la forma más grave de la enfermedad (8, 9) (Figura 2).

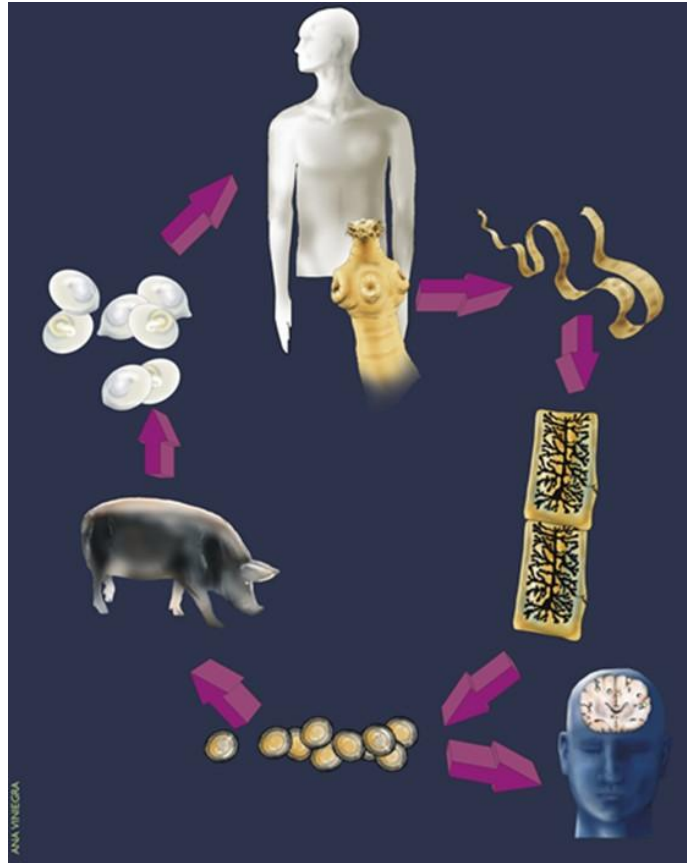


Figura 2. Ciclo de vida de *T. solium*. (Flisser A y cols. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. Investigación y ciencia. Mayo 2006).

3.3 Neurocisticercosis.

La NC es la infección del SNC con el cisticerco de *T. solium*. Esta enfermedad puede ser tanto asintomática como sintomática y la severidad de los síntomas dependen de muchos factores como: el número, tamaño y localización de los cisticercos y de la intensidad de la respuesta inmune del hospedero (10, 11).

Algunas de las manifestaciones de la NC pueden ser: dolor de cabeza intenso, convulsiones, hidrocefalia, ceguera y diversos síntomas neurológicos (12).

La NC es considerada como una enfermedad desatendida, a pesar de que se considera un problema de salud en áreas endémicas. Se ha reportado como la infección parasitaria más común del SNC y la causa más frecuente de epilepsia en países en vía de desarrollo, siendo responsable de aproximadamente el 30% de los casos de epilepsia en estos países (2, 6, 13). En México aún se mantienen las condiciones para que el ciclo de vida de *T. solium* se desarrolle; ya que, según los reportes de los últimos 10 años existe hasta un 32% de prevalencia de cisticercosis porcina, en algunas comunidades y cerca de 500 casos de NC fueron reportados (14). Aunque estos datos no representan la carga real de NC y de la cisticercosis porcina, si evidencian que *T. solium* aún sigue siendo un problema de salud en México (14).

Para el diagnóstico de la NC, se utilizan comúnmente las técnicas de neuroimagen (Resonancia Magnética Nuclear y Tomografía Axial Computarizada). Estas técnicas muestran la morfología y localización de los cisticercos, el estado en el que se encuentra el cisticerco, y la presencia de inflamación alrededor de las lesiones (11). Adicionalmente, se tienen en cuenta varios criterios clínicos y epidemiológicos; así como, el análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR), que se obtiene de los pacientes mediante punción lumbar y permite evaluar el grado de inflamación del SNC, a través del análisis de las células inflamatorias en el LCR, o mediante la búsqueda de anticuerpos específicos mediante ELISA utilizando antígenos de interés purificados y/o antígenos de secreción del parásito, como el antígeno HP10 (15-17).

En conjunto con la clínica, las técnicas de inmunodiagnóstico han sido herramientas útiles para apoyar el diagnóstico de la NC y cisticercosis porcina (18). Así mismo, para la realización de estudios epidemiológicos que permitan estimar la prevalencia de la infección, así como dar seguimiento a la misma durante y después de programas de control (18). Los ensayos de inmunoelectrotransferencia (EITB) e inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA),

han sido los más utilizados para el inmunodiagnóstico de esta parasitosis, debido a que, por un lado el ELISA tiene la ventaja de ser una técnica sensible, simple, de bajo costo y eficaz, ya que se pueden evaluar muchas muestras al mismo tiempo (19) y el EITB utilizando antígenos purificados, tiene una mayor especificidad y sensibilidad (20,21). Estos ensayos, han sido orientados a la búsqueda de anticuerpos específicos y antígenos circulantes del parásito, fundamentalmente en suero y LCR.

La prueba mejor documentada hasta el momento y conocida como el “estándar de oro”, es el EITB, utilizando antígenos purificados por lectin-lectina (LLGP), para detectar anticuerpos contra el cisticerco de *T. solium* en suero. El test presenta una especificidad del 100% y sensibilidad de alrededor del 98% en pacientes con dos o más cisticercos viables en el SNC, mientras que en pacientes con un cisticerco intracraneal, la sensibilidad decae a un 50-60% (20, 22). En cuanto a la detección de antígenos del parásito en suero o LCR, existen dos métodos que han sido validados y son usados rutinariamente para la detección de antígenos del parásito y se basan en la utilización de anticuerpos monoclonales (23). Estos son el test B158/B60 Ag-ELISA y el HP10 Ag-ELISA, con los cuales se ha reportado porcentajes de sensibilidad de >80% en suero de humanos y >90% en LCR (16, 24, 25).

3.4 Cisticercosis porcina.

La cisticercosis porcina es una infección parasitaria causada por el establecimiento del cisticerco de *T. solium* en diferentes tejidos del cerdo (músculo esquelético, ojos, corazón y cerebro). Esta prevalece en países en vía de desarrollo, donde existen condiciones que favorecen la persistencia del ciclo de vida del parásito (26).

En México, no se tienen datos oficiales de la prevalencia de la cisticercosis porcina, ya que no se ha realizado un estudio epidemiológico que permita establecerla en todo el territorio nacional (27). Sin embargo, datos obtenidos por

medio de la inspección en lengua de cerdos vivos en diferentes áreas del país, indicaron que en varias comunidades del estado de Morelos la prevalencia fue del 4 al 10%; además también se encontraron algunos casos en los que se reportó el 33% (7, 28). Por otro lado, de septiembre del 2009 a diciembre del 2012 se llevó a cabo un estudio epidemiológico en tres regiones del estado de Guerrero. Se evaluó el impacto de un programa de control de la teniasis-cisticercosis, basado en la educación a la comunidad y la vacunación de cerdos. Se observó que después del programa, hubo una disminución de la cisticercosis porcina mediante seroprevalencia (17.7 a 13.3%) así como, mediante examen en lengua (7 a 0.5%) y ultrasonido (3.6 a 0.3%) (29).

El método más común aunque poco sensible (30), que se utiliza para el diagnóstico de la cisticercosis porcina, es la inspección en lengua. Además, este es un procedimiento que requiere de la sujeción del animal y de la participación de personal entrenado. En cuanto al inmunodiagnóstico, varias técnicas han sido empleadas, entre éstas, el ensayo de EITB con LLGP (20) y el ensayo de ELISA para la detección de antígenos de secreción del parásito (31) y otros, diseñados a partir de diferentes fuentes antigénicas (32-34). No obstante, en un estudio donde se evaluaron diferentes métodos de diagnóstico (inspección en lengua, detección de antígenos o anticuerpos por ELISA y EITB con LLGP), se reportó que en cerdos rurales que presentaban una carga ligera de parásitos (entre 1 y 5 cisticercos, a excepción de 1 cerdo que presentó 80 cisticercos) el diagnóstico no tenía la sensibilidad y especificidad adecuada (30). Por otro lado, en un estudio reciente se observó que el examen del músculo del cuello de los cerdos, junto con el inmunodiagnóstico con ELISA utilizando antígeno crudo del cisticerco de *T. solium*, fueron herramientas más sensibles y por lo tanto útiles para el diagnóstico de la cisticercosis porcina en áreas endémicas (32).

3.5 Métodos de detección de anticuerpos.

Los métodos de detección de anticuerpos son útiles para realizar una evaluación cualitativa o cuantitativa mediante la determinación del título de anticuerpos, ya sea en suero o LCR. Es conocido, que una vez que la infección ha sido resuelta, el número de anticuerpos disminuye, pero los que quedan pueden permanecer por largos periodos. Por esta razón, la detección de anticuerpos no es la más apropiada para evaluar el resultado de un tratamiento o la prevalencia de la parasitosis en zonas endémicas (35); sin embargo, la presencia de anticuerpos específicos indica que hubo exposición al parásito, aunque no detecta la presencia de una infección persistente, ni tampoco permite distinguir aquellos casos en donde el cisticerco se encuentra en los estados degenerativos coloidal o granular, donde existe una fuerte reacción inflamatoria (NC activa) y es difícil diferenciarlos de los casos en donde el cisticerco se encuentra calcificado y hay una mínima respuesta inmune (NC inactiva) (36).

Las fuentes antigénicas utilizadas para la detección de anticuerpos, han sido extractos totales de proteínas del parásito, fracciones específicas del cisticerco de *T. solium* altamente purificadas, así como antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, con los que se ha logrado incrementar la sensibilidad y especificidad (21, 37, 38).

3.6 Métodos de detección de antígenos.

Los métodos para la detección de antígenos, son de gran utilidad; ya que, reflejan la presencia de parásitos “viables”, lo que resalta su importancia como una herramienta para el seguimiento de terapias antiparasitarias (15, 39). Los ensayos para detección de antígenos del cisticerco de *T. solium*, se llevan a cabo en suero y LCR utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales, siendo estos últimos más específicos para la técnica, ya que son dirigidos contra antígenos particulares del parásito (17, 39). Cuando el cisticerco se localiza en el SNC, la detección de antígenos en LCR es más eficiente que cuando se utiliza suero (22, 40), sin

embargo, hay que señalar que el procedimiento para obtener las muestras de LCR es invasivo para el paciente. Hasta el momento existen pruebas que han sido validadas y se usan rutinariamente en la detección de antígenos para el diagnóstico de la NC (16, 24); No obstante, se ha reportado que los resultados no alcanzan la misma sensibilidad y especificidad obtenida en las pruebas para detección de anticuerpos (41), y además los antígenos pueden compartirse con los de otros parásitos y dar lugar a falsos positivos. Por tal motivo, la detección de antígenos no sería el método más adecuado para un diagnóstico inicial de la cisticercosis, aunque estos son considerados la mejor herramienta para llevar a cabo un seguimiento de casos ya confirmados (41).

A pesar de contar con estas herramientas, el diagnóstico de la cisticercosis, debida a *T. solium* aún sigue siendo un desafío; ya que, se ha observado que la especificidad puede llegar a ser baja en algunos casos, utilizando las técnicas de neuroimagen y los criterios clínicos. Así mismo, la técnica de punción lumbar para el análisis del LCR, es un procedimiento muy invasivo para el paciente. Por otro lado, se ha reportado que los test de inmunodiagnóstico presentan sensibilidad y especificidad variada (11); debido a que, dependen de muchas variables como: el tipo de muestra (suero, orina, LCR), la fuente antigénica y la técnica utilizada (ELISA o EITB). Además de otras variables que tienen que ver con la propia parasitosis como: el número de parásitos, su localización y estado de desarrollo del mismo (Tabla 1).

Tabla 1: Estudios relevantes para la detección de anticuerpos y antígenos de *Taenia solium*.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS				
Fuente antigénica	Técnica	Muestra	Sensibilidad/especificidad	Ref.
CM S2 y DEAE S2 fracciones del cisticerco de <i>T. saginata</i> , purificadas por cromatografía de intercambio iónico	ELISA	Suero	CM S2: 88.8/93.7% DEAE S2: 93.4/92.6%	[45]

Antígenos de 10-30 kDa de <i>T. solium</i> , separados por 2DPAGE	EITB	Suero	73.7/92%	[34]
DEAE S1 and DEAE S2 fracciones del cisticerco de <i>T. solium</i> , purificadas por cromatografía de intercambio iónico	ELISA	Suero	DEAE S1: 87.5/87.9% DEAE S2: 90/90.4%	[34]
Antígeno recombinante Ts8B2 y péptido sintético Ts8B2-4 del cisticerco de <i>T. solium</i>	ELISA	Suero	Ts8B2: 91.3/92.5 (NC activa) 68.6/92.5 (NC inactiva) Ts8B2-4: 21.7/96.7% (NC activa) 13.7/96.7% (NC inactiva)	[71]
Antígeno recombinante Tsol-p27 del cisticerco de <i>T. solium</i>	Dot-blot ELISA EITB	Suero	86.7/94.6% 86.7/94.6% 76.4/95.6%	[54]
Antígenos purificados de bajo peso molecular del cisticerco de <i>T. solium</i>	ELISA	Suero LCR	25/100% (NC inactiva) 90.9/100% (NC activa) 25/95.8% (NC inactiva) 90.9/95.8% (NC activa)	[57]
Antígeno de <i>T. saginata</i> HP6-Bac y HP6-GST	ELISA	Suero LCR	HP6-Bac: 77.4/95.4% HP6-GST: 80.6/93.1% HP6-Bac: 76.9% HP6-GST: 73.1%	[58]
E/S antígeno de 43kDa	EITB	Suero LCR	(suero) 88.23/100% (LCR) 89.28%	[72]
Antígeno TsAg5 del cisticerco de <i>T. solium</i>	EITB	Suero	75.44% (múltiples cisticercos) 39.62% (un solo cisticerco) 96.36% (NC extraparenquimal) Especificidad 76.70%	[73]
DETECCIÓN DE ANTÍGENOS				
Fuente antigénica	Técnica	Muestra	Sensibilidad/especificidad	Ref.
Anti-Ag de E/S del cisticerco de <i>T. saginata</i>	ELISA	Suero	85.7/96.9%	[39]
Anti- Ag <i>T. solium</i> (Tso) y <i>T. crassiceps</i> (Tcra)	ELISA	LCR	(Tso) 81.2/82% (Tcra) 90/98% (Tcra <30 kDa) 95.8/100%	[74]

Anti- Ag total de cisticerco de <i>T. solium</i>	Aglutinación	Suero	75/100% (Co-A)	[75]
	(Co-A)	Orina	62.5/100% (Co-A)	
	ELISA	Suero	62.5/96% (ELISA)	
Antígeno HP10	ELISA	Suero	84.8/94%	[25]
		LCR	91.3%	
Antígeno B	ELISA	LCR	70/90%	[76]
Antígenos de cisticerco de <i>T. solium</i>	ELISA	Orina	(Suero) 90/98%	[77]
		Suero	(Orina) 86/88%	
Antígenos de cisticerco de <i>T. solium</i>	ELISA	Suero	85.7/96.9% (NC inactiva aparentemente)	[39]
Antígenos somáticos y de E/S del cisticerco de <i>T. solium</i>	EITB	Suero	56.9/93.9% (Ag somático)	[40]
			64.7/95.4% (Ag E/S)	
		LCR	78.6/95.2% (Ag somático)	
			67.8/97.6% (Ag E/S)	
		Orina	50/97% (Ag somático)	
	62.5/96% (Ag E/S)			

3.7 Nuevas estrategias para el diagnóstico de la cisticercosis humana y porcina.

Existen nuevas estrategias que han contribuido a la identificación de moléculas antigénicas que han sido propuestas para el diagnóstico de la cisticercosis. Algunas de ellas hacen uso de las herramientas proteómicas (separación de proteínas mediante geles en doble dimensión-2D-PAGE), para la identificación de proteínas específicas inmunoreactivas mediante inmunoblot y la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (MS). Estas herramientas, han sido de gran utilidad para la identificación de antígenos blanco específicos que pudieran ser utilizados en el diagnóstico de la cisticercosis (34, 38, 42, 43). Un ejemplo de ello, es el caso de los antígenos Tsol-p27, anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, antígenos del cisticerco de *T. solium*, que fueron

identificados por 2D-PAGE y Western blot. Para la identificación de estos antígenos se utilizaron muestras de suero de humanos en el caso de Tsol-p27 y de cerdos en el caso de los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc. Las proteínas fueron identificadas por MS y fueron propuestas como posibles blancos para ser evaluados serológicamente (38, 42).

Adicionalmente, el fraccionamiento de antígenos del cisticerco de *T. solium*, o de antígenos heterólogos del cisticerco de *T. saginata* por cromatografía de intercambio iónico, ha sido una técnica que ha permitido seleccionar antígenos potencialmente útiles para el inmunodiagnóstico de la NC, evitando las reacciones cruzadas con suero de pacientes infectados con otros helmintos (44, 45).

Recientemente el uso de la tecnología de despliegue en fagos, para el aislamiento directo de anticuerpos scFv (fragmentos variables de cadena sencilla de la molécula de inmunoglobulina), ha sido utilizada para la identificación de antígenos que sean reconocidos por estos anticuerpos y posteriormente evaluar el potencial de dichos antígenos para el diagnóstico de NC (46).

3.8 Antecedentes.

En la primera parte de este proyecto, se identificaron antígenos inmunodominantes, (antígenos que son más fácilmente reconocidos por el sistema inmune) específicos del cisticerco de *T. solium* mediante proteómica. Lo anterior, con el fin de proponer antígenos blanco para la realización de un método diagnóstico y tratar de optimizar la especificidad y sensibilidad para la detección de la cisticercosis porcina. Para este propósito se obtuvieron cisticercos de músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados. A partir de estos, se preparó un extracto de proteínas totales y se separaron las proteínas del mismo, utilizando la técnica de electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE). Las proteínas obtenidas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó la técnica de inmunoblot, utilizando mezclas de sueros de cerdos cisticercosos infectados naturalmente, de cerdos negativos por necropsia y seropositivos por la

prueba de ELISA (falsos positivos), de cerdos negativos por necropsia seronegativos (control negativo) y de cerdos infectados con otras parasitosis (*Ascaris spp.*, y *Cysticercus tenuicollis*). Los resultados obtenidos mostraron que un total de 13 proteínas fueron reconocidas específicamente con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos (no fueron reconocidas con los controles) y presentaron p.I entre 4.9-5.7 y PM entre 25-47.8 kDa (Figura 3).

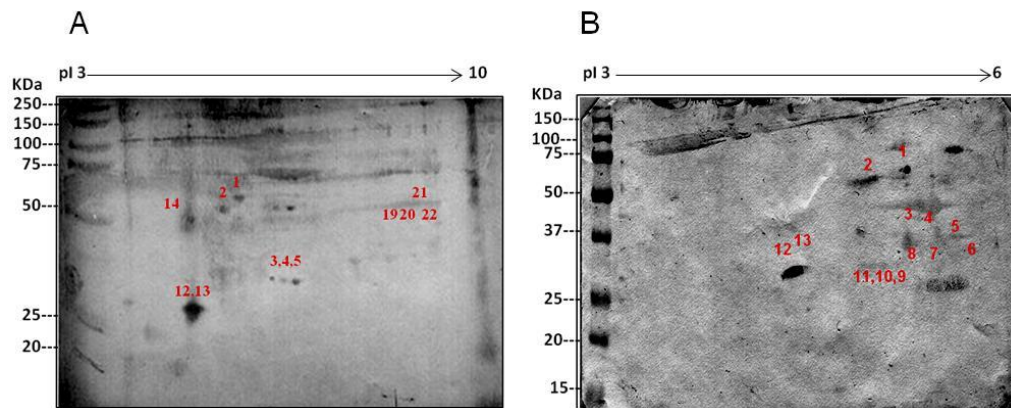


Figura 3. Inmunoblots representativos de tres ensayos, del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros de cerdos cisticercosos a diferentes intervalos de pH. A) pH 3-10 y B) pH 3-6. Los números en rojo indican las 13 proteínas que presentaron un reconocimiento específico.

