



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas
Odontológicas y de la Salud

Evaluación de los Productos de Secreción del Cisticerco de *Taenia solium*
para el Inmunodiagnóstico de la Cisticercosis.

T E S I S

Que para optar por el grado de
Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M en C. Sandra Gomez Fuentes

Tutor Principal:

Dra. Laura Adalid Peralta

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Manuel Velasco Suárez

Ciudad de México, 09 de noviembre de 2021.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

Los años corren, simulan que se detienen y vuelven a correr, pero siempre hay alguien que en medio de la oscura perspectiva alza una antorcha que nos obliga a ver el lado íntimo de las horas.

(Mario Benedetti)

Te amo Asiel... siempre!!!

AGRADECIMIENTOS

- ⌘ A mi familia, que a pesar de la distancia siempre están tan cerca.
- ⌘ A mi esposo, que complementa mis días por mas difíciles que estos sean.
- ⌘ A todos los compañeros que se volvieron amigos y que aportaron muchísimo en este proyecto.
- ⌘ A Laura Adalid porque aun en los momentos difíciles siempre aprendí de ti.
- ⌘ Finalmente, Gracias a Dios... por que en tu mano siempre estoy.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), en representación de la Dra. Laura Adalid Peralta, No. 167278. Además de la beca de doctorado otorgada a la M en C. Sandra Gomez Fuentes. El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría de la Dra. Laura V. Adalid Peralta.

Además, se contó con el apoyo académico de

- ⌘ M. en C. María Cristina Parada Colin por su apoyo y entrenamiento en la parte experimental.
- ⌘ Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por acogerme en su laboratorio y su guía en el diseño de los ensayos.
- ⌘ Dra. R. Marisela Hernández González por su guía, entrenamiento y apoyo técnico aportado en la realización de esta tesis.
- ⌘ Dr. Adrián Ochoa Leyva por su apoyo y entrenamiento en el diseño de los ensayos.
- ⌘ Biól. Filiberto Sanchez Lopez por apoyo técnico aportado en la realización de esta tesis.
- ⌘ Dra. Gladis Del Carmen Fragoso González por su apoyo prestado al entendimiento de muchas de las técnicas usadas en esta tesis, así como al diseño de los ensayos y publicaciones.
- ⌘ Edda Sciutto Conde su guía en el diseño de los ensayos, y acogernos en su laboratorio.
- ⌘ Agradezco al consorcio del genoma de *Taenia solium* por el uso libre de sus datos y apoyo en la realización de esta tesis.
- ⌘ Dr. Raúl José Bobes Ruiz por su ayuda en el análisis de los datos proteómicos.
- ⌘ Biol. Gonzalo Asariel Acero Galindo por su apoyo técnico aportado en la realización de esta tesis.
- ⌘ Dra. Nelly Villalobos por su ayuda en la obtención del material biológico.
- ⌘ Dra. Silvia Ivonne Mora Herrera por su apoyo técnico aportado en la realización de esta tesis.
- ⌘ Juan Francisco Rodríguez por la corrección de estilo de las publicaciones y presentaciones a lo largo de este proyecto.

INDICE

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	2
AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS.....	3
INDICE.....	4
INDICE DE TABLAS	8
RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Epidemiología	11
1.2 Patología	13
1.3 Respuesta inmune	14
1.4 Diagnóstico	17
1.5 Proteínas de secreción (ESP)	25
1.6 Abundancia de regiones antigénicas (AAR)	30
2 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	31
3 HIPÓTESIS	32
4 OBJETIVO GENERAL.....	32
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Identificación de las proteínas de secreción	34
6.3 Predicción de proteínas sin secuenciación	37
6.4 Análisis de antigenicidad	39
6.5 Producción de proteínas de secreción recombinantes	40
6.6 Síntesis de proteínas de secreción (Apeptide)	48
6.7 Población de estudio y muestras de líquido cefalorraquídeo.	49
6.8 Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA)	50
6.9 Análisis de datos	50
7 RESULTADOS	53
7.1 Estrategia Proteómico/Bioinformática.	57
7.2 Secuenciación teórica para proteínas de baja expresión (TS-LEP).	62
7.3 Análisis de secuencias candidato.	64
7.4 Clonación y expresión de las proteínas de secreción en un sistema procarionte (<i>E. coli</i>).	66
7.5 Ensayos serológicos e interpretación de resultado	68