Posteriormente, por espectrometría de masas se logró identificar un total de 9 proteínas correspondientes a proteínas de citoesqueleto, involucradas en procesos de señalización, metabolismo y estrés (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas inmunodominantes del cisticercos de *T. solium* identificadas por LC/ESI-MS/MS.

Table 1
Identification of the antigenic proteins of the whole *Taenia solium* cysticerci by LC/ESI-MS/MS.

Spot number	Protein	Species	Accession number (NCBI)	MW (kDa) exp/theo	pI exp/theo	Matched peptides	Sequence coverage %	MASCOT score
Ts1_1	<u>Alpha-1 tubulin</u>	<i>Hirudo medicinalis</i>	gi 1527170	47.2/50.7	5.1/4.94	19	41	749
Ts1_2	<u>Beta-tubulin 2</u>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 29337144	46.3/50.2	4.7/4.75	37	62	1064
Ts1_3	<u>Small heat-shock protein</u>	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.22/5.56	18	55	535
Ts1_4	<u>Small heat-shock protein</u>	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.21/5.56	17	50	492
Ts1_5	<u>Small heat-shock protein</u>	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.41/5.56	24	57	539
Ts1_6	<u>Annexin B1</u>	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	28.6/38.1	5.44/5.71	21	58	1101
Ts1_7	<u>Annexin B1</u>	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	28.6/38.1	5.34/5.71	21	73	957
Ts1_8	<u>Similar to alpha-tubulin</u>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	gi 115736220	28.6/50.7	5.2/5.06	5	17	200
Ts2_9	<u>Annexin B1</u>	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	26.7/38.1	5.4/5.71	4	14	168
Ts1_10	<u>cAMP-dependent protein kinase</u>	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256052513	28.6/43	5.0/5.12	3	8	70
Ts1_11	<u>Tropomyosin 2</u>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 220897456	28.6/28.3	4.93/4.93	5	18	103
Ts1_12	<u>Putative 14-3-3 protein</u>	<i>Echinococcus granulosus</i>	gi 62178030	23.3/28.2	4.8/4.91	22	51	448
Ts1_13	<u>Full=14-3-3 protein</u>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 29336772	21.6/27.9	4.75/4.8	37	79	1093

LC/ESI-MS/MS, liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry; MW (kDa) exp/theo, molecular weight experimental/theoretical; pI exp/theo, isoelectric point experimental/theoretical.

Estas proteínas se analizaron con la base de datos del genoma de *T. solium*, y de esta manera, se logró identificar la secuencia de aminoácidos de cada uno de los 7 antígenos (31). Adicionalmente, se realizaron alineamientos de las secuencias de proteínas de los 7 antígenos, con las secuencias reportadas para otros parásitos relacionados, encontrando que 2 de las proteínas presentaron un mayor número de diferencias en su secuencia, con respecto a la de los otros parásitos relacionados (anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc). Lo anterior indicó, que dichas proteínas podían ser útiles para un diagnóstico más específico.

En base a estos resultados, en el presente trabajo se evaluó la propiedad diagnóstica de cisticercosis humana y porcina, de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMP cíclico, en la versión de proteínas recombinantes y de péptidos sintéticos. Lo anterior se llevó a cabo, utilizando un conjunto extenso de sueros de cerdos positivos para cisticercosis y con otras infecciones parasitarias, así mismo se utilizaron sueros de pacientes con NC confirmada y de individuos no infectados con alteraciones neurológicas.

4. JUSTIFICACIÓN.

El inmunodiagnóstico basado en la detección de anticuerpos contra antígenos del cisticerco de *T. solium*, es una herramienta que apoya el diagnóstico de la cisticercosis. Sin embargo, la capacidad predictiva de los métodos existentes es insuficiente, por lo que no se utilizan de rutina para el diagnóstico de cisticercosis humana ni porcina y su uso se limita a estudios epidemiológicos.

La capacidad predictiva de los ensayos existentes, depende del tipo de muestra utilizada: suero, orina, LCR, el antígeno empleado y la técnica utilizada para la detección (ELISA o EITB). La capacidad predictiva de los ensayos depende también de los sueros utilizados, y se favorece cuando los sueros incluyen altos niveles de anticuerpos, generalmente asociados a la presencia de múltiples parásitos e individuos más inflamatorios con mayor capacidad de producir anticuerpos. Es relevante mencionar, que la detección de anticuerpos no distingue entre individuos infectados o aquellos que han estado en contacto con el patógeno y han resuelto la infección satisfactoriamente.

En este trabajo resolvimos retomar el tema del inmunodiagnóstico, utilizando las nuevas herramientas genómicas y bioinformáticas, en el intento de identificar candidatos con mayor capacidad para el desarrollo de un ensayo diagnóstico reproducible y de alta capacidad predictiva.

5. HIPÓTESIS.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMP cíclico, contienen epítomos lineales y/o conformacionales específicos de *T. solium*, de interés para el desarrollo de ensayos para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana y porcina por *T. solium*.

6. OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Identificar en los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, las secuencias de interés para desarrollar un ensayo sensible y específico para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis porcina y humana.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Identificar los péptidos con mayor índice de antigenicidad de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.
- Clonar y expresar los antígenos de interés, para determinar su potencial en el inmunodiagnóstico de cisticercosis causada por *T. solium*.
- Evaluar los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, con muestras de suero de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis.
- Evaluar los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, con muestras de pacientes con NC, negativos para NC y con otros desórdenes neurológicos.
- Determinar cuál de los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, presenta una mejor propiedad diagnóstica de cisticercosis humana y porcina.

METODOLOGÍA.

7.1 Identificación de los péptidos con mayor índice de antigenicidad

Para la identificación de los péptidos con el mayor índice de antigenicidad, se llevó a cabo un análisis de las secuencias de aminoácidos de cada proteína de interés, utilizando la herramienta bioinformática “Immune Epitope Database And Analysis Resource, (www.iedb.org)”. A partir de estos algoritmos, se obtuvieron gráficas que mostraron la variación del índice antigénico en función de la posición de aminoácidos. Los picos más altos por encima del umbral, indicaron los grupos de residuos de aminoácidos que tuvieron la mayor probabilidad de ser reconocidos por los anticuerpos. A partir de estos datos, se sintetizaron péptidos por “USV LIMITED Custom Peptide Synthesis”. Una vez recibidos los péptidos, estos fueron reconstituidos en DMSO o agua dependiendo de su hidrofobicidad (1 mg/ml). Posteriormente se prepararon alícuotas de cada péptido y se guardaron a una temperatura de -20°C hasta su uso.

7.2 Clonación de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

7.2.1 Extracción de ARN de cisticercos de *T. solium*.

La extracción del ARN, se hizo a partir de 3 cisticercos aislados de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente. Se maceraron los cisticercos en 500 ml de Trizol y centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se adicionaron 220 µl de cloroformo a 4°C, el tubo se agitó durante 30 segundos y se incubó 5 minutos en hielo seco. Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa con el ARN, se transfirió a un tubo eppendorf estéril y a este volumen se le adicionó 600 µl de isopropanol, el tubo se agitó y se incubó a -20°C durante 1 hora. Posteriormente el

tubo se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue desechado. Por otro lado, el precipitado con el ARN se lavó adicionando 300 µl de etanol al 80%, posteriormente el tubo se agitó y centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante fue desechado. Finalmente el precipitado con el ARN se dejó secar durante 5 minutos y se resuspendió en 40 µl de agua DEPC.

7.2.2 Amplificación de la secuencia codificadora de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

A partir del ARN total, se llevó a cabo la amplificación del ADNc para cada una de las proteínas de interés. La amplificación se realizó mediante Retrotranscripción-acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando el sistema SuperScript III Transcriptasa reversa de Invitrogen, de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para esto se utilizaron 2 µl del ADNc y 1 µl de los siguientes oligonucleótidos:

- **Anexina B1:**

Sentido: 5´AATGGGTCGCGGATCCATGGCCTACTTGTCGCTCCCTG3´

Antisentido: 5´TGCTCGAGTGCGGCCGCTGCAGGGCCGATGAGTTTCAA3´

- **Cinasa dependiente de AMPc:**

Sentido: 5´AATGGGTCGCGGATCATGTCAAAGAAGGCTGTTG3´

Antisentido: 5´TGCTCGAGTGCGGCCATGGCGTAACTCGGGTAC3´

Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa al 1%. Las bandas que se encontraban en el tamaño molecular esperado fueron eluidas del gel y posteriormente purificadas mediante el método de fenol-cloroformo y precipitación por etanol al 70%. La integridad de la secuencia de los amplicones obtenidos se verificó por secuenciación capilar.

7.2.3 Clonación de la proteína cinasa dependiente de AMPc.

La región codificante de la proteína cinasa dependiente de AMPc, se clonó en el vector de expresión pET23a. Para esto, se digirió tanto el inserto como el plásmido con las enzimas *NotI* y *BamHI*. Para evitar la religación del vector, después de la digestión se desfosforilaron sus extremos utilizando la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP; New England Biolabs). Una vez desfosforilados los extremos del vector, se realizó la extracción con fenol-cloroformo y precipitación por etanol al 70%, para eliminar la CIAP y purificar el DNA. Posteriormente se cuantificó la concentración del vector y los insertos, mediante espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000, ThermoScientific). Para ligar los insertos en el vector, se realizó una reacción de ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa, a una relación (1:3) vector-inserto. La reacción de ligación se incubó a 16°C durante toda la noche. La transformación bacteriana se llevó a cabo utilizando toda la reacción de ligación y células competentes de la cepa de *Escherichia coli* JM109, mediante choque térmico a 42°C durante 90 segundos.

7.2.4 Clonación de la proteína anexina B1.

Debido a las dificultades que se presentaron para la clonación del amplicón de anexina B1, se decidió utilizar el kit comercial “In Fusion HD Cloning” (Clontech), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para este método se diseñó un par de oligonucleótidos con extensiones de 15 nucleótidos homólogos a los extremos del plásmido pET23a (mencionados en el apartado b), a partir de los cuales se amplificó la secuencia codificante de interés. Adicionalmente, se llevó a cabo la restricción enzimática de los extremos *NotI* y *BamHI* presentes en el plásmido. Posteriormente se mezclaron 2.5 µl del vector linearizado, 2 µl del fragmento de PCR purificado, 2 µl de la mezcla “In Fusion Enzyme Premix” y se llevó la reacción a un volumen final de 10 µl. La reacción de clonación se incubó durante 15 minutos a 50°C y posteriormente se realizó la transformación de

células competentes *E. coli* HST08 “Stellar™ Competent Cells” de Clontech. Para la transformación se siguió el protocolo PT5055-2 (Clontech).

De las placas donde se sembraron las células transformadas, se seleccionaron 4 clonas, las cuales se crecieron en medio LB con ampicilina (100 µg/ml). Posteriormente para verificar que las clonas fueran recombinantes, se llevó a cabo la restricción enzimática del DNA plasmídico y se corroboró la liberación de los fragmentos clonados. Adicionalmente, se analizó la integridad de las secuencias por secuenciación capilar.

7.3 Expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

La expresión de las proteínas se llevó a cabo en células de *E. coli* BL21 (DE3), las cuales son deficientes en la expresión de proteasas y además presentan la secuencia que codifica la ARN polimerasa T7 que se requiere para la expresión de los vectores pET23a.

Para la expresión de las proteínas recombinantes, las cepas transformadas se sembraron en 100 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) a 37°C con agitación constante (150 rpm) durante toda la noche. Posteriormente, se adicionaron 10 ml del cultivo anterior a 1000 ml de medio LB y se incubó a 37°C en agitación constante a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Posteriormente se adicionó el inductor IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido), a una concentración de 1 mM y la inducción se llevó a cabo durante 6 horas. Al finalizar el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 15 minutos. El precipitado de células se resuspendió en amortiguador de lisis y posteriormente la mezcla fue fragmentada por sonicación en hielo durante 3 ciclos de 2 minutos con pulsos de 9 segundos y 5 segundos de descanso. Posteriormente el cultivo lisado se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se separó del precipitado. Ambos se guardaron a -70°C hasta

su uso. La expresión de las proteínas se verificó, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.

7.4 Purificación de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

Para la purificación de las proteínas recombinantes, se utilizaron las fracciones solubles colectadas a las 6 horas de inducción de la expresión de las proteínas, las cuales se hicieron pasar por una columna de cromatografía líquida acoplada al sistema de cromatografía líquida automatizado “ÄKTA™FPLC”, de acuerdo a las instrucciones del fabricante se colectaron diferentes fracciones con las proteínas recombinantes y se analizaron en geles de poliacrilamida al 12%.

7.5 Ensayo de Western blot para la detección del tallo de histidina en las proteínas recombinantes.

Las fracciones obtenidas fueron separadas por electroforesis y posteriormente transferidas a membranas de PVDF (Membrana de transferencia Fluoruro de polivinilideno), mediante transferencia húmeda durante 70 minutos a 100 voltios, voltaje constante.

Las membranas fueron bloqueadas con albúmina en buffer de fosfatos (PBS) al 3% por 4-6 horas, con agitación lenta a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-HIS, acoplado a peroxidasa de rábano (Abcam USA) (Cell Signaling Technology USA), a una dilución 1: 2000, en PBS, durante toda la noche a 4°C y con agitación continua. Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana fue lavada 5 veces con PBS/Tween 1X. El revelado se hizo mediante el reactivo OPD. Las proteínas se visualizaron mediante la coloración azul del OPD.

7.6 Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes.

La prueba de ELISA se empleó para la detección de anticuerpos IgG en sueros de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis (*Cysticercus tenuicollis*, *Sarcocystis* sp y quiste hidatídico); así como, en sueros de humanos positivos y negativos para neurocisticercosis y de pacientes con otras alteraciones neurológicas (Hidrocefalia secundaria, Cefalea en estudio, Papiledema y fístula de LCR).

Para los ensayos de ELISA, se utilizó placas de 96 pozos, las cuales se sensibilizaron con una concentración de 1 µg por pozo del péptido o proteína recombinante y se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Después y al final de cada paso las placas se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS-Tween 0.05%. El bloqueo se realizó, incubando las placas con 200 µl de BSA 1% en PBS-Tween 0.05%, durante 40 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionaron 100 µl de las muestras de suero de cerdos a una dilución 1/100 y las muestras de suero de humanos a una dilución 1/200 y se incubaron por 40 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100 µl por pozo de los anticuerpos anti-IgG de cerdo (dilución 1/12000) y de humano (dilución 1/5000) (acoplados a peroxidasa de rábano) según fuera el caso. A continuación se adicionaron 100 µl por pozo del sustrato TMB y se dejó durante 10 minutos cuando se utilizaron las muestras de suero de cerdos y 25 minutos cuando se utilizaron las muestras de suero de humanos. Finalmente se detuvo la reacción con 100 µl por pozo de H₂SO₄ y se leyó la densidad óptica de las placas a 450 nm en un espectrofotómetro.

7.7 Análisis de los datos.

Inicialmente se clasificaron los datos de densidad óptica (D.O) obtenidos para cada muestra de suero como: positivos y negativos para cisticercosis porcina y positivos y negativos para NC. Lo anterior se llevó a cabo utilizando como umbral

entre sueros positivos y sueros negativos, el promedio más dos desviaciones estándar de los sueros negativos para cisticercosis. Una vez clasificados los datos, se calculó cuántos de los sueros positivos para cisticercosis fueron detectados como positivos por cada uno de los antígenos probados; así mismo, se calculó cuantos de los sueros negativos para cisticercosis fueron detectados como falsos positivos. Lo anterior se hizo a partir de los datos obtenidos para cada proteína recombinante y para cada péptido evaluado.

Adicionalmente se hizo un programa en MATLAB, mediante el cual se calculó cuántos de los sueros positivos para cisticercosis, se detectan como positivos si se llevan a cabo diferentes combinaciones entre cada una de las proteínas recombinantes y los péptidos derivados de ellas. De esta manera se identificó la combinación que permite detectar el mayor número de sueros positivos para cisticercosis y el mínimo número de falsos positivos. De la misma manera, se analizó, si haciendo combinaciones entre ambas proteínas recombinantes y sus péptidos, también se podría aumentar el número de sueros positivos para cisticercosis sin aumentar falsos positivos.

8. RESULTADOS.

8.1 Péptidos con el mayor índice de antigenicidad de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

Se identificaron los péptidos con el mayor índice de antigenicidad en cada una de las proteínas de interés, a partir de las gráficas obtenidas por medio de las herramientas bioinformáticas. Dichas gráficas mostraron la variación del índice antigénico en función de la posición de aminoácidos, lo que permitió seleccionar péptidos con 10 a 14 aminoácidos que se encontraban ubicados en los picos más altos por encima del umbral (Figura 4). Para cada proteína se escogieron un total de 5 péptidos y adicionalmente para el péptido más largo de cada proteína, se construyó la versión invertida y en desorden; lo anterior con el fin de observar, si el reconocimiento de los péptidos por parte de los anticuerpos presentes en las muestras de suero depende de la especificidad de la secuencia o de la composición de aminoácidos. Todos los péptidos fueron enviados a sintetizar a “Custom Peptide Synthesis - USV”.

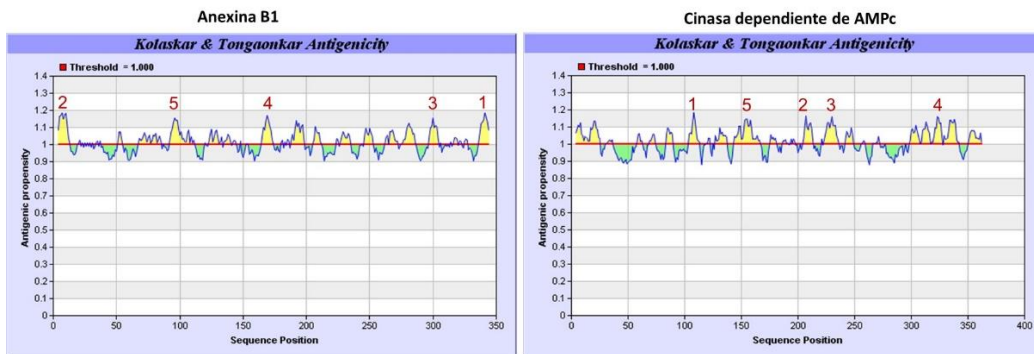


Figura 4. Gráficas de los índices de antigenicidad de los péptidos de la proteína anexina B1 y de la proteína cinasa dependiente de AMPc. En rojo se muestra donde se ubican los 5 péptidos que se construyeron para cada proteína.

Para la proteína cinasa dependiente de AMPc, se enviaron a sintetizar 5 péptidos adicionales a los 5 seleccionados según el índice de antigenicidad. Estos 5 péptidos correspondieron a regiones específicas para *T. solium*, identificadas a partir de un alineamiento de la secuencia de la proteína de *T. solium*, con secuencias de otros parásitos relacionados (Figura 5).

cAMP-dependent protein kinase

```

Tsol1 ---MSKKAVDVPAGLREILQDFTVAVLRNRPNSIINFAAEYFEMKKNQ-----QK-----ENEDAESDEEVMAPIRA
Em      .....T.....E.....I.....
Sm      -MTMTM.DE.V..P...L..EL..SI..EH.D.L.Q..IDFLM...AA-----SENRFNKTN.S.-D.DE.PMPI..Q..
Cs      MNTTSAADKIT..P...L..EL..HL..E..EDLVQASIDFLT...AT-----SDNRTNKA.S.ED.DA.PMPI..R.E
Hs      -----MSHIQI.P..T.L..GY..E...QQ.PDLVE..V...TRLREARAPASVLPAAATPRQSLGHPPPEPGPDRVADAKGDS.SE.DEDLEV.V.S.F

Tsol1 RRRQGVAAESYDPEKED--KFEKVVHEKTEEQRRLTNATKGILLFRCLDEDQMRDVIDAMFERKVEVGEKVIITLGEDGDNFYVIERGVVDIIVKVDGVE
Em      .....Y...D....A.....D.....D.....K.....Y..H.SP.....S.I.....GNE..
Sm      T..A.....D.TSNV...P...R..AQ...D.....D...K.....Y..H.SP.....S.I.....GNE..
Cs      A..AA.....D.GSTAV...P...N...Q...D.....D...Q.....R.KA.....R.KA.....F..I..Q..
Hs      N..VS.C..T.N.DE.EEDTDP.R.I.P..D...C..QE.C.D...KN..QE.LSQ.L.....I.KAD.H..DQ.D.....R.T...L.TK.NQT

Tsol1 KKVGVYDNNQSGELALMYNTPRAATIQAATPGILWAMTREVRSIVLKSFAFKRQMYEELLNQVPLQLSLSAYERMSIADALHTQIYEEGTKIISQGGQE
Em      .....G.....
Sm      .T..K...K.....L.K.E.VV.V.....K..E..RL.....E.....R.K.FKDNQQ..R..DP
Cs      .....K.....ED.VV.....G...K..E..R.....E.....NV...K.R..ND.DQ.LK..DP
Hs      RS.....R.....V..SE.S..GLD.VT..R..IV.NNA...K.F.SFIES..L.K.EVS...K.V.VIGEK..KD.ER..T..EK

Tsol1 GDEMYFVEDGEVRITMK-----KSGSDEETELTRIKKGGYFGELALLTKHPRAASVYAITRTKLAVIDVGSFERLLGPECLDILQRNIDNYENQLKSVFG
Em      .....A..V.....L.....R.....
Sm      ...F..E.K...K.....R..ET..K.VAV.E.....S.....A..DGQ.....R.....D..AK..NI..
Cs      ...F..I.....M.....RV.ES..K.VA..E.....S.....A..VG.....N..R.....G..EK..
Hs      A.SF.II.S...S.LIRSRKSN.D.GNQ.V.IARCH..Q.....V.NK.....A..VGDV.CL.M..QA.....M..MK...SH..E..VKM..

Tsol1 SLDNVPELRH-
Em      .....HX (99.1%)
Sm      ...K...R- (68.1%)
Cs      ..EK...Q- (68.9%)
Hs      .SVDLGN.GQ- (45.2%)

```

Figura 5. Alineamiento de la secuencia de la proteína cinasa dependiente de AMPc de *T. solium*, con las secuencias de otros parásitos relacionados. Los 5 péptidos identificados adicionalmente se muestran en rojo; mientras que los péptidos identificados por índice de antigenicidad se muestran en azul.

En la tabla 3, se muestra todos los péptidos sintéticos de ambas proteínas, que se utilizaron para evaluar su propiedad diagnóstica para la cisticercosis.

Tabla 3. Lista de péptidos sintéticos, identificados para las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

Péptidos Anexina B1	Posición a.a	Péptidos cinasa dependiente de AMPc	Posición a.a
1. (1719) DYEALCLKLIGP	335-346	1. (1726) GILLFRCLD	142-150
		2. (1727) EVFRSIVLKSAF	241-252
2. (1720) AYCRSLVHLYAPN	2-14	3. (1728) LLNQVPILQSL SAY	261-274
		4. (1729) KLAVLDVG SF	364-373
3. (1721) STLQRVLALRAD	295-306	5. (1730) GVDIIVKVDGV	188-199
		6. (1733) MSKKAVDVPA	5-14
4. (1722) YREALLLAGQ	163-174	7. (1734) SNIINFAAEY	32-42
		8. (1735) KSGSDEETEL	324-333
5. (1723) RFALLIQSP	92-101	9. (1736) HTQIYEEGTK	284-293
		10. (1737) AESDEEVMAP	87-96
6. (1724 en desorden) EADYGPLCKLLI		11. (1731 en desorden) NQLLAYVPPSLQSIL	
7. (1725 invertido) PGILKLCLAEYD		12. (1732 invertido) YASLSQLIPVQNLL	

Los números que se encuentran entre paréntesis, corresponden al número de identificación para cada péptido

8.2 Clonación de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

8.2.1 Extracción de ARN de cisticercos de *T. solium*.

La extracción del ARN se llevó a cabo, a partir de 3 cisticercos aislados de cerdos infectados naturalmente, utilizando el método de extracción por trizol. En la figura 6, se puede observar un corrimiento electroforético, donde se aprecian las tres formas predominantes del ARN, lo cual denota su integridad.

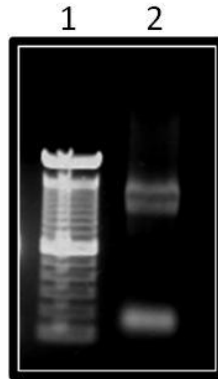


Figura 6. ARN total aislado a partir de cistercos de *T. solium*. Carril 1. Marcador de tamaño molecular. Carril 2. Formas predominantes de ARN

8.2.2 Amplificación de las secuencias codificadoras de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

A partir del ARN total y los pares de oligonucleótidos mencionados en la metodología, se logró obtener la amplificación de las regiones codificantes para cada una de las proteínas de interés por medio de RT-PCR (Figura 7).

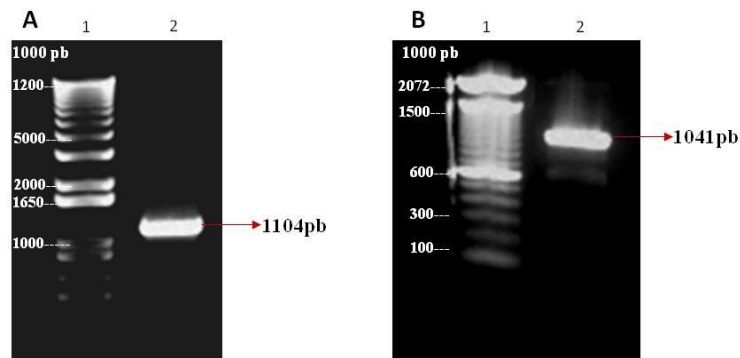


Figura 7. Amplificación por RT-PCR de las regiones codificantes, para las proteínas de interés. A) Cinasa dependiente de AMPc y B) Anexina B1. Carriles 1. Marcador de tamaño molecular (100 pb). Carriles 2. Producto de amplificación.

Los resultados muestran que los productos de amplificación obtenidos, están en el tamaño esperado: 1041pb para la proteína anexina B1 y 1104pb para la proteína cinasa dependiente de AMPc. Adicionalmente los resultados de la secuenciación confirmaron que estos productos de amplificación corresponden a las regiones codificantes para cada proteína de interés (Anexo 1).

8.2.3 Clonación de la proteína cinasa dependiente de AMPc.

Después de haber transformado las bacterias competentes *E. coli* JM109 con el vector pET23a recombinante, se seleccionaron las clonas transformadas y se aisló su DNA recombinante. El DNA, fue sometido a una doble restricción con las enzimas *Bam*HI y *Not*I, para la liberación del inserto correspondiente a la región codificante de la proteína cinasa dependiente de AMPc (Figura 8).

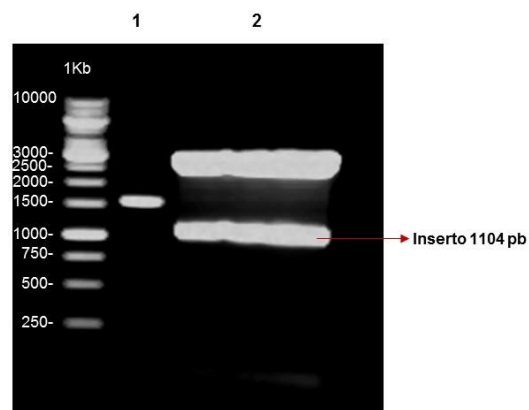


Figura 8. Gel de agarosa al 1%, después de la doble restricción *Bam*HI y *Not*I del vector pET23a, para observar la liberación del inserto correspondiente a la región codificante de la proteína cinasa dependiente de AMPc. Carril 1 (vector sin digerir). Carril 2 (vector e inserto en 1104 pb después de la restricción *Bam*HI y *Not*I).

Adicionalmente, el vector recombinante se envió a secuenciar y los resultados obtenidos confirmaron la integridad, de la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto que codifica para la proteína cinasa dependiente de AMPc (Anexo 2).

8.2.4 Clonación de la proteína anexina B1.

Para la clonación de la región codificante de la proteína anexina B1, se utilizó el kit comercial “In Fusion HD Cloning” (Clontech), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En este caso utilizando los oligonucleótidos mencionados en la metodología y mediante una reacción de PCR, se logró amplificar el fragmento codificante de la proteína anexina B1 (Figura 7). De la misma manera que para la proteína anterior, una vez realizada la reacción de ligación y de obtener los plásmidos recombinantes, se llevó a cabo la transformación de células competentes y posteriormente se aisló y purificó el DNA de las clonas transformadas para luego poder confirmar la correcta clonación del inserto de interés (Figura 9).

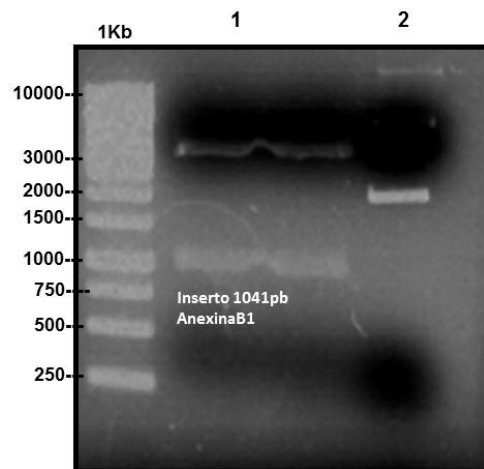


Figura 9. Gel de agarosa al 1%, después de la doble restricción *Bam*HI y *Not*I del vector pET23a, para observar la liberación del inserto correspondiente a la región codificante de la proteína anexina B1. Carril 1 (vector sin digerir). Carril 2 (vector e inserto en 1041 pb después de la restricción *Bam*HI y *Not*I).

El plásmido recombinante se envió a secuenciar y los resultados obtenidos confirmaron la integridad, de la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto que codifica para la proteína anexina B1 (Anexo 3).

8.3 Expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

Durante la inducción de la expresión de las proteínas con IPTG 1mM, se pudo observar que a las 6 horas de inducción la expresión de las proteínas era óptima. Adicionalmente, la expresión se pudo observar no solamente en los cuerpos de inclusión, sino también en las fracciones solubles (Figura 10). Lo anterior ayudo a que la recuperación de las proteínas fuera más práctica a partir de las fracciones solubles.

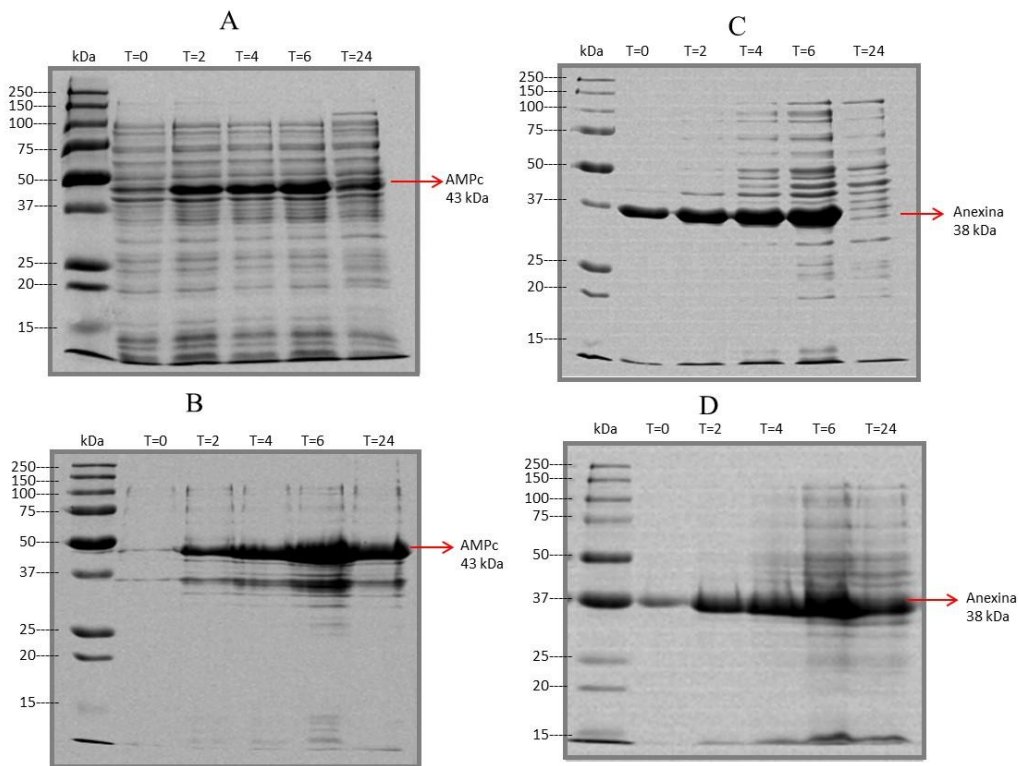


Figura 10. Geles de electroforesis que muestran los resultados de la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, a diferentes tiempos (T). Las imágenes superiores corresponden a las fracciones solubles donde se encontraba la proteína cinasa dependiente de AMPc (A) y la proteína anexina B1 (C). Los paneles B y D corresponden a las fracciones insolubles (cuerpos de inclusión) donde se encontraban las proteínas cinasa dependiente de AMPc (B) y anexina B1 (D).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, se realizó la expresión de las proteínas colectando las fracciones solubles a las 6 horas de inducción de los cultivos bacterianos. Estas fracciones fueron separadas en un gel de electroforesis al 12%, a partir del cual se pudo observar la expresión de las proteínas, además de que se encontraran en el peso molecular esperado (Figura 11).

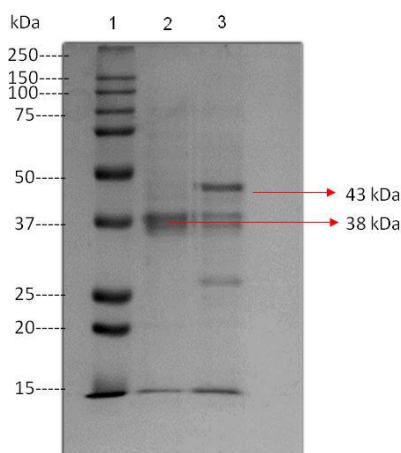


Figura 11. Gel de electroforesis que muestra la expresión de las proteínas recombinantes, a las 6 horas de inducción. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, proteína anexina B1 y Carril 3, proteína cinasa dependiente de AMPc.

8.4 Purificación proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

La purificación de las proteínas recombinantes por medio del sistema de cromatografía líquida automatizado “ÄKTA™FPLC”, permitió obtener diferentes fracciones donde se pudo colectar las proteínas recombinantes. Estas fracciones fueron evaluadas en geles de poliacrilamida, para identificar aquellas en donde las proteínas estuvieran puras (Figura 12).

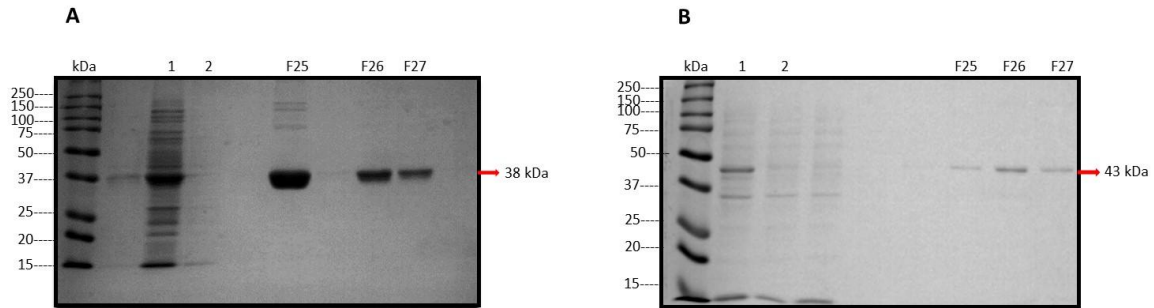


Figura 12. Geles de electroforesis representativos, que muestran la purificación de las proteínas anexina B1 (A) y cinasa dependiente de AMPc (B). Los carriles 1 corresponden a las fracciones solubles (muestra antes de la purificación), los carriles 2 corresponden a las fracciones que no se unieron a la columna y los carriles F25-27, corresponden a las fracciones donde se recuperaron las proteínas recombinantes.

En los geles de electroforesis, se pudo observar que para ambas proteínas en las fracciones 25 a la 26 se logró recuperar las proteínas recombinantes puras. Sin embargo, para el caso de la anexina B1 en la fracción 25, aunque se recuperó la proteína, esta se observa con contaminantes, por lo que fue necesario volver a pasar esta fracción por la columna.

Adicionalmente, debido a que las proteínas recombinantes presentaban un tallo de histidina, el cual ayudo a la purificación de las mismas, se llevó a cabo un Western blot utilizando un anticuerpo anti-histidina, que permitió confirmar que las proteínas recombinantes purificadas correspondían a las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc (Figura 13).

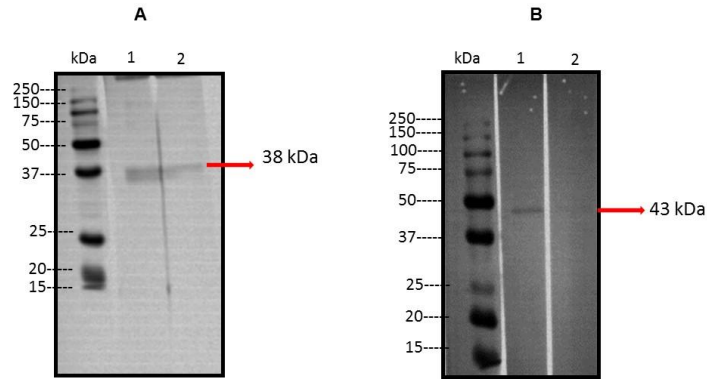


Figura 13. Detección de las proteínas recombinantes anexina B1 (A) y cinasa dependiente de AMPc (B), por Western blot, usando anticuerpo anti- histidina. Los carriles 1, corresponden a la fracción 26 y los carriles 2 a la fracción 27, donde se recuperaron las proteínas recombinantes puras.

8.5 Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes.

8.5.1 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de los péptidos sintéticos utilizando muestras de suero de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis.

Inicialmente se evaluó la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos, mediante ensayos de ELISA, con un panel de muestras de suero de cerdos cisticercosos (n=14) y no cisticercosos (n=7), con la finalidad de observar cuál de los péptidos, presentaban la mejor capacidad para diferenciar entre sueros de cerdos cisticercosos de los no cisticercosos.

Los resultados de los ELISA mostraron que los 7 péptidos de la proteína anexina B1, reconocieron entre el 21% y 71% de las muestras de suero de cerdos cisticercosos, como positivas (VP=verdaderos positivos). Los péptidos que reconocieron el mayor número de VP fueron el 1721, 1723 y 1725 (Figura 14).

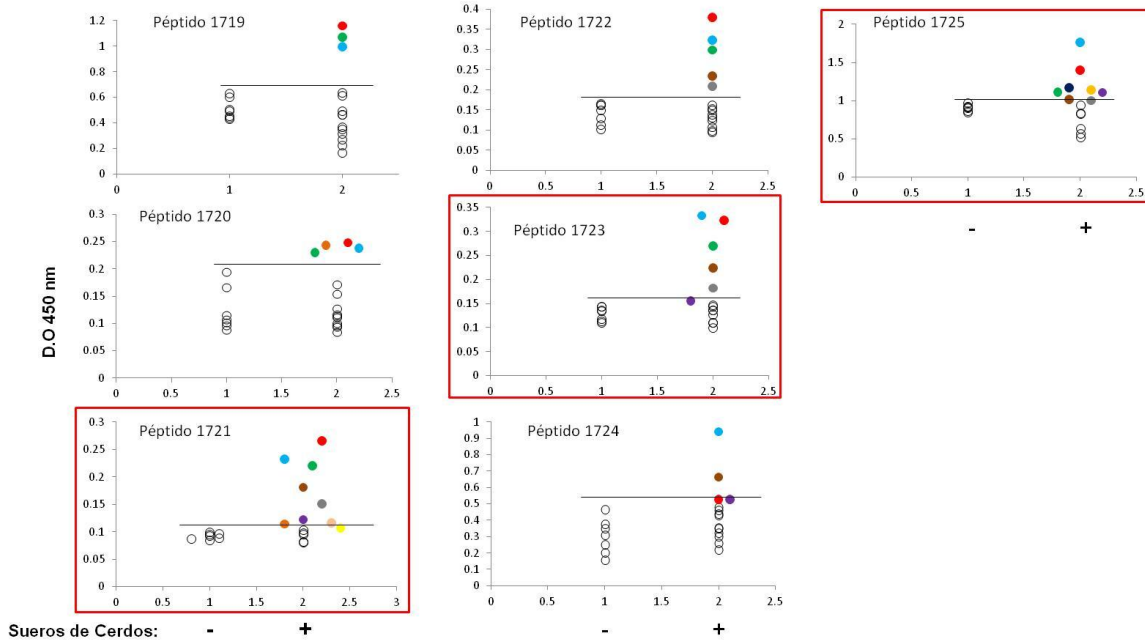


Figura 14. Gráfico de dispersión que muestra los valores de D.O 450nm (eje Y), de los ensayos de ELISA, utilizando los péptidos de la proteína anexina B1 y diferentes paneles de sueros de cerdos cisticercosos (+) y no cisticercosos (-) (eje X). Las barras en negro indican el punto de corte (promedio de valores negativos + dos desviaciones estándar). Los gráficos en cuadros rojos, indican los péptidos que reconocieron un mayor número de VP (círculos en colores).