8	DISCUSIÓN.....	84
9	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	88
10	REFERENCIAS	89
11	ANEXOS.....	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	11
Figura 2. Mapa de endemicidad de <i>Taenia solium</i> en el mundo. WHO, 2020.....	13
Figura 3. Secreción clásica y no clásica de proteínas.....	27
Figura 4. Predicción de las proteínas ESP del genoma de <i>Taenia solium</i>	29
Figura 5. Obtención del secretoma único de <i>Taenia solium</i>	30
Figura 6. Fórmula para la obtención de la abundancia de regiones antigénicas (AAR).....	31
Figura 7. Plan de trabajo.....	33
Figura 8. Identificación de proteínas de baja expresión provenientes de una fuente biológica compleja (TS-LEP).....	38
Figura 9. Mapa del Vector pUC57, genescript.....	41
Figura 10. Mapa del Vector pJet1.2/blunt, Thermo Scientific CloneJet.....	42
Figura 11. Curva de crecimiento de las proteínas 3 y 5 a 37° C.....	44
Figura 12. SDS PAGE de las proteínas sintéticas resuspendidas en DMSO.....	49
Figura 13. Algunas características de análisis de una curva ROC.....	52
Figura 14. Identificación de spots en geles bidimensionales con el software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0.....	54
Figura 15. Identificación de regiones antigénicas a través de ensayos de Western Blot.....	56
Figura 16. Gel teórico bidimensional del secretoma único de <i>Taenia solium</i>	58
Figura 17. Gel teórico bidimensional de regiones antigénicas en Western blots 2D-PAGE de sobrenadantes de cultivos de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	59
Figura 18. Diagrama de flujo ilustrativo del diseño de empalme entre geles teóricos.....	60
Figura 19. Empalme gel teórico bidimensional del secretoma único de <i>Taenia solium</i> con el gel teórico bidimensional de regiones antigénicas en Western blots 2D-PAGE.....	61
Figura 20. Análisis Proteínas candidato con los algoritmos Antigenic Propensity, Bepipred, Cbtope y SVMTrip.....	62
Figura 21. Placas de medio LB correspondientes a las transformaciones de 3_pJET1.2blunt y 5_ pJET1.2blunt a células electrocompetentes.....	66

Figura 22. Geles SDS-PAGE de la proteína 3_ pJET1.2blunt; M (marcador de peso molecular 250 – 2 kDa).	67
Figura 23. Geles SDS-PAGE de la proteína 5_ pJET1.2blunt.....	68
Figura 24. Diseño de la prueba diagnóstica.....	69
Figura 25. Gráfico de dispersión de los ensayos de Elisa Indirecto de cada uno de los antígenos sintéticos y recombinantes.	71
Figura 26. Gráfico de dispersión de los ensayos de Elisa Indirecto de cada uno de los paneles a evaluar con respecto de los antígenos sintéticos y recombinantes	73
Figura 27. ELISA de la proteína sintética 1 (P1S) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	74
Figura 28. ELISA de la proteína sintética 2 (P2S) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	75
Figura 29. ELISA de la proteína recombinante 3 soluble (P3RS (soluble)) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	76
Figura 30. ELISA de la proteína recombinante 3 insoluble (P3RI (insoluble)) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	77
Figura 31. ELISA de la proteína sintética 4 (P4S) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	78
Figura 32. ELISA de la proteína sintética 5 (P5RI (insoluble)) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	79
Figura 33. ELISA del antígeno vesicular (AgV) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.....	80
Figura 34. ELISA del antígeno HP10 para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias.	81
Figura 35. Comparativo de la curva ROC del antígeno P3RS contra la curva ROC del HP10.....	83

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana a través del tiempo</i>	18
<i>Tabla 2. Sensibilidad y especificidad del ensayo diagnóstico HP10</i>	27
<i>Tabla 3. Comparación entre métodos (secuenciación espectrometría de masas frente a predicción de secuencia de TS-LEP)</i>	68
<i>Tabla 4. Proteínas de secreción candidato</i>	70
<i>Tabla 5. Resumen de los parámetros obtenidos del análisis de las curvas ROC según cada uno de los antígenos de forma individual</i>	87
<i>Tabla A 1. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 1 (C1) que hacen match con el secretoma de Taenia