Para el caso de la proteína cinasa dependiente de AMPc, los resultados de los ELISA mostraron que los 12 péptidos reconocieron entre 29% y 57% de las muestras de suero de cerdos cisticercosos como VP. Los péptidos que reconocieron el mayor número de VP fueron: 1727, 1728, 1731, 1732 y 1735 (Figura 15).

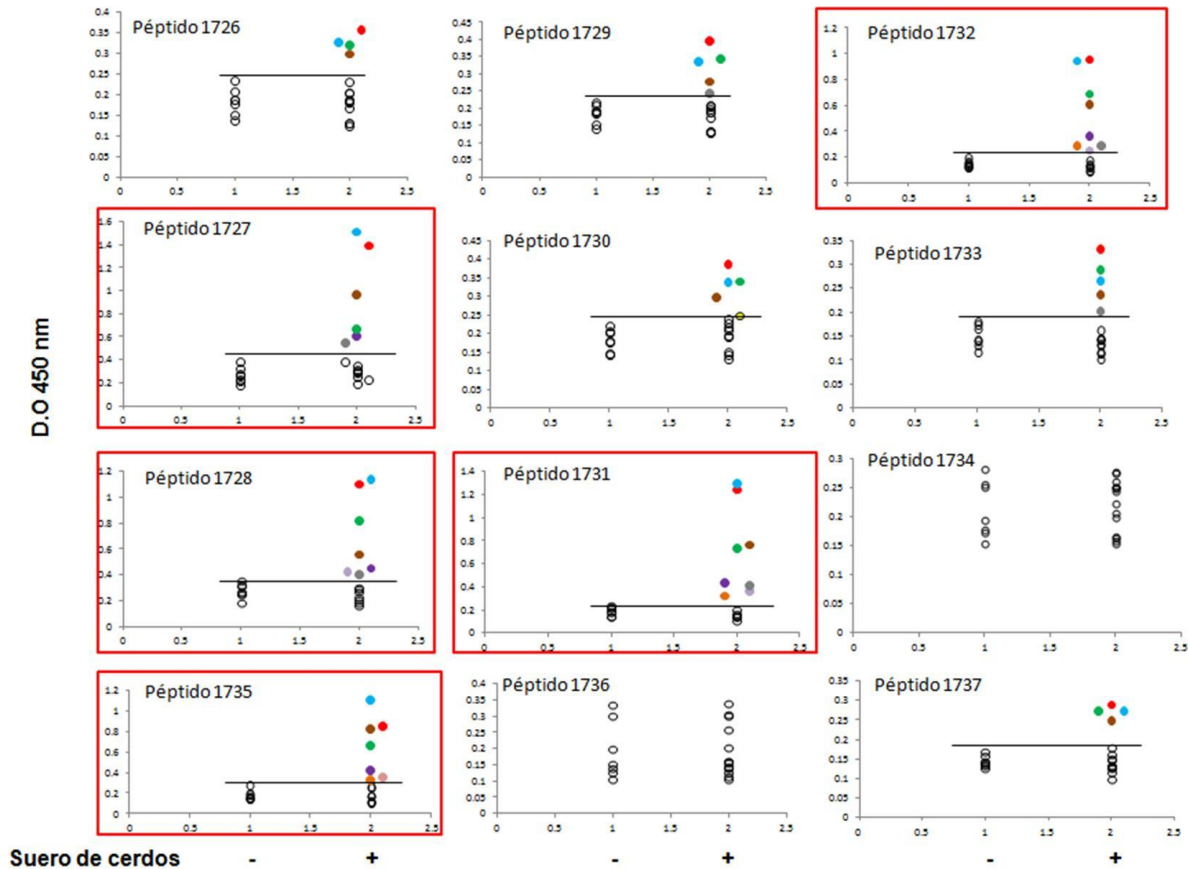


Figura 15. Gráfico de dispersión que muestra los valores de D.O 450nm (eje Y), de los ensayos de ELISA, utilizando los péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc y diferentes paneles de sueros de cerdos cisticercosos (+) y no cisticercosos (-) (eje X). Las barras en negro indican el punto de corte (promedio de valores negativos + dos desviaciones estándar). Los gráficos en cuadros rojos, indican los péptidos que reconocieron el mayor número de VP (círculos en colores).

Adicionalmente se pudo observar que los péptidos sintéticos de ambas proteínas, fueron capaces de diferenciar el 100% de las muestras de suero de cerdos no cisticercosos (VN= verdaderos negativos) (Figuras 14 y 15).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió evaluar los péptidos que reconocieron el mayor número de VP, con un mayor número de muestras: 43 muestras de suero de cerdos cisticercosos, 44 muestras de cerdos no

cisticercosos y 6 muestras de sueros de cerdos con otras parasitosis (*Cysticercus tenuicollis*, *Sarcocystis* sp y quiste hidatídico).

En el caso de los 3 péptidos de la proteína anexina B1, se observó que entre el 14% y 37% de las muestras de suero de cerdos cisticercosos fueron reconocidas como VP. El péptido que reconoció el mayor número de VP fue el 1721, reconociendo 16 de las 43 muestras de suero de cerdos cisticercosos. Para el caso de los 5 péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc, entre el 21% y 37% de las 43 muestras de suero de cerdos cisticercosos fueron reconocidas como VP. El péptido 1731 fue el que reconoció el mayor número de VP (16/43) (Anexo 4).

Para el caso de las muestras de suero de cerdos no cisticercosos, se pudo observar que los péptidos de ambas proteínas, permitieron discriminar más del 90% de las muestras de suero de cerdos no cisticercosos (Anexo 4). Para el caso de los péptidos de la proteína anexina B1, se observó que entre un 93% a un 98% de las muestras de suero de cerdos no cisticercosos fueron diagnosticados como VN; mientras que para el caso de los péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc, entre un 94% a un 100% de las muestras fueron diagnosticadas como VN (Tabla 4).

En cuanto a las muestras de suero de cerdos infectados con otras parasitosis, las muestras que se utilizaron para evaluar los péptidos fueron un total de 6, de las cuales 2 muestras eran de cerdos infectados con *Cysticercus tenuicollis*, 2 muestras de cerdos infectados con *Sarcocystis* sp y 2 muestras eran de cerdos infectados con la forma larval de *Echinococcus* (quiste hidatídico). Los resultados mostraron que los péptidos de ambas proteínas presentaron reacciones cruzadas principalmente con las muestras de suero de cerdos infectados con quiste hidatídico y con *Cysticercus tenuicollis* (Anexo 4).

8.5.2 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de las proteínas recombinantes utilizando muestras de suero de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis.

Las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, fueron evaluadas con el mismo panel de sueros de cerdos, con los que se evaluaron los péptidos sintéticos.

Los resultados permitieron observar que para el caso de la proteína recombinante anexina B1, el 37% de las 43 muestras de suero de cerdos cisticercosos, fueron reconocidas como VP y para el caso de la proteína recombinante cinasa dependiente de AMPc, 26% de las muestras de cerdos cisticercosos fueron reconocidas como VP (Anexo 4).

En cuanto a las muestras de suero de cerdos no cisticercosos, el 97.7% de las muestras fueron diagnosticadas como VN, en el caso de la proteína recombinante anexina B1 y el 95.4% en el caso de la proteína recombinante cinasa dependiente de AMPc (Tabla 4).

Al utilizar las muestras de suero de cerdos infectados con otras parasitosis, se observó que con la proteína recombinante anexina B1, 2 muestras presentaron reacción cruzada. Las muestras eran de cerdos infectados con *Sarcocystis* sp y *Cysticercus tenuicollis*. Para el caso de la proteína recombinante cinasa dependiente de AMPc, 1 muestra presento reacción cruzada y fue de un cerdo infectado con *Cysticercus tenuicollis* (Anexo 4).

8.5.3 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de los péptidos sintéticos utilizando muestras de suero de humanos positivos para NC, negativos para NC y con otras alteraciones neurológicas.

Inicialmente se evaluó la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos mediante ensayos de ELISA, con un panel de muestras de suero de humanos positivos (4 pools cada uno con una n=6) y negativos (n=4), para NC.

Los resultados mostraron que los péptidos de ambas proteínas, fueron capaces de diferenciar el 100% de las muestras positivas para NC del 100% de las muestras negativas para NC (Figura 16).

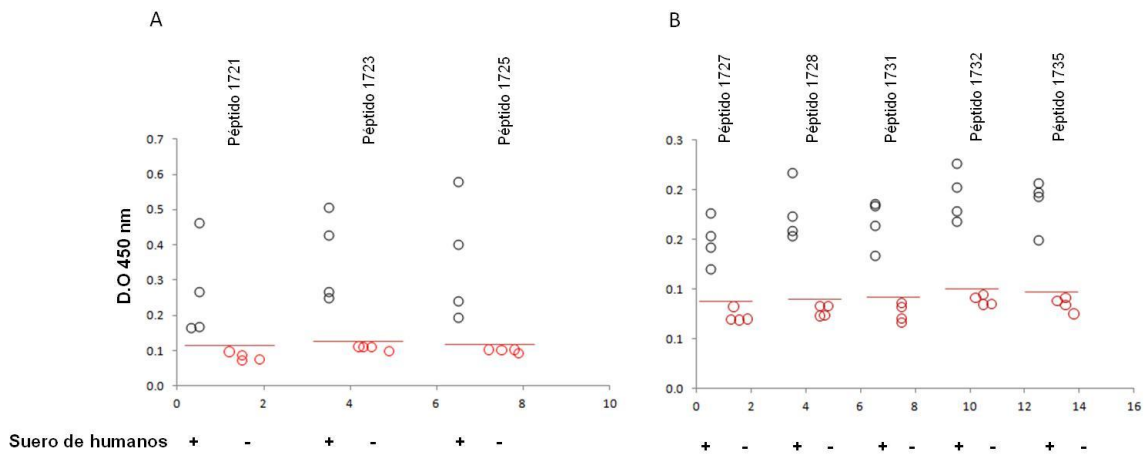


Figura 16. Gráfico de dispersión que muestra los valores de D.O 450nm (eje Y), de los ensayos de ELISA, utilizando los péptidos de la proteína anexina B1 (Figura A) y cinasa dependiente de AMPc (Figura B) y pools de sueros de humanos positivos para NC (+) y sueros negativos par NC (-) (eje X). Las barras en rojo indican el punto de corte (promedio de valores negativos + dos desviaciones estándar).

Teniendo en cuenta lo anterior, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad diagnóstica de los péptidos sintéticos con un mayor número de muestras de suero de humanos positivos para NC (n=26), de sueros de humanos negativos para NC (n=16) y de suero de humanos con alteraciones neurológicas (n=9).

Los resultados mostraron para el caso de los péptidos de la proteína anexina B1, que entre el 42% y 62% de las muestras de suero de humanos positivos para NC, fueron reconocidas como VP. El péptido 1721 fue el que reconoció el mayor número de muestras de suero de humanos con NC (16/26). En el caso de los péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc, entre el 35% y 50% de las muestras positivas para NC, fueron reconocidas como VP. El péptido 1732 fue el que reconoció un mayor número de muestras de suero de humanos con NC (13/26).

Por otro lado, se pudo observar que todos los péptidos, a excepción del péptido 1725 de la proteína anexina B1, fueron capaces de diagnosticar como VN el 100% de las muestras de suero de humanos negativos para NC. Los resultados también mostraron, que entre el 11% y 44% de las muestras de suero de humanos con otras alteraciones neurológicas, presentaron reacciones cruzadas con los péptidos sintéticos (Anexo 5).

8.5.4 Evaluación de la capacidad diagnóstica, de las proteínas recombinantes utilizando muestras de suero de humanos positivos para NC, negativos para NC y con otros desordenes neurológicos.

Para las proteínas recombinantes, también se llevó a cabo una primera evaluación con el pool de muestras de suero de humanos positivos para NC (4 pools cada uno con una n=6) y muestras negativas para NC (n=4). Los resultados mostraron que de igual forma que los péptidos sintéticos, las proteínas recombinantes también fueron capaces de diferenciar el 100% de las muestras positivas para NC del 100% de las muestras negativas para NC (Figura 17).

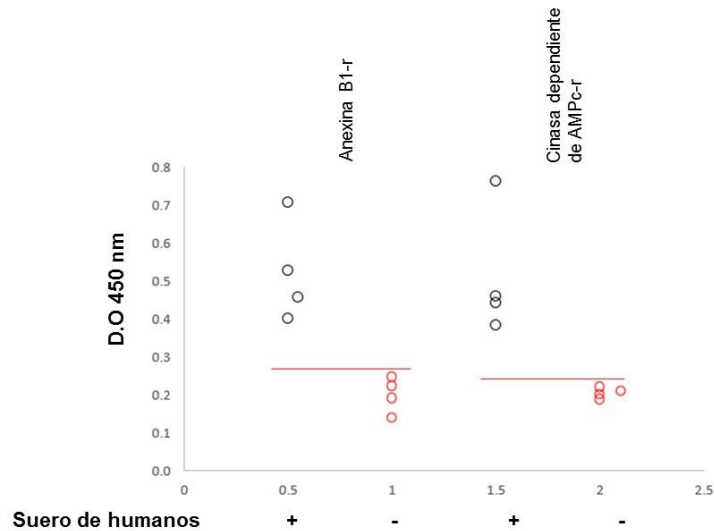


Figura 17. Gráfico de dispersión que muestra los valores de D.O 450nm (eje Y), de los ensayos de ELISA, utilizando las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc y el panel inicial de muestras de sueros de humanos positivos para NC (+) y sueros negativos para NC (-) (eje X). Las barras en rojo indican el punto de corte (promedio de valores negativos + dos desviaciones estándar).

Posteriormente se evaluaron ambas proteínas recombinantes, utilizando las mismas muestras de suero con las que se evaluaron los péptidos sintéticos. Los resultados mostraron que la proteína anexina B1, reconoció un 58% de muestras VP (15/26); mientras que la proteína cinasa dependiente de AMPc reconoció un 35% de muestras VP (9/26).

En cuanto a la capacidad de las proteínas recombinantes para diagnosticar las muestras de suero de humanos negativos para NC, se observó que la anexina B1 reconoció el 94% de las muestras como VN, mientras que la cinasa dependiente de AMPc reconoció el 100% de las muestras como VN (Anexo 5).

A partir de los resultados obtenidos de la evaluación de los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes, utilizando las muestras de suero tanto de humanos como de cerdos positivos y negativos para cisticercosis, se pudo observar que al

evaluar las proteínas recombinantes, la proteína anexina B1 mostró un mejor reconocimiento de verdaderos positivos tanto en las muestras de suero de cerdos cisticercosos, como en las de humanos positivos para NC. Por otro lado la proteína cinasa dependiente de AMPc presentó un mejor reconocimiento de VN especialmente en las muestras de suero de humanos negativos para NC.

En cuanto a los péptidos sintéticos se observó que los de la proteína anexina B1, presentaron un mayor reconocimiento de VP con las muestras de suero de humanos positivos para NC, mientras que los péptidos de la cinasa dependiente de AMPc, mostraron un mejor reconocimiento de VN con las muestras de suero de humanos positivos para NC (Tabla 4).

Tabla 4. Reconocimiento de las muestras de suero de cerdos y humanos positivos (VP) y negativos (VN) para cisticercosis, por los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

Antígenos para diagnóstico de cisticercosis porcina en muestras de suero			Antígenos para diagnóstico de neurocisticercosis en muestras de suero		
Péptidos anexina B1	% VP (n=43)	% VN (n=44)	Péptidos anexina B1	% VP (n=26)	% VN (n=16)
1721	37.2 (16)	93.2 (41)	1721	61.5 (16)	100 (16)
1723	32.5 (14)	97.7 (43)	1723	54.0 (14)	100 (16)
1725	14.0 (6)	93.2 (41)	1725	42.3 (11)	93.8 (15)
Péptidos cinasa dep. AMPc			Péptidos cinasa dep. AMPc		
1727	25.5 (11)	93.2 (41)	1727	23.0 (9)	100 (16)
1728	21.0 (9)	95.4 (42)	1728	38.5 (10)	100 (16)
1731	37.2 (16)	93.2 (41)	1731	23.0 (9)	100 (16)
1732	32.5 (14)	93.2 (41)	1732	50.0 (13)	100 (16)
1735	32.5 (14)	95.4 (42)	1735	46.2 (12)	100 (16)
Proteínas recombinantes			Proteínas recombinantes		
Anexina B1	37.2 (16)	97.7 (43)	Anexina B1	57.7 (15)	93.8 (15)
Cinasa dependiente de AMPc	25.5 (11)	95.4 (42)	Cinasa dependiente de AMPc	23.0 (9)	100 (16)

Por otro lado con el fin de aumentar el reconocimiento de VP, por parte de los péptidos sintéticos como de las proteínas recombinantes, se identificó si realizando combinaciones entre los péptidos y las proteínas recombinantes, el

reconocimiento podría aumentar. Para esto, se construyó un programa estadístico que arrojó todas las posibles combinaciones, que se pueden hacer entre la proteína recombinante y sus respectivos péptidos sintéticos, para identificar aquellas en donde se aumenta el reconocimiento de VP sin afectar la capacidad de discriminar a los VN. Con el análisis estadístico se obtuvieron gráficos de frecuencias donde se observa las muestras de suero de humanos y cerdos negativas y positivas para cisticercosis, que pueden ser reconocidas con diferentes combinaciones entre las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc y sus respectivos péptidos sintéticos (Figuras 18 y 19).

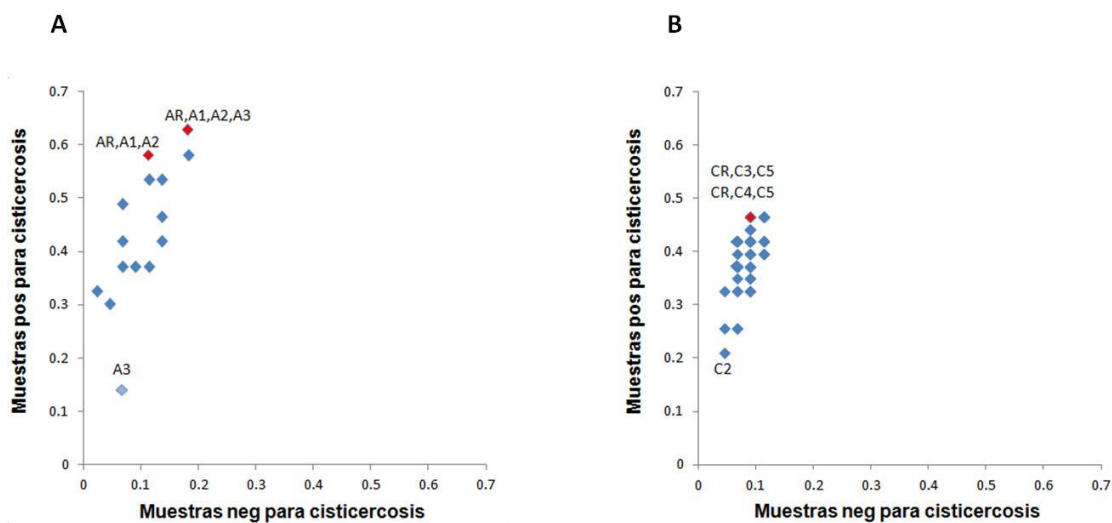


Figura 18. Gráfico que muestra la frecuencia de reacción de la combinación de la proteína recombinante anexina B1 con sus péptidos sintéticos (A) y de la proteína cinasa dependiente de AMPc con sus péptidos sintéticos (B), con el conjunto de muestras de sueros de cerdos positivos para cisticercosis (eje Y) y sueros de cerdos no cisticercosos (eje X). Los puntos en rojo, indican las combinaciones entre proteína recombinante y péptidos que presentan un mejor reconocimiento de muestras positivas. AR, corresponde a la proteína recombinante anexina B1 y AC a la proteína cinasa dependiente de AMPc. Los péptidos A1-A3 corresponden a los péptidos de la proteína anexina B1 y los péptidos C1-C5 a la proteína cinasa dependiente de AMPc.

En el caso de la proteína anexina B1 y sus respectivos péptidos, los resultados muestran 2 combinaciones de antígenos que mejoran el reconocimiento de verdaderos positivos (AR+A1+A2+A3 y AR+A1+A2). La primera de ellas, es la combinación entre la proteína recombinante (AR) con todos los péptidos sintéticos: 1721 (A1), 1723 (A2) y 1725 (A3). El uso de esta combinación aumenta el reconocimiento de verdaderos positivos de un 37% a un 63%. Sin embargo con esta combinación, aumenta el número de falsos positivos (18.2%). Por otro lado, la segunda combinación que incluye la proteína recombinante y los péptidos A1 y A2, reconocen un 58% de verdaderos positivos y un 11.4% de falsos negativos (Figura 18-A). Para el caso de la proteína cinasa dependiente de AMPc, también se observó 2 posibles combinaciones que aumentan el reconocimiento de verdaderos positivos: proteína recombinante + péptido 1731 + péptido 1735 y proteína recombinante + péptido 1732 + péptido 1735 (CR+C3+C5 y CR+C4+C5 respectivamente). En este caso ambas combinaciones aumentan de la misma manera, el reconocimiento de verdaderos positivos de 37% a 47% y el número de falsos positivos es del 9% (Figura 18-B).

El análisis estadístico de los datos obtenidos con las muestras de suero de humanos positivos y negativos para NC, arrojó 2 posibles combinaciones entre las proteínas recombinantes y los péptidos, mostrando igualmente que aumentaron el reconocimiento de verdaderos positivos (Figura 19).

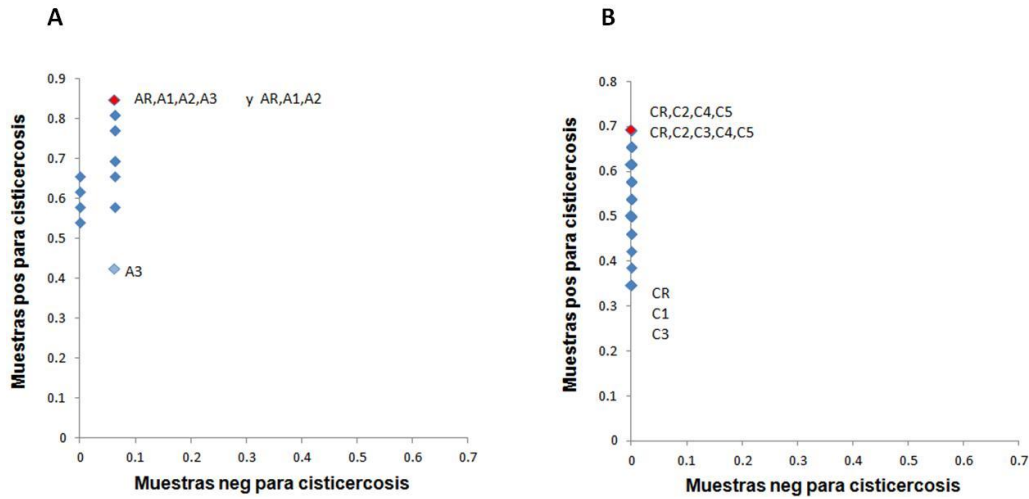


Figura 19. Gráfico que muestra la frecuencia de reacción de la mezcla de la proteína recombinante anexina B1 con sus péptidos sintéticos (A) y de la proteína cinasa dependiente de AMPc con sus péptidos sintéticos (B), con el conjunto de muestras de sueros de humanos positivos para NC (eje Y) y sueros de humanos negativos para NC (eje X). Los puntos en rojo, indican las combinaciones entre proteína recombinante y péptidos que presentan un mejor reconocimiento de muestras positivas. AR, corresponde a la proteína recombinante anexina B1 y AC a la proteína cinasa dependiente de AMPc. Los péptidos A1-A3 corresponden a los péptidos de la proteína anexina B1 y los péptidos C1-C5 a la proteína cinasa dependiente de AMPc.

Las gráficas muestran que para el caso de la proteína anexina B1, las dos combinaciones fueron las mismas que se mencionaron anteriormente (AR+A1+A2+A3 y AR+A1+A2) y en este caso ambas aumentaron el reconocimiento de verdaderos positivos de 62% a 85%, presentando un reconocimiento de un 6.3% de falsos positivos (Figura 19-A). En el caso de la proteína cinasa dependiente de AMPc, las dos mejores combinaciones fueron: CR+C2+C4+C5 y CR+C2+C3+C4+C5. Ambas combinaciones aumentaron el reconocimiento de verdaderos positivos de 50% a 69% y a diferencia de las combinaciones anteriores estas no presentaron reconocimiento de falsos positivos (Figura 19-B).

La tabla 5, muestra los resultados de la combinación de antígenos y su reconocimiento por parte de las muestras de suero de cerdos y humanos positivos para cisticercosis.

Tabla 5. Reconocimiento de las muestras de suero de cerdos y humanos positivos (VP) y negativos (VN) para cisticercosis, por las diferentes combinaciones entre péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de las proteínas anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc.

Mezcla de antígenos para diagnóstico de cisticercosis porcina			Mezcla de antígenos para diagnóstico de neurocisticercosis		
Anexina B1	% VP (n=43)	% VN (n=44)	Anexina B1	% VP (n=26)	% VN (n=16)
AR+A1+A2+A3	62.8 (27)	81.8 (36)	AR+A1+A2+A3	84.6 (22)	93.8 (15)
AR+A1+A2	58.1 (25)	88.6 (39)	AR+A1+A2	84.6 (22)	93.8 (15)
Cinasa dependiente de AMPc			Cinasa dependiente de AMPc		
CR+C3+C5	46.5 (20)	90.9 (40)	CR+C2+C3+C4+C5	69.2 (18)	100 (16)
CR+C4+C5	46.5 (20)	90.9 (40)	CR+C2+C4+C5	69.2 (18)	100 (16)

Finalmente, no se observó que haciendo las combinaciones entre los péptidos de la proteína anexina B1 con los péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc o la combinación entre las dos proteínas recombinantes, se obtuviera un reconocimiento de VP mayor que el observado con las combinaciones nombradas anteriormente.

9. DISCUSIÓN.

La cisticercosis causada por el estadio larvario de *T. solium*, es una parasitosis que afecta al cerdo y al humano. En el humano, el cisticerco puede alojarse en el SNC produciendo la NC. En el cerdo la cisticercosis se diagnostica por la presencia de cisticercos en la lengua lo cual se realiza durante procedimientos de inspección experimental, o bien durante el propio sacrificio de los cerdos. En el caso del hombre, el diagnóstico de NC se realiza en base a métodos imagenológicos apoyados por los hallazgos clínicos. Ya sea el procedimiento realizado en el cerdo o en el hombre, claramente resalta, la complejidad y/o el costo de los mismos, además de que no son útiles para estudios epidemiológicos. Una herramienta muy útil para diagnosticar una infección es la huella inmunológica que deja la presencia o el contacto con el agente infeccioso, que puede ser la memoria inmunológica celular o bien la presencia de anticuerpos. La búsqueda de anticuerpos específicos ha sido de gran utilidad para el diagnóstico de algunos agentes infecciosos (47,48). En el caso de la cisticercosis, la infección sí induce la presencia de anticuerpos, sin embargo debido a diversos factores, (i.e. reacciones cruzadas con otros parásitos, la presencia de pocos parásitos, el estado fisiológico del parásito etc.) la sensibilidad de los métodos diagnósticos basados en la presencia de anticuerpos es baja. Por lo que, resulta de gran importancia evaluar posibles blancos antigénicos que puedan hacer el inmunodiagnóstico una herramienta altamente específica y sensible.

En el presente trabajo, se evaluó la capacidad diagnóstica de los antígenos recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc del cisticerco de *T. solium*. Como se reportó por nuestro grupo de trabajo, en estos antígenos se identificaron secuencias de aminoácidos, específicas que no se comparten con las de otros parásitos relacionados. Razón por la cual, fueron propuestos como candidatos útiles para el diagnóstico de la cisticercosis (38).

Muchas pruebas de inmunodiagnóstico utilizan como fuentes antigénicas, extractos de proteínas del parásito o fracciones específicas altamente purificadas. El uso de estas fuentes antigénicas depende de la disponibilidad constante del material parasitario y de los métodos de preparación de los extractos antigénicos, haciendo que las pruebas de inmunodiagnóstico tengan una menor reproducibilidad y sean más complejas de llevar a cabo a nivel de campo. Por esta razón, el uso de la tecnología del ADN recombinante y la identificación de péptidos con capacidad antigénica, han sido herramientas utilizadas para optimizar la especificidad, la sensibilidad y la reproducibilidad en las pruebas de inmunodiagnóstico (49-54). Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se utilizaron péptidos sintéticos que correspondieron a secuencias de cada una de las proteínas de interés, que presentaban un alto índice de antigenicidad. Adicionalmente, las regiones codificantes para cada una de las proteínas de interés, fueron clonadas y expresadas en un sistema bacteriano y posteriormente cada proteína fue purificada.

Tanto los péptidos sintéticos como las proteínas recombinantes, se evaluaron en su capacidad diagnóstica para cisticercosis humana y porcina mediante ensayos de ELISA. Los resultados obtenidos, mostraron que existe un reconocimiento tanto de los epítomos lineales representados en los péptidos, como de los conformacionales representados en las proteínas recombinantes, como se observó en la tabla 4 y anexos 4 y 5.

La mayoría de las muestras de suero de humanos y cerdos positivos para cisticercosis, que fueron reconocidas como VP, fueron las mismas tanto para los péptidos como para las proteínas recombinantes. Adicionalmente también se observó un grupo de muestras positivas para cisticercosis, que no presentaron reconocimiento por ninguno de los antígenos evaluados (FN=Falsos negativos). Lo anterior refleja, que existe una heterogeneidad en la respuesta de anticuerpos presente en cada una de las muestras de suero de cerdos y humanos positivos para cisticercosis, utilizadas en este trabajo. En el caso de las muestras de suero de cerdos cisticercosos, esta heterogeneidad puede correlacionarse con los

hallazgos reportados por Ostoa y colaboradores (55), quienes reportaron que la variación inmunológica en la cisticercosis porcina, puede deberse en parte a que existe una relación inmunológica propia, entre el hospedero y el parásito. Al respecto, cada parásito encuentra diferentes condiciones para sobrevivir en el hospedero como por ejemplo: grado de malnutrición, estado inmunológico, infecciones pasadas, nivel de estrés, entre otros. Por consiguiente los autores sugieren que en ese proceso de adaptación del cisticerco en el hospedero, este puede expresar diferencialmente un número importante de antígenos, para los cuales su hospedero produce ciertos anticuerpos, que no necesariamente van a reconocer los antígenos expresados en otro hospedero diferente; lo que pudiera explicar que los anticuerpos presentes en las muestras de suero de cerdos cisticercosos, reconozcan algunos antígenos y otros no. Así mismo, la respuesta de anticuerpos detectada en un momento dado, puede depender de muchas variables, entre las que se destacan: El número de cisticercos que estén infectando al hospedero, al estado fisiológico de los cisticercos, la memoria inmunológica que genere la infección y la vida media de los propios anticuerpos (19, 56). Teniendo en cuenta lo anterior, se analizó la base de datos de las muestras de suero de cerdos cisticercosos utilizadas en este trabajo. Esto, con el fin de identificar si podía existir una relación entre el número de parásitos o el estado fisiológico de los mismos, con el reconocimiento de los antígenos. Lo que se pudo observar, para el caso de las muestras que presentaban la información, fue que el reconocimiento de los antígenos por parte de los anticuerpos presentes en las muestras de suero, no se encontraba relacionado al número de parásitos. Sin embargo, debido a la falta de información para algunas de las muestras, no se pudo identificar si tal vez el reconocimiento de los antígenos esta mas relacionado con el estado fisiológico del parásito. Adicionalmente es importante tener en cuenta que la carga más ligera de parásitos que se observó en una de las muestras de suero de cerdos cisticercosos, fue de 3 cisticercos, las demás presentaban un número de parásitos desde 22 hasta 800, razón por la cual probablemente no se observó una relación directa entre el reconocimiento de los antígenos y el número de parásitos, ya que, como se reportó en un estudio previo

(30), en cerdos con una carga ligera de cisticercos (entre 1 a 5), las técnicas de inmunodiagnóstico carecen de sensibilidad y especificidad.

Por otro lado, también se observó una variabilidad inmunológica en las muestras de suero de humanos infectados con NC, la cual puede deberse a la propia heterogeneidad de la enfermedad. Se ha reportado por ejemplo, que el reconocimiento de algunos antígenos por parte de los anticuerpos presentes en muestras de suero, de pacientes que presentan un solo cisticerco en el SNC o en pacientes con NC inactiva (múltiples calcificaciones), es muy reducido (20, 49, 55). Lo anterior es debido a que la estimulación antigénica puede ser más baja en este tipo de muestras de suero, lo que resulta en una respuesta de anticuerpos limitada (55). Además, del estado de desarrollo en el que se encuentra el cisticerco y del número de parásitos en el SNC, la intensidad de la respuesta inmune del hospedero también es una característica, que como se mencionó, para el caso de los cerdos cisticercosos, puede conllevar a una expresión diferencial de muchos antígenos (55). Al analizar la base de datos de las muestras de suero de humanos positivos para cisticercosis, a pesar de la carencia de algunos datos, se pudo observar que la mayoría de las muestras de suero de pacientes con 1 a 2 calcificaciones en el SNC, no presentaron anticuerpos que reconocieran a los antígenos, a diferencia de algunas muestras que aunque eran de pacientes que presentaban calcificaciones, también presentaban entre 1 a 2 cisticercos en forma vesicular o coloidal y si presentaron reconocimiento de los antígenos. Lo anterior concuerda con lo reportado acerca del bajo reconocimiento de algunos antígenos por parte de los anticuerpos presentes en muestras de suero, de pacientes que presentan un solo cisticerco en el SNC o en pacientes con NC inactiva (20, 49, 55). Adicionalmente, es importante tener en cuenta que los antígenos evaluados en este trabajo, son antígenos de secreción/excreción del cisticerco, por lo que presentan una asociación con el estado viable del parásito, y probablemente por esta razón, los anticuerpos presentes en muestras de suero de pacientes con calcificaciones que se asocian con la muerte del parásito, no reconocen dichos antígenos. También en el caso de humanos con cisticercos calcificados, se

desconoce desde hace cuánto tiempo la persona se infectó y en qué momento el parásito se desarrolló hacia una forma calcificada, de manera que la presencia de anticuerpos, pudo haber desaparecido en el tiempo.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, resulta difícil pensar que un péptido que representa un solo epítipo, pueda ser reconocido por todos o la mayoría de los anticuerpos presentes, en un panel extenso de muestras de suero de cerdos o humanos positivos para cisticercosis. Por esta razón, en el presente trabajo se realizó un análisis estadístico de todas las posibles combinaciones entre los péptidos sintéticos y las proteínas recombinantes de los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, para identificar todas las posibles combinaciones que permitirían un mayor reconocimiento de VP. Lo anterior permitió observar, que al combinar las proteínas recombinantes con los péptidos sintéticos que fueron mayormente reconocidos por las muestras de suero positivas, se logra aumentar el reconocimiento de VP a un 69-85% en el caso de las muestras de suero de humanos con NC y a un 47-63% en el caso de las muestras de suero de cerdos cisticercosos. Los porcentajes más altos se obtuvieron con la proteína anexina B1 y sus péptidos (Tabla 4 y Figuras 24 y 25). Estos resultados sugieren, que hay anticuerpos en las muestras de suero que son capaces de reconocer a los epítipos conformacionales, de las proteínas recombinantes y no a los epítipos lineales en los péptidos sintéticos o viceversa. En estudios previos, también fue posible observar que la mezcla de antígenos es una estrategia útil para aumentar el reconocimiento de VP, disminuyendo la variabilidad inmunológica presente en los paneles de muestras de suero de cerdos o humanos infectados con cisticercosis (49, 55, 57).

Por otra parte, al evaluar las proteínas recombinantes se observó que con la proteína anexina B1, hubo un mejor reconocimiento de VP con las muestras de suero de cerdos y humanos cisticercosos, mientras que con la proteína cinasa dependiente de AMPc y sus péptidos, se observó una mejor discriminación de las muestras negativas para cisticercosis. Adicionalmente, se observaron muestras positivas para cisticercosis, que reconocieron únicamente a las proteínas

recombinantes y no a los péptidos sintéticos, indicando que probablemente esos anticuerpos presentes en dichas muestras de suero, reconocen solo epítomos conformacionales.

Debido a que las proteínas recombinantes, al ser expresadas en un sistema bacteriano, no presentan modificaciones pos-traduccionales que pudieran ser necesarias para el reconocimiento por los anticuerpos, es posible que este también sea un factor que se relacione con la disminución del reconocimiento de VP. Debido a que existen previos estudios, en donde se ha llevado a cabo la evaluación de antígenos recombinantes, expresados en un sistema de baculovirus y obteniendo buenos resultados de sensibilidad (49, 58), sería interesante evaluar a los antígenos recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, expresados un sistema de expresión en eucariontes, donde las proteínas pueden presentar modificaciones pos-traduccionales.

Por otra parte, en nuestro estudio se observó que, tanto los péptidos sintéticos como las proteínas recombinantes, diferencian de manera eficaz, las muestras negativas para cisticercosis. Sin embargo para el caso de la proteína anexina B1, se observó que cuando se hacen las combinaciones de los péptidos sintéticos con la proteína recombinante, aumenta el número de falsos positivos indicando que algunas veces al tratar de aumentar el reconocimiento de VP, se puede correr el riesgo de disminuir la capacidad para discriminar las muestras negativas (Tabla 5).

Adicionalmente, en el presente trabajo se utilizaron 6 muestras de suero de cerdos infectados con otras parasitosis, a partir de las cuales, se observaron reacciones cruzadas con las muestras de suero de cerdos infectados con las formas larvales de *Taenia hydatigena* (*Cysticercus tenuicollis*) y *Echinococcus* (quiste hidatídico). Estas reacciones cruzadas son comunes; ya que todos son parásitos helmintos relacionados filogenéticamente, por lo que pueden tener componentes antigénicos en común (59). Así mismo, en estudios previos donde evalúan antígenos de *T. solium* o *T. saginata* para el inmunodiagnóstico, se reportan reacciones cruzadas entre *T. solium* y *Echinococcus* (60-63). Además de lo anterior, también es importante tener en cuenta que los cerdos infectados con otras parasitosis,

podieron haber estado en contacto con el cisticerco de *T. solium* y haber resuelto la infección o bien esta nunca se estableció y por esta razón aquellos anticuerpos presentes en estas muestras de suero, reconocen antígenos del cisticerco de *T. solium*, como también los péptidos y proteínas recombinantes utilizados. Aunado a lo anterior, el número de muestras de suero de cerdos con otras parasitosis, utilizadas en este estudio fue muy pequeño, razón por la cual será necesario evaluar los péptidos y proteínas recombinantes, con un número mayor de muestras de cerdos infectados con otras parasitosis y de esta forma conocer la especificidad.

Por otra parte, en el presente trabajo también se utilizaron 8 muestras de suero, de pacientes que presentaban alteraciones neurológicas en fase de estudio como: papiledema causado por hipertensión intracraneal (HITC), cefalea e hidrocefalia. Estas muestras fueron incluidas en el estudio como controles negativos para NC y adicionalmente porque provienen de pacientes, que presentan síntomas que se comparten con la NC. Los resultados mostraron que aunque las muestras provienen de pacientes negativos para NC, interesantemente estas presentaron anticuerpos que reaccionaron de manera cruzada, con los epítomos presentes en los péptidos y proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc. Lo anterior puede deberse probablemente a un mecanismo conocido como dispersión de epítomos (del inglés “epitope spreading”). Este es un fenómeno en el que el sistema inmunológico amplía su respuesta más allá de los epítomos inmunodominantes, reconocidos por primera vez por las células T y B; es decir, una respuesta inmune típica contra una proteína propia del organismo o extraña a este, que es usualmente dirigida hacia uno o dos epítomos de la proteína, llamados epítomos dominantes. Cuando ocurre el epitope spreading la respuesta inmune va dirigida a otro epítomo diferente al inicial (epítomo subdominante), en la proteína (64, 65). Este fenómeno se presenta mucho en las enfermedades autoinmunes (66-68), donde se ha observado que la especificidad de la respuesta inmune se extiende, para incluir auto-epítomos distintos a los que iniciaron el proceso inflamatorio, conduciendo a un daño tisular a partir del cual epítomos alterados o

secuestrados pueden llegar a ser procesados y presentados (69). Teniendo en cuenta lo anterior, las 8 muestras de suero posiblemente provienen de pacientes que presentan condiciones neurológicas como resultado de procesos inflamatorios o autoinmunes; por lo que, en estos pacientes se pudo haber generado un fenómeno de “epítope spreading” y por lo tanto hay anticuerpos que reconocen epítotos sub-dominantes, que pueden ser similares en su secuencia a los epítotos lineales y conformacionales, de los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc del cisticerco de *T. solium*. Al respecto, es importante tener en cuenta también que una de las formas de evasión de la respuesta inmune que tiene el cisticerco es el mimetismo molecular (70).

Los resultados generados a partir de la realización del presente trabajo, aportan información relevante que puede ser útil para la optimización del diagnóstico y en el desarrollo de un método diagnóstico; ya que los antígenos evaluados (anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc), podrían aportar epítotos lineales y conformacionales que pueden ser reconocidos por anticuerpos, presentes en muestras de suero de cerdos y humanos positivos para cisticercosis. Así mismo, pueden discriminar aquellas muestras de suero de cerdos y humanos que no están infectados con el parásito y que tampoco han tenido contacto con el mismo.

Finalmente, una mejor evaluación de los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, utilizando sueros de cerdos y humanos con otras parasitosis y que presenten un diagnóstico bien establecido, sería relevante para poder llevar a cabo una evaluación más exacta de la especificidad que presentan dichos antígenos; así mismo, sería importante evaluar otras combinaciones entre los antígenos utilizados en el presente trabajo, con otros antígenos del cisticerco de *T. solium* identificados por nuestro grupo de trabajo y que pudieran aumentar el potencial para el diagnóstico de la cisticercosis humana y porcina.

10. CONCLUSIONES.

1. Los antígenos anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc, presentan epítomos que son reconocidos por anticuerpos presentes en las muestras de suero de cerdos y humanos positivos para cisticercosis.
2. La proteína recombinante anexina B1 y sus péptidos, presentaron mejor capacidad para detectar a los VP en las muestras de suero de humanos y cerdos cisticercosos.
3. La proteína recombinante cinasa dependiente de AMPc y sus péptidos, presentaron mejor capacidad para detectar a los VN, en las muestras de suero de humanos negativos para NC.
4. La combinación de la proteína recombinante cinasa dependiente de AMPc con sus péptidos, mejora la detección de VP sin afectar la capacidad para discriminar a los VN.
5. La mejor capacidad diagnóstica de cisticercosis humana y porcina, se observó al realizar las combinaciones entre las proteínas recombinantes y sus péptidos.

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Torgerson PR, Macpherson CN. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet Parasitol.* 2011; 182(1):79-95.
2. Bruno E, Bartoloni A, Zammarchi L, Strohmeyer M, Bartalesi F, Bustos JA, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in Latin America: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(10):e2480.
3. Winkler AS. Neurocysticercosis in sub-Saharan Africa: a review of prevalence, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Pathog Glob Health.* 2012; 106(5):261-74.
4. Croker C, Redelings M, Reporter R, Sorvillo F, Mascola L, Wilkins P. The impact of neurocysticercosis in california: a review of hospitalized cases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(1):e1480.
- 5 Cantey PT, Coyle CM, Sorvillo FJ, Wilkins PP, Starr MC, Nash TE. Neglected parasitic infections in the United States: cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90(5):805-9.
- 6 Zammarchi L, Strohmeyer M, Bartalesi F, Bruno E, Munoz J, Buonfrate D, et al. Epidemiology and management of cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in Europe, systematic review 1990-2011. *PLoS One.* 2013; 8(7):e69537.
7. Morales J, Martinez JJ, Rosetti M, Fleury A, Maza V, Hernandez M, et al. Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(9):e284.

- 8 Flisser A, Rodriguez-Canul R, Willingham AL, 3rd. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Vet Parasitol.* 2006; 139(4):283-92.
9. Flisser A. State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. *Korean J Parasitol.* 2013; 51(1):43-9.
10. Garcia HH, Del Brutto OH. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol.* 2005; 4(10):653-61.
11. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* 2014; 13(12):1202-15.
12. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Semin Neurol.* 2005; 25(3):243-51.
13. World Health O. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases : first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: Department of Reproductive health and Research, World Health Organization; 2010. 172 p. p.
14. Fleury A, Sciutto E, Larralde C. Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2012; 54(6):632-6.
15. Fleury A, Hernandez M, Fragoso G, Parkhouse RM, Harrison LJ, Sciutto E. Detection of secreted cysticercal antigen: a useful tool in the diagnosis of inflammatory neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97(5):542-6.
16. Bobes RJ, Hernandez M, Marquez C, Fragoso G, Garcia E, Parkhouse RM, et al. Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: application of an

antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. Trop Med Int Health. 2006; 11(6):943-50.

17. Fleury A, Garcia E, Hernandez M, Carrillo R, Govezensky T, Fragoso G, et al. Neurocysticercosis: HP10 antigen detection is useful for the follow-up of the severe patients. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 7(3):e2096.

18. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. Acta Trop. 2003; 87(1):79-86.

19. Lee YM, Handali S, Hancock K, Pattabhi S, Kovalenko VA, Levin A, et al. Serologic diagnosis of human *Taenia solium* cysticercosis by using recombinant and synthetic antigens in QuickELISA. Am J Trop Med Hyg. 2011; 84(4):587-93.

20. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis. 1989; 159(1):50-9.

21. Ayala Sulca E, Miranda Ulloa E. Evaluation of enzyme linked immunoelectrotransfer blot test using purified native antigen mix from cisticercus fluid of *Taenia solium* for diagnosis of human cysticercosis. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2015; 32(3):485-91.

22. Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, Pretell EJ, Brandt J, Lescano AG, et al. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. J Infect Dis. 2009; 199(9):1345-52.

23. Deckers N, Dorny P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis / cysticercosis. Trends Parasitol. 2010; 26(3):137-44.

24. Draelants E, Brandt JR, Kumar V, Geerts S. Characterization of epitopes on excretory-secretory antigens of *Taenia saginata* metacestodes recognized by monoclonal antibodies with immunodiagnostic potential. *Parasite Immunol.* 1995; 17(3):119-26.
25. Fleury A, Hernández M, Avila M, Cárdenas G, Bobes RJ, Huerta M, et al. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007; 78(9):970-4.
26. de Aluja AS Cysticercosis in the pig. *Curr Top Med Chem.* 2008; 8(5):368-74.
27. Flisser A, Correa D. Neurocysticercosis may no longer be a public health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(12):e831.
28. Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltran C, et al. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2002; 108(1):41-8.
29. de Aluja AS, Suárez-Marín R, Sciutto-Conde E, Morales-Soto J, Martínez-Maya JJ, Villalobos N. Evaluation of the impact of a control program against taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*). *Salud Publica Mex.* 2014; 56(3):259-65.
30. Sciutto E, Martinez JJ, Villalobos NM, Hernandez M, Jose MV, Beltran C, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol.* 1998; 79(4):299-313.

31. Harrison LJ, Joshua GW, Wright SH, Parkhouse RM. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1989; 11(4):351-70.
32. Singh AK, Singh SK, Prasad KN, Singh A, Bajpai A, Rahman M, et al. Evaluation of ELISA, neck muscle, tongue and eyelid examinations for the diagnosis of swine cysticercosis in a highly endemic area of north India. *Exp Parasitol.* 2013; 134(3):313-7.
33. Atluri SR, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Evaluation of excretory secretory and 10-30 kDa antigens of *Taenia solium* Cysticerci by EITB assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *Parasite Immunol.* 2009; 31(3):151-5.
34. Atluri VS, Singhi PD, Khandelwal N, Malla N. 2D-PAGE analysis of *Taenia solium* metacestode 10-30 kDa antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. *Acta Trop.* 2011; 118(2):165-9.
35. Bruschi F, Castagna B. The serodiagnosis of parasitic infections. *Parassitologia.* 2004; 46(1-2):141-4.
36. Gavidia CM, Verastegui MR, Garcia HH, Lopez-Urbina T, Tsang VC, Pan W, et al. Relationship between serum antibodies and *Taenia solium* larvae burden in pigs raised in field conditions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(5):e2192.
37. Fleury A, Beltran C, Ferrer E, Garate T, Harrison LJ, Parkhouse RM, et al. Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis. *Trop Med Int Health.* 2003; 8(12):1124-30.
38. Diaz-Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio JR, Mendoza-Hernandez G, Rosas G, Estrada K, et al. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: identification of candidate antigens through immunoproteomics. *Vet J.* 2013; 198(3):656-60.

39. Zea-Vera A, Cordova EG, Rodriguez S, Gonzales I, Pretell EJ, Castillo Y, et al. Parasite antigen in serum predicts the presence of viable brain parasites in patients with apparently calcified cysticercosis only. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(7):e154-9.
40. Sahu PS, Parija S, Kumar D, Jayachandran S, Narayan S. Comparative profile of circulating antigenic peptides in CSF, serum & urine from patients with neurocysticercosis diagnosed by immunoblotting. *Parasite Immunol*. 2014; 36(10):509-21.
41. Rodriguez S, Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathog Glob Health*. 2012; 106(5):286-98.
42. Nhancupe N, Salazar-Anton F, Noormahomed EV, Afonso S, Lindh J. Further characterization of Tsol-p27 as a diagnostic antigen in sub-Saharan Africa. *Exp Parasitol*. 2013; 135(3):573-9.
43. Salazar-Anton F, Lindh J. *Taenia solium*: a two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol*. 2011; 128(4):371-6.
44. da S Ribeiro, V., et al. Diethylaminoethyl (DEAE) binding fraction from *Taenia solium* metacestode improves the neurocysticercosis serodiagnosis. *Parasitology Research*. 2014; 113(7):2569-75.
45. Nunes Dda, S., et al. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013; 76, 36-41.

46. Ribeiro Vda, S., *et al.* Development of specific scFv antibodies to detect neurocysticercosis antigens and potential applications in immunodiagnosis. *Immunology Letter.* 2013; 156, 1-2.
47. Jiang L, Zhang YG, Liu MX, Feng Z. Analysis on the reactivity of five subunits of antigen B family in serodiagnosis of echinococcosis. *Exp Parasitol.* 2012; 131(1):85-91.
48. Huang TY, Zhang XX, Wu QL, Peng WG, Zheng GL, Cai YM, *et al.* Antibody detection tests for early diagnosis in tuberculous meningitis. *Int J Infect Dis.* 2016; 48:64-9.
49. Noh J, Rodriguez S, Lee YM, Handali S, Gonzalez AE, Gilman RH, *et al.* Recombinant protein- and synthetic peptide-based immunoblot test for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(5):1429-34.
50. Nhancupe N, Noormahomed EV, Afonso S, Falk KI, Lindh J. Performance of Tsol-p27 antigen for the serological diagnosis of cysticercosis in Mozambique. *J Helminthol.* 2015:1-4.
51. Gevorkian G1, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, *et al.* Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett.* 1996; 49(3):185-9.
52. Greene RM, Hancock K, Wilkins PP, Tsang VC. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol.* 2000; 86(5):1001-7.

53. Ferrer E, Cortéz MM, Cabrera Z, Rojas G, Dávila I, Alarcón de Noya B, et al. Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005; 99(8):568-76.
54. Salazar-Anton F, Tellez A, Lindh J. Evaluation of an immunodot blot technique for the detection of antibodies against *Taenia solium* larval antigens. *Parasitol Res.* 2012; 110(6):2187-91.
55. Ostoia-Saloma P, Esquivel-Velázquez M, Larralde C. Immunological variation in *Taenia solium* porcine cysticercosis: measurement on the variation of the antibody immune response of naturally infected pigs against antigens extracted from their own cysticerci and from those of different pigs. *Vet Parasitol.* 2013; 197(1-2):130-40.
56. Garcia HH, Gilman RH, Catacora M, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VC. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. Cysticercosis Working Group in Peru. *J Infect Dis.* 1997; 175(2):486-9.
57. Sako Y, Takayanagui OM, Odashima NS, Ito A. Comparative Study of Paired Serum and Cerebrospinal Fluid Samples from Neurocysticercosis Patients for the Detection of Specific Antibody to *Taenia solium* Immunodiagnostic Antigen. *Trop Med Health.* 2015; 43(3):171-6.
58. Ferrer E, González LM, Martínez-Escribano JA, González-Barderas ME, Cortéz MM, Dávila I, et al. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia*

saginata oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. Parasitol Res. 2007; 101(3):517-25.

59. Gottstein B, Tsang VC, Schantz PM. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. Am J Trop Med Hyg. 1986; 35(2):308-13.

60. Ribeiro Vda S, Nunes Dda S, Gonzaga HT, da Cunha-Junior JP, Costa-Cruz JM. Diethylaminoethyl (DEAE) binding fraction from *Taenia solium* metacestode improves the neurocysticercosis serodiagnosis. Parasitol Res. 2014; 113(7):2569-75.

61. Carod JF, Randrianarison M, Razafimahefa J, Ramahefarisoa RM, Rakotondrazaka M, Debruyne M, et al. Evaluation of the performance of 5 commercialized enzyme immunoassays for the detection of *Taenia solium* antibodies and for the diagnosis of neurocysticercosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 72(1):85-9.

62. Oliveira HB, Machado GA, Mineo JR, Costa-Cruz JM. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions without affinity to concanavalin A are an important source of specific antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis. Clin Vaccine Immunol. 2010; 17(4):638-44.

63. Machado GA, Oliveira HB, Gennari-Cardoso ML, Mineo JR, Costa-Cruz JM. Serodiagnosis of human neurocysticercosis using antigenic components of *Taenia solium* metacestodes derived from the unbound fraction from jacalin affinity chromatography. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(3).

64. Lehmann, P. V., Forsthuber, T., Miller, A. & Sercarz, E. E. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*. 1992; 358: 155–157.
65. Vanderlugt CL, Miller SD. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(2):85-95.
66. Orth T, Mayet WJ, Deister H, Chang S, Schmitz M, Bachmann M. Analysis of epitope spreading over an eleven-year period in a patient with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol*. 1998; 27(6):461-4.
67. Powell AM, Black MM. Epitope spreading: protection from pathogens, but propagation of autoimmunity? *Clin Exp Dermatol*. 2001; 26(5):427-33.
68. Adamus G, Yang S, Weleber RG. Unique epitopes for carbonic anhydrase II autoantibodies related to autoimmune retinopathy and cancer-associated retinopathy. *Exp Eye Res*. 2016 May 13.
69. Vanderlugt CL, Begolka WS, Neville KL, Katz-Levy Y, Howard LM, Eagar TN, et al. The functional significance of epitope spreading and its regulation by co-stimulatory molecules. *Immunol Rev*. 1998; 164:63-72.
70. Willms K, Arcos L. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol* 1997; 66: 209–30.

71. Ferrer E, Sánchez J, Milano A, Alvarez S, La Rosa R, Lares M, et al. Diagnostic epitope variability within *Taenia solium* 8 kDa antigen family: implications for cysticercosis immunodetection. *Exp Parasitol*. 2012;130(1):78-85.

72. Sahu PS, Parija SC, Jayachandran S. Antibody specific to 43kDa excretory-secretory antigenic peptide of *Taenia solium* metacestode as a potential diagnostic marker in human neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2010; 115(3):257-61.

73. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, Carrasco S, Larson S, et al. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2011; 180(2):115-9.

74. Pardini AX, Vaz AJ, Dos Ramos Machado L, Livramento JA. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(9):3368-72.

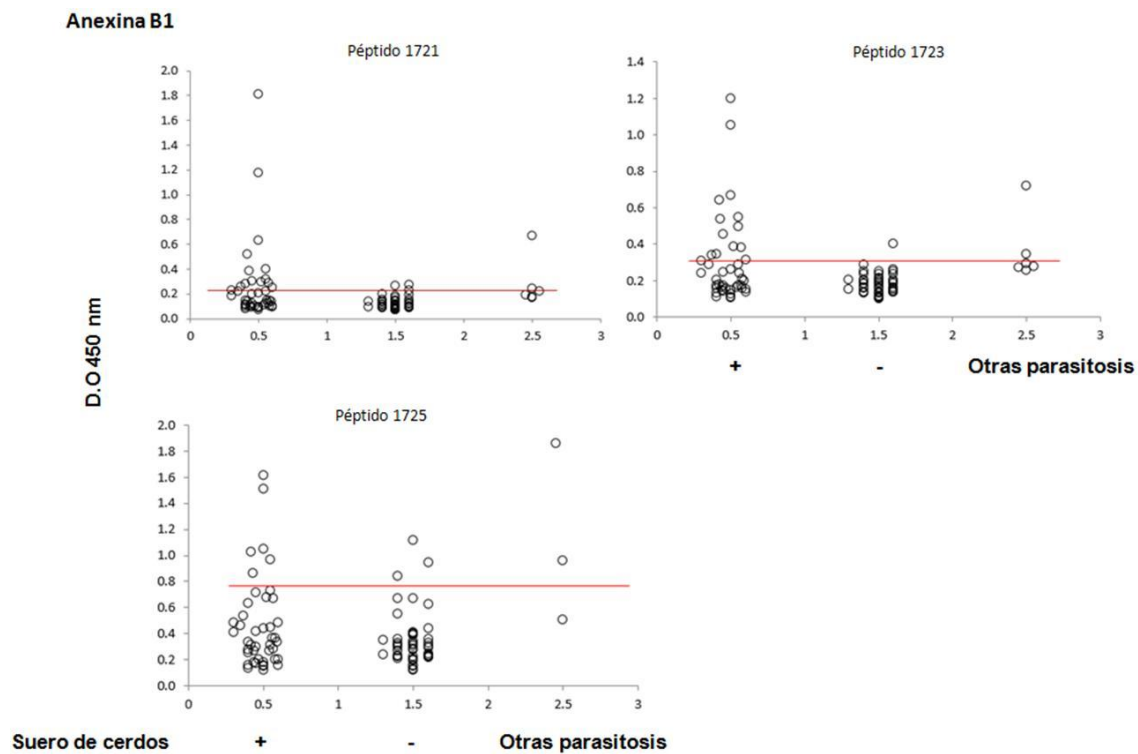
75. Parija M, Biswas R, Harish BN, Parija SC. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2004; 92(3):253-60.

76. Das S, Mahajan RC, Ganguly NK, Sawhney IM, Dhawan V, Malla N. Detection of antigen B of *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Trop Med Int Health*. 2002; 7(1):53-8.

77. Mwape KE1, Praet N, Benitez-Ortiz W, Muma JB, Zulu G, Celi-Erazo M, et al. Field evaluation of urine antigen detection for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105(10):574-8.

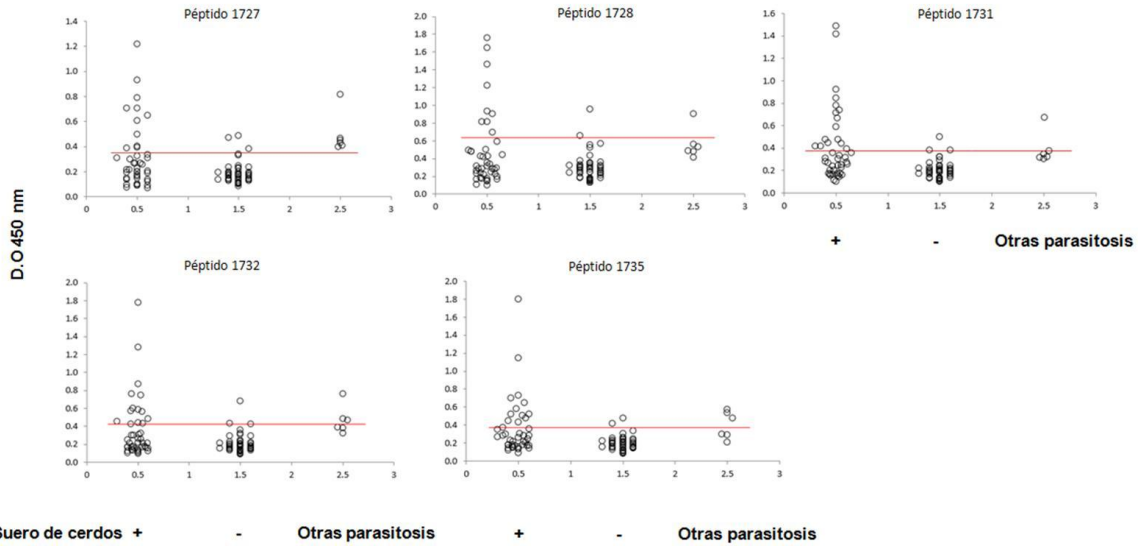
Anexo 4. Gráficos de dispersión que muestran los valores de D.O 450nm (eje Y), de los ensayos de ELISA, utilizando los péptidos de la proteína anexina B1 (A), los péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc (B) y las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc (C) y diferentes paneles de sueros de cerdos cisticercosos (+), no cisticercosos (-) y con otras parasitosis (eje X). Las barras indican el punto de corte (promedio de valores negativos + dos desviaciones estándar).

A)

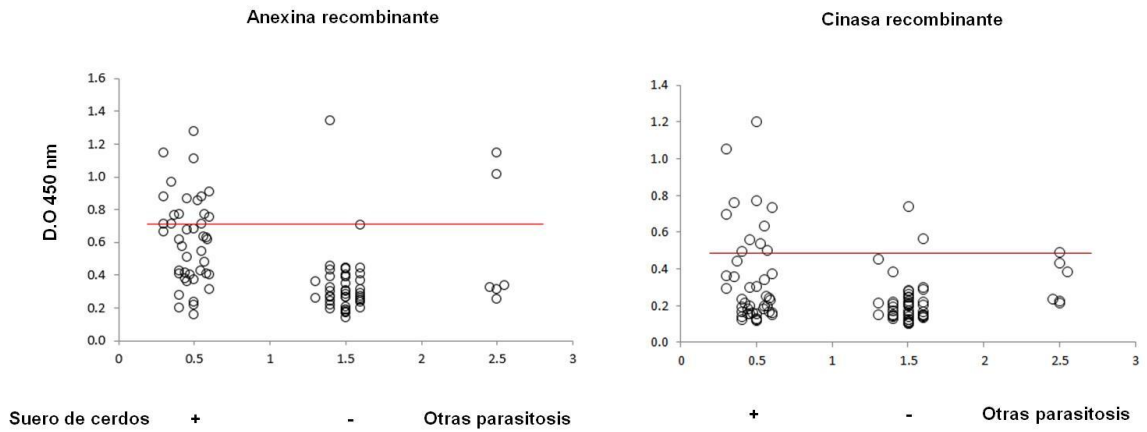


B)

Cinasa dependiente de AMPc

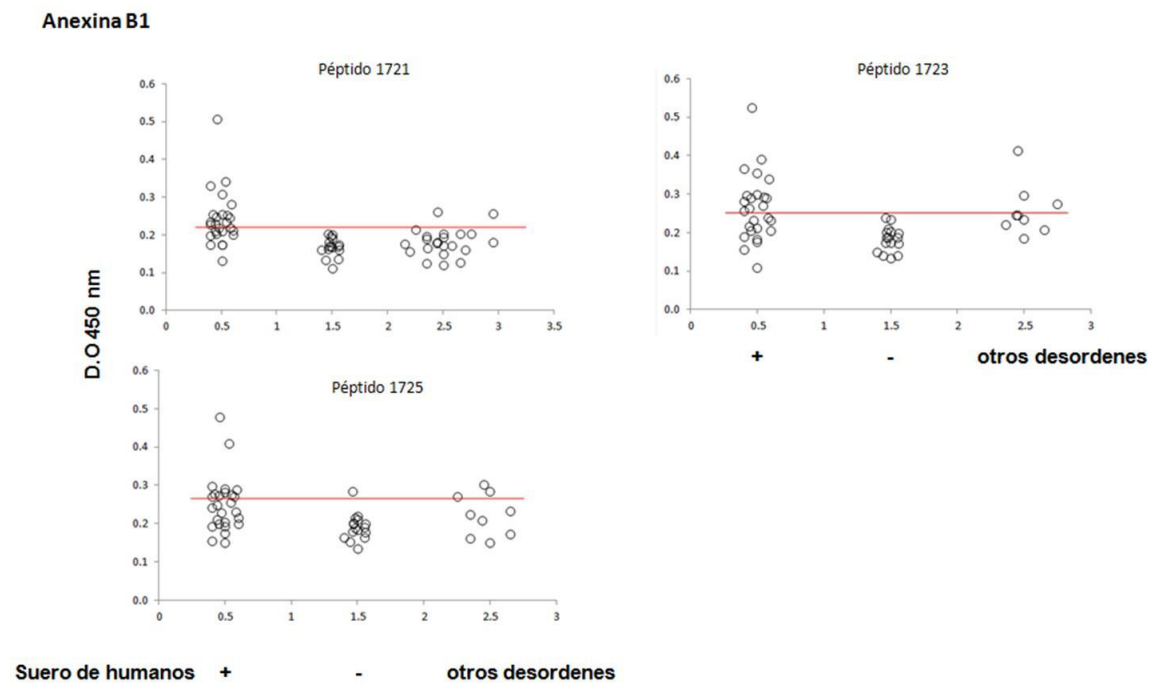


C)



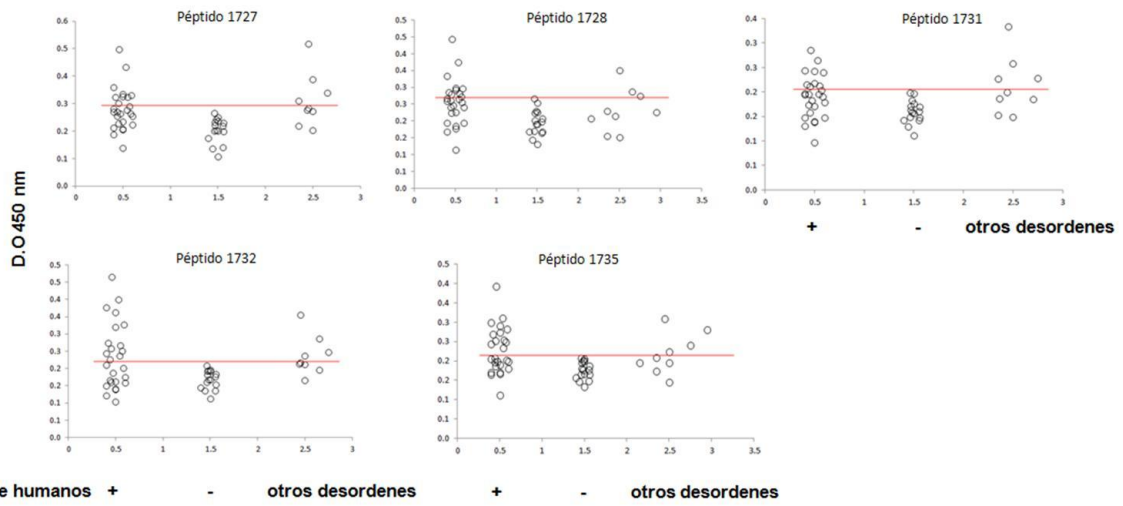
Anexo 5. Gráficos de dispersión que muestran los valores de D.O 450nm (eje Y), de los ensayos de ELISA, utilizando los péptidos de la proteína anexina B1 (A), los péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc (B) y las proteínas recombinantes anexina B1 y cinasa dependiente de AMPc (C) y diferentes paneles de sueros de humanos positivos para NC (+), negativos para NC (-) y con alteraciones neurológicas (eje X). Las barras indican el punto de corte (promedio de valores negativos + dos desviaciones estándar).

A)

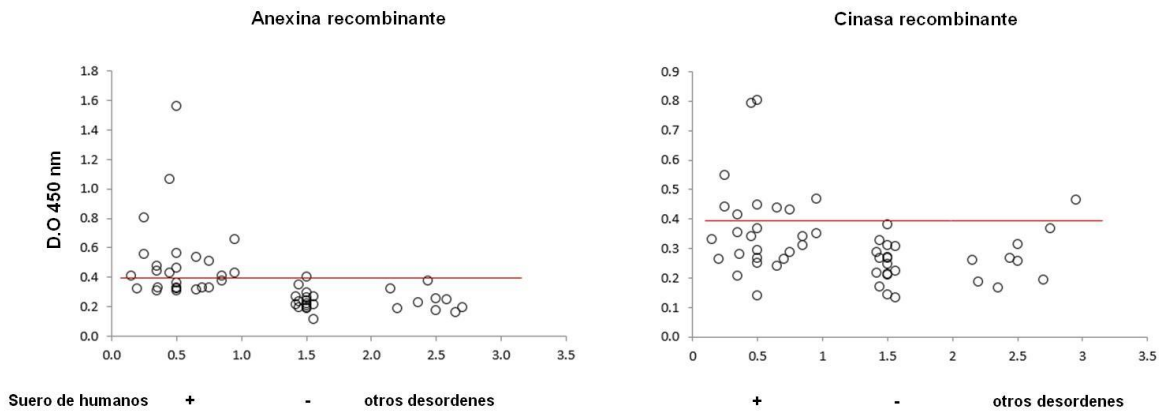


B)

Cinasa dependiente de AMPc

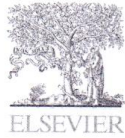


C)



13. ARTÍCULO CIENTÍFICO

The Veterinary Journal 198 (2013) 656–660



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj



Immunodiagnosis of porcine cysticercosis: Identification of candidate antigens through immunoproteomics



Yuliet Diaz-Masmela^a, Gladis Fragoso^a, Javier R. Ambrosio^b, Guillermo Mendoza-Hernández^{c,1}, Gabriela Rosas^d, Karel Estrada^e, Julio César Carrero^a, Edda Sciuotto^a, Juan P. Laclette^a, Raúl J. Bobes^{a,*}

^aImmunology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, DF 04510, Mexico

^bMicrobiology and Parasitology Department, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, DF 04510, Mexico

^cBiochemistry Department, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, DF 04510, Mexico

^dSchool of Medicine, Universidad Autónoma Del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62350, Mexico

^eBiotechnology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 20 September 2013

Keywords:

Cysticercosis
Diagnosis
Immunoproteomics
Taenia solium
Specific antigens

ABSTRACT

Cysticercosis, caused by the larval stage of *Taenia solium*, is a zoonotic disease affecting pigs and humans that is endemic to developing countries in Latin America, Africa and South East Asia. The prevalence of infection in pigs, the intermediate host for *T. solium*, has been used as an indicator for monitoring disease transmission in endemic areas. However, accurate and specific diagnostic tools for porcine cysticercosis remain to be established. Using proteomic approaches and the *T. solium* genome sequence, seven antigens were identified as specific for porcine cysticercosis, namely, tropomyosin 2, alpha-1 tubulin, beta-tubulin 2, annexin B1, small heat-shock protein, 14-3-3 protein, and cAMP-dependent protein kinase. None of these proteins were cross-reactive when tested with sera from pigs infected with *Ascaris* spp., *Cysticercus tenuicollis* and hydatid cysts of *Echinococcus* spp. or with serum from a *Taenia saginata*-infected cow. Comparison with orthologues, indicated that the amino acid sequences of annexin B1 and cAMP-dependent protein kinase possessed highly specific regions, which might make them suitable candidates for development of a specific diagnostic assay for porcine cysticercosis.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Cysticercosis is a parasitic disease caused by the larval stage of the tapeworm *Taenia solium* (cysticerci) that affects pigs and humans and which prevails as a major human health and veterinary problem in developing countries of Latin America, Africa and Asia. In Mexico, taeniasis/cysticercosis is associated with low socio-economic conditions; a recent study, performed in the major neurological hospital of Mexico, indicated that the prevalence of human neurocysticercosis was relatively stable between 1994 and 2004 (Sciuotto et al., 2000; Fleury et al., 2011).

Tongue inspection is still the major procedure for detection of porcine cysticercosis in the field. However, it requires participation of trained personnel and demonstrates poor sensitivity (Sciuotto et al., 1998a). A serological assay would be a convenient alternative for diagnosis of porcine cysticercosis. Previously, a number of immunodiagnostic methods have been designed, based on different extracts of parasite antigens, using ELISA or electro-immunoblot transfer (EITB) techniques (Tsang et al., 1989; Dorny et al., 2003; Prabhakaran et al., 2007; Atluri et al., 2009, 2011). In spite of some

encouraging results obtained using EITB, this is a costly and labour-intensive procedure, which limits its use in epidemiological surveys. Several parasite antigens, such as the vesicular fluid, the secretion/excretion products or crude extracts from *T. solium* cysticerci and related parasites, like *Taenia crassiceps* and *T. saginata*, have been used for detection of host antibodies. Results have shown variable sensitivities and specificities, depending mainly on the severity of the infection in individual pigs (Arruda et al., 2005).

New proteomic tools are now available that allow high resolution analysis of complex groups of proteins, through two-dimensional gels (2D-PAGE). The resolved protein can be blotted and tested for immunoreactivity with different sera. Finally, isolated proteins can be individually identified through mass spectrometry. The aim of the current study was to perform a 2D-PAGE/EITB to identify novel antigens that would allow development of a more sensitive and specific assay for porcine cysticercosis.

Materials and methods

Parasites and protein extracts

Taenia solium cysticerci were obtained from skeletal muscle of naturally-infected pigs and extensively washed with sterile 0.15 M phosphate-buffered saline (pH 7.2; PBS). Parasites were resuspended in approximately three volumes of lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10 mM Tris and protease

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56228956.

E-mail address: rbobes@biomedicas.unam.mx (R.J. Bobes).

¹ Deceased.

inhibitors (0.5 M EDTA, 200 mM PMSF, 10 mM leupeptin and 1 mM pepstatin). The material was then homogenized on ice and centrifuged at 14,000 g for 15 min. The soluble antigens in the supernatant were recovered, quantified with 2-D Quant kit (Amersham), and frozen at -70°C until use.

Animals and sera

Pools of serum samples from naturally-infected *T. solium* cysticercotic pigs, or from pigs infected with other parasites (*Ascaris* spp., *Cysticercus tenuicollis*, hydatid cysts of *Echinococcus* spp.), as well as a single serum sample from a calf that was experimentally infected with gravid proglottids of *T. saginata*, were obtained. Sera from non-cysticercotic pigs that reacted positive to the crude antigenic extract were also obtained, to be used in the analysis as false positives (Sciutto et al., 1998b). Finally, sera from pigs that had been confirmed as uninfected for all the parasites described above were also obtained, to be used as negative controls. In all cases, with the exception of the calf serum, pools were made using at least five different individual sera. All animals employed in this study were necropsied to certify infection status. This research study was approved by the Ethical Committee of the Veterinary Medicine School (UNAM).

Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

Isoelectric focusing (IEF) was performed in 17 cm IPG strips (Bio-Rad) with non-linear pH gradients 3–10 or 3–6 using a Protean IEF Cell (Bio-Rad), with constant surface temperature of 20°C and maximum current of 50 $\mu\text{A}/\text{strip}$. Samples of 150 μg of crude antigenic extract, were diluted in 125 μL of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% IPG buffer of the respective pH gradient and bromophenol blue). After applying the samples to the IPG strips, these were rehydrated at 20°C for at least 12 h. IEF was run for a total of 10,000 V h. Afterwards, the strips were reduced in equilibration buffer (6 M urea, 0.05 M Tris pH 8.8, 2% SDS and 30% glycerol) containing 2% DTT for 15 min and then alkylated in equilibration buffer containing 2.5% iodoacetamide for 15 min.

The second dimension was performed on 12% SDS-polyacrylamide gels using a Mini Protean cell (Bio-Rad). After running at 200 V, the 2-D gels were either stained or electroblotted onto nitrocellulose membranes for immunoblot analysis. Reproducibility of the proteomic pattern was verified by running the 2-D gels in triplicate at different times. The 2-D gels were routinely stained with silver stain, or with Coomassie blue when the gel was used for mass spectrometry (MS) analysis. Analysis of 2-D gels was achieved using PDQuest 2-D Analysis software (Bio-Rad).

Immunoblot analysis

Proteins were electro-transferred from 2-D gels to nitrocellulose membranes at 100 V for 90 min. Membranes were initially blocked by overnight incubation at 4°C with 10% dried skimmed milk in PBS buffer and then incubated for 2 h at 37°C with one of the pooled sera pig samples or the single calf sera described above (diluted 1:20 in the same buffer). The membrane was washed three times with 0.1% Tween 20 in PBS (PBST) and incubated again for 2 h at 37°C with a horse-radish peroxidase conjugated anti-porcine IgG antibody (Sigma) diluted at 1:500 in PBST. After washing as above, immunoblots were developed by standard procedures with 4-chloro-1-naphthol used as the substrate. Reproducibility of immune recognition was verified by repeating the immunoblot at least three times.

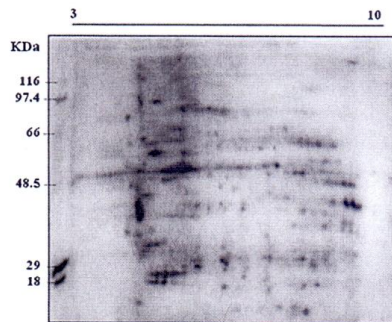


Fig. 1. Representative 2-DE gel of *T. solium* cysticerceri proteins. Proteins (150 μg) were separated with IPG strip of 17 cm, on a non-linear pH range of 3–10. The proteins were visualized with silver staining.

Mass spectrometry (LC/MS/MS)

For protein identification, spots of antigenic proteins were carefully excised from Coomassie blue-stained 2-DE gels and prepared for LC/MS/MS. Individual protein spots were destained, reduced, carbamido-methylated, digested with trypsin, and extracted from the gel using a standard in-gel digestion procedure (Kinter and Sherman, 2000). The volume of the extracts was reduced by vacuum centrifugation at room temperature, then adjusted to 20 μL with 1% formic acid.

Peptide mass spectrometric analysis was carried out on a 3200 QTRAP System (Applied Biosystems/MDS Sciex), with a nanoelectrospray source and a nanoflow LC system (Agilent 1100 Nano Pump, Waldbronn). Mass tuning of the hybrid triple quadrupole linear IT spectrometer was performed with [Glu1]-fibrinopeptide B. Antigen sample digests were injected on a Zorbax 300SB C18 column (3.5 mm, 5060.075 mm^2 , Agilent) equilibrated with 2% acetonitrile, 0.1% formic acid and separated using a linear gradient from 2% to 70% acetonitrile, 0.1% formic acid over an 80 min period, at a flow rate of 300 nL/min. The interface heater for desolvation was held at 150°C . Spray voltage was 2.4 kV.

Spectra were acquired in automated mode using information dependent acquisition (IDA). Precursor ions were selected in Q1 using the enhanced MS mode. The scan range for EMS was set at m/z 400–1500 and 4000 amu/s. Selected ions were subjected to an enhanced resolution scan at the low speed of 250 amu/s over a narrow (30 amu) mass range and then to an enhanced product ion scan (MS/MS). The precursor ions were fragmented by collisionally activated dissociation (CAD) in the Q2 collision cell using rolling collision energy. The fragment ions generated were captured and mass analyzed in the Q3 linear IT. Database searching (Swiss-Prot, NCBItr or MSDB) and protein identification were performed with MASCOT software,² with trypsin plus one missed cleavage, carboxyamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification and a mass tolerance of 0.5 Da for the precursor molecular weights and 0.3 Da on the fragment molecular weights.

The criteria to accept a protein hit as a valid identification were: two or more tryptic peptide matches to the protein sequence and at least one peptide with $P < 0.05$. Partial sequences obtained from the MS analysis were used for screening of full-length sequences in the *T. solium* genome database (Tsai et al., 2013) using the basic local alignment search tool (BLAST).³

Results

2-D PAGE of *T. solium* cysticerceri whole extracts

Three hundred and fifty protein spots were identified in the silver stained 2-DE gels, with molecular masses ranging from 12.6 to 180 kDa and pI ranging from 4 to 10 (Fig. 1). The majority of spots were found between 18–86 kDa and pI: 5.0–8.7.

Identification of antigenic proteins

Proteins of potential interest for diagnosis of cysticercosis were identified by immunoblotting. For this purpose, a group of pig sera from naturally infected pigs (*T. solium*, *Ascaris* spp., *C. tenuicollis* or *Echinococcus* spp.) as well as from a calf (experimentally infected with gravid proglottids of *T. saginata*), were assessed against the *T. solium* crude extract as described previously. We also used sera from non-cysticercotic pigs that reacted positively or negatively to the *T. solium* crude extract in previous tests.

Forty-three spots were recognized by immunoblot when the pool of sera from cysticercotic pigs (20.5–150 kDa and pI: 3.6–8.0) was assessed, using gels with pH ranges of 3–10 and 3–6, against the *T. solium* crude extract (Fig. 2). After extensive testing for cross reactivity, using all other sera from infected and healthy animals, only 13 spots (Fig. 2) were shown to be recognized exclusively by the sera from cysticercotic pigs (21.6–47.2 kDa and pI: 4.7–5.4). A group of strongly-reactive spots, aligned at 50 kDa with pI varying between 3.6 and 7.5, gave consistently positive results in all tests (Fig. 2). These spots were found to correspond to pig IgG immunoglobulin, which are normally taken up by cysticerceri from the host (Ambrosio et al., 1994) and are thus recognized by the secondary antibody (data not shown).

Thirteen of the antigenic spots exclusively recognized by sera

² See: <http://www.matrixscience.com>.

³ See: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

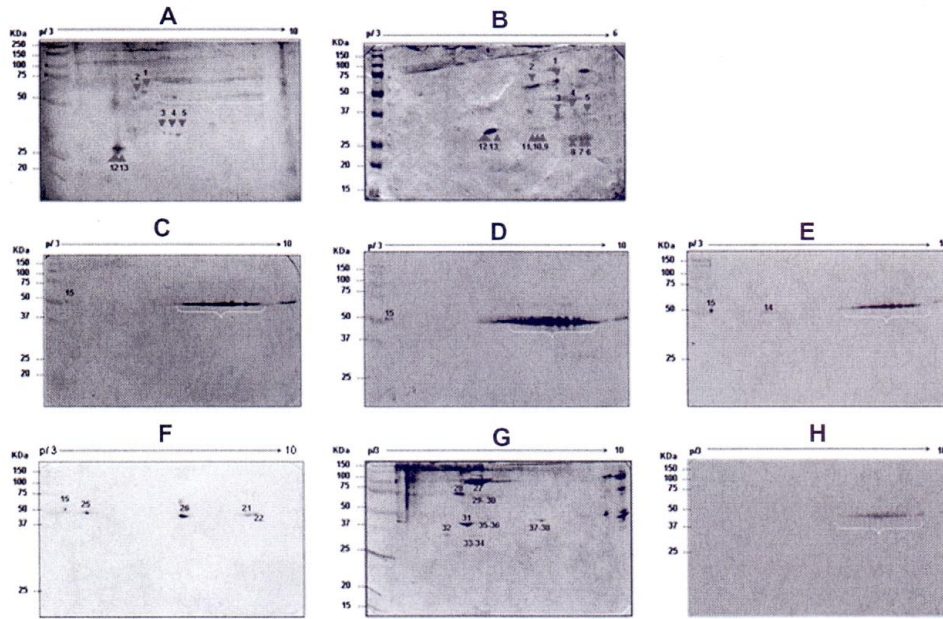


Fig. 2. Immunoblot of total protein extract of cysticerci of *T. solium* with different serum samples. (A and B) blot using pool of sera from naturally infected *T. solium* cysticercotic pigs (pH 3–10 and pH 3–6 respectively); (C) blot using sera from non-cysticercotic pigs that reacted positive to the crude antigenic extract (false positives); (D) blot using sera from uninfected pigs with cysticerci (negative controls); (E) blot using sera from pigs infected with *Cysticercus tenuicollis*; (F) blot using sera from pigs infected with *Ascaris* spp.; (G) blot using sera from calf infected with gravid proglottid of *T. saginata*; (H) blot using sera from pigs infected with hydatid cysts of *Echinococcus* spp. The red arrows indicate the spots exclusively recognized by the sera from cysticercotic pigs, in brackets indicate the spots observed in all immunoblot assays.

from cysticercotic pigs, were analyzed by mass spectrometry. Nine spots produced peptide sequence coverage higher than 40%; three more produced sequence coverage above 14%, and were readily identified through BLAST analysis against the *T. solium* genome database (Supplementary data, Fig. 1). Only one spot resulted in sequence coverage lower than 10%, although identification was achieved since four peptide sequences of 46 amino acid residues demonstrated 100% identity to a *T. solium* protein identified as cAMP-dependent protein kinase. Peptide sequences obtained from three spots corresponded to the same 35.6 kDa protein. Similarly, peptide sequences from another six spots corresponded to three different 50.7, 38.1 and 28.2 kDa proteins. In summary, the 13 analyzed spots corresponded to seven different antigenic proteins that were exclusively recognized by the sera from *T. solium* cysticercotic pigs. The seven identified proteins were tropomyosin 2, alpha-1 tubulin, beta-tubulin 2, annexin B1, small heat-shock protein, 14-3-3 family protein and cAMP-dependent protein kinase (Table 1). Among these, only annexin and heat-shock protein have been previously described for *T. solium*.

Discussion

Reliable immunodiagnostic tools are required for an accurate field epidemiological study of pig cysticercosis. In this research study, a novel approach was employed to identify candidate antigens for specific immunodiagnosis of porcine cysticercosis. The strategy employed took advantage of the fact that a database of the *T. solium* genome is now available (Tsai et al., 2013) that allows an immunoproteomic approach to be undertaken using sera from well-characterized pigs of different infection status.

Thirteen *T. solium* antigens were recognized exclusively by the pooled sera from cysticercotic pigs. These antigens showed no cross-reactivity with the pooled sera from animals infected with other parasites, nor with the sera from uninfected but false positives and negative controls. The focus of this study was to screen for specific *T. solium* antigens, through the negative selection of a number of cross-reactive epitopes, present in proteins of related parasites of humans and pigs. Special attention was directed to the negative selection of antigens that were inconsistently recognized by cysticercotic pigs, as well as to other antigens that remain recognized by antibodies after the infection has resolved.

The use of 2D PAGE and immunoblot, in combination with mass spectrometry, allowed identification of seven different *T. solium* proteins that, under our experimental conditions, were recognized exclusively by antibodies present in the sera from cysticercotic pigs. Remarkably, these identified proteins are involved in a wide range of biological functions: cytoskeleton, signalling, metabolism and stress response. Moreover, when their amino acid sequences were compared with homologues of related parasites (Supplementary data; Fig. 2), some of these proteins were almost identical, as is the case with alpha-1 tubulin and beta-tubulin 2 that were 89.5% and 99.5% identical respectively to *Echinococcus multilocularis* and over 95% identical to hydatid homologues. The other selected proteins were more than 77% similar to *Echinococcus multilocularis*. The most promising candidates among the selected antigens were annexin B1 and cAMP-dependent kinase that showed more divergence in their amino acid sequences when compared to closely related parasite species (Supplementary data; Fig. 2), with most similarity occurring with *Echinococcus* spp., as has been reported in other studies (Carod et al., 2012).

One of the proteins associated with cell motility was tropomyosin 2, which is a microfilament-associated protein present in all

Table 1
Identification of the antigenic proteins of the whole *Taenia solium* cysticerci by LC/ESI-MS/MS.

Spot number	Protein	Species	Accession number (NCBI)	MW (kDa) exp/theo	pI exp/theo	Matched peptides	Sequence coverage %	MASCOT score
Ts1_1	Alpha-1 tubulin	<i>Hirudo medicinalis</i>	gi 1527170	47.2/50.7	5.1/4.94	19	41	749
Ts1_2	Beta-tubulin 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 29337144	46.3/50.2	4.7/4.75	37	62	1064
Ts1_3	Small heat-shock protein	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.22/5.56	18	55	535
Ts1_4	Small heat-shock protein	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.21/5.56	17	50	492
Ts1_5	Small heat-shock protein	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.41/5.56	24	57	539
Ts1_6	Annexin B1	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	28.6/38.1	5.44/5.71	21	58	1101
Ts1_7	Annexin B1	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	28.6/38.1	5.34/5.71	21	73	957
Ts1_8	Similar to alpha-tubulin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	gi 115736220	28.6/50.7	5.2/5.06	5	17	200
Ts2_9	Annexin B1	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	26.7/38.1	5.4/5.71	4	14	168
Ts1_10	cAMP-dependent protein kinase	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256052513	28.6/43	5.0/5.12	3	8	70
Ts1_11	Tropomyosin 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 220897456	28.6/28.3	4.93/4.93	5	18	103
Ts1_12	Putative 14-3-3 protein	<i>Echinococcus granulosus</i>	gi 62178030	23.3/28.2	4.8/4.91	22	51	448
Ts1_13	Full-14-3-3 protein	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 29336772	21.6/27.9	4.75/4.8	37	79	1093

LC/ESI-MS/MS, liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry; MW (kDa) exp/theo, molecular weight experimental/theoretical; pI exp/theo, isoelectric point experimental/theoretical.

eukaryotic cells. It is found in multiple isoforms and is essential for muscle contraction and basic function of filaments in the cytoskeleton (Gunning et al., 2008). In parasites, this protein has also been considered as a vaccine candidate and as a modulator of the host-parasite relationship in flatworms and other helminth parasites (Alvite and Esteves, 2009; Fang et al., 2009; Santivañez et al., 2010). The small heat shock protein (HSP) plays an essential role as a molecular chaperone, facilitating protein folding and preventing aggregation. Intracellular HSPs have other protective functions that enable survival of cells under sub-optimal conditions. Extracellular or membrane-bound HSPs can also function as immunological modulators of either innate or adaptive immune responses (Schmitt et al., 2007). Some HSPs have been identified in the cysticerci of *T. solium* suggesting a possible use for diagnosis of neurocysticercosis (Vargas et al., 2001; Ferrer et al., 2005).

The 35.6 kDa HSP has previously been reported to be antigenic in studies using *T. solium* crude extracts reacted against serum samples from cysticercotic patients and pigs (Ferrer et al., 2005). It has been reported that Tsol-sHSP 35.6 is similar structurally to the other known plathyhelminth HSPs (Benitez et al., 1998; Ferrer et al., 2005).

Another protein that was also identified in this study was the 14-3-3 protein, which belongs to a family of regulatory proteins involved in intracellular signalling pathways and cell cycle control. It has been reported to be present on the surface of *T. solium* oncospheres and cysts. This protein was recognized by sera from neurocysticercotic patients (Santivañez et al., 2010; Salazar and Lindh, 2011). In the current study, the 14-3-3 protein was not recognized by sera from pigs infected with hydatid cysts, suggesting that it could be a candidate antigen to differentiate between these two zoonotic diseases.

The most promising candidate antigens were annexin B1 and cAMP-dependent kinase. The cAMP-dependent kinase has not been described as being a major target of antibody reactivity previously. This type of kinase is involved in the modulation of protein phosphorylation, a major biochemical process for signal transduction in different developmental stages of some organisms (Wurtz et al., 2001). Annexin B1 proteins are ~ 40 kDa in size with phospholipid-binding properties and anticoagulant/anti-inflammatory activities (Hongli et al., 2002; Gao et al., 2007). This protein

is present in the vesicular fluid of *T. solium* cysticerci and has also been described as an excretion/secretion (E/S) product, found in host adjacent tissues with active inflammatory processes. The potential utility of this protein for immunodiagnosis has been evaluated using sera from *T. solium* infected humans and pigs (Hongli et al., 2002; Gao et al., 2007; Fang et al., 2009). In our study we further evaluated the specificity of annexin B1 using serum samples from pigs infected with other parasites.

The cysticerci of *T. solium* are able to survive in the tissues of the infected host in the presence of an immune response. A number of E/S products have been reported to play a role in the maintenance of this complex host-parasite relationship (Lightowers and Rickard, 1988). A proteomic analysis of *T. solium* cysticerci has shown that most of the proteins identified in this work (annexin B1, small heat shock protein, tubulin, 14-3-3 and cAMP-dependent protein kinase) are E/S products, advancing a line of explanation as to why they might be recognized by the host immune system (Victor et al., 2012).

Previous studies have reported a variety of antigens for the diagnosis of cysticercosis (Ev et al., 1999; Prabhakaran et al., 2004; Hancock et al., 2006; Atluri et al., 2009, 2011; Fang et al., 2009; Salazar and Lindh, 2011). A major difference with our analysis is identification of all proteins by mass spectrometry using the *T. solium* genome database (Tsai et al., 2013). It is worth mentioning that in addition to their potential use as diagnostic reagents, some of these proteins could also have other potential uses, such as vaccine targets.

Conclusions

Seven *Taenia solium* proteins were identified as potential specific antigens for the diagnosis of porcine cysticercosis. Among them, annexin B1 and cAMP-dependent protein kinase possessed highly specific regions that make them suitable candidates for cysticercosis diagnosis. Further studies will be conducted to evaluate the potential of the seven selected antigens (individually or in combination), using a larger number of sera from naturally-infected pigs, as well as with sera and cerebral spinal fluids from neurocysticercotic human patients to establish whether the same antigens might also be useful in other species.

Conflict of interest statement

None of the authors in this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgments

This paper was supported in part by grants from PAPIIT-UNAM: IN228609-3 and IT-201613 (RJB), IN213711 (JPL) and IN213611-3 (JCC) and CONACYT: 61334 (JPL); and from SENASICA-UNAM 29419-1499-2-VIII-11 (ES). YDM is a PhD student within the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; and is supported by a fellowship (347071) from CONACYT. We thank A.N. Villalobos, J. Morales, and P. de la Torre for technical assistance.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.09.056>.

References

- Alvite, G., Esteves, A., 2009. *Echinococcus granulosus* tropomyosin isoforms: From gene structure to expression analysis. *Gene* 433, 40–49.
- Ambrosio, J., Landi, A., Merchant, M.T., Lacleite, J.P., 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives of Medical Research* 25, 325–330.
- Arruda, G.C., da Silva, A.D., Quagliato, E.M., Maretti, M.A., Rossi, C.L., 2005. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health* 10, 1005–1012.
- Atluri, S.R., Singhi, P., Khandelwal, N., Malla, N., 2009. Evaluation of excretory secretory and 10–30 kDa antigens of *Taenia solium* Cysticerci by EITB assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *Parasite Immunology* 31, 151–155.
- Atluri, S.R., Singhi, P.D., Khandelwal, N., Malla, N., 2011. 2D-PAGE analysis of *Taenia solium* metacestode 10–30 kDa antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. *Acta Tropica* 118, 165–169.
- Benitez, L., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T., 1998. Sequence and preliminary characterisation of a *Taenia saginata* oncosphere gene homologue of the small heat-shock protein family. *Parasitology Research* 84, 423–425.
- Carod, J.F., Randrianarison, M., Razafimahefa, J., Ramahefariosa, R.M., Rakotondrazaka, M., Debruyne, M., Dautigny, M., Casal, P., Andriantscheno, M.L., Charles, E.R., 2012. Evaluation of the performance of 5 commercialized enzyme immunoassays for the detection of *Taenia solium* antibodies and for the diagnosis of neurocysticercosis. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 72, 85–89.
- Dorny, P., Brandt, J., Zoli, A., Geerts, S., 2003. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica* 87, 79–86.
- Ev, L.V., Maia, A.A., Pianetti, G., Nascimento, E., 1999. Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitology Research* 85, 98–102.
- Fang, W., Bao, H.E., Xiao, L.L., Mu, R., 2009. Screening, identification and bioinformatic analysis of *Taenia solium* cysticercus. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases* 27, 313–317.
- Ferrer, E., González, L.M., Foster, M., Cortéz, M.M., Dávila, I., Rodríguez, M., Sciuotto, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T., 2005. *Taenia solium*: Characterization of a small heat shock protein (Tsol-HSPs 35.6) and its possible relevance to the diagnosis and pathogenesis of neurocysticercosis. *Experimental Parasitology* 110, 1–11.
- Fleury, A., Carrillo, M.R., Flisser, A., Sciuotto, E., Corona, T., 2011. Subarachnoid basal neurocysticercosis: A focus on the most severe form of the disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 9, 123–133.
- Gao, Y.J., Yan, H.L., Ding, F.X., Lu, Y.M., Sun, S.H., 2007. Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction. *Acta Tropica* 101, 92–09.
- Gunning, P., O'Neill, G., Hardeman, E., 2008. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiological Reviews* 88, 1–35.
- Hancock, K., Pattabhi, S., Whitfield, F.W., Yushak, M.L., Lane, W.S., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Tsang, V.C., 2006. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 147, 109–117.
- Hongli, Y., Shuhan, S., Ruiwen, C., Yingjun, G., 2002. Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119, 1–5.
- Kinter, M., Sherman, N.E., 2000. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. Ed. John Wiley-Interscience, New York, USA. pp. 147–165.
- Lightowlers, M.W., Rickard, M.D., 1988. Excretory-secretory products of helminth parasites: Effects on host immune responses. *Parasitology* 96, S123–S166.
- Prabhakaran, V., Rajshekhar, V., Murrell, K.D., Oommen, A., 2004. *Taenia solium* metacestode glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98, 478–484.
- Prabhakaran, V., Rajshekhar, V., Murrell, K.D., Oommen, A., 2007. Conformation-sensitive immunoassays improve the serodiagnosis of solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, 570–577.
- Salazar, F., Lindh, J., 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. *Experimental Parasitology* 128, 371–376.
- Santivañez, S.J., Hernández, A., Chile, N., Oleaga, A., Arana, Y., Palma, S., Verastegui, M., Gonzalez, A.E., Gilman, R., Garcia, H.H., et al., 2010. Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Molecular and Biochemical Parasitology* 171, 32–39.
- Schmitt, E., Gehrmann, M., Brunet, M., Multhoff, G., Garrido, C., 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: Repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 5–27.
- Sciuotto, E., Martínez, J.J., Villalobos, N.M., Hernández, M., José, M.V., Beltrán, C., Rodarte, F., Flores, I., Bobadilla, J.R., Fragoso, G., et al., 1998a. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Veterinary Parasitology* 79, 299–313.
- Sciuotto, E., Hernández, M., García, G., de Aluja, A.S., Villalobos, A.N., Rodarte, L.F., Parkhouse, M., Harrison, L., 1998b. Diagnosis of porcine cysticercosis: A comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Veterinary Parasitology* 78, 185–194.
- Sciuotto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleite, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* 2, 1875–1890.
- Tsai, I.J., Zarowiecki, M., Holroyd, N., Garcarrubio, A., Sanchez-Flores, A., Brooks, K.L., Tracey, A., Bobes, R.J., Fragoso, G., Sciuotto, E., et al., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 496, 57–63.
- Tsang, V.C., Brand, J.A., Boyer, A.E., 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of Infectious Diseases* 159, 50–59.
- Vargas, P.L., Solís, C.F., Lacleite, J.P., 2001. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology* 122, 583–588.
- Victor, B., Kanobana, K., Gabriél, S., Polman, K., Deckers, N., Dorny, P., Deelder, A.M., Palmblad, M., 2012. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics* 12, 1860–1869.
- Wurtz, N., Chapuis, C., Desplans, J., Parzy, D., 2001. CAMP-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*: An update. *Parasitology* 138, 1–25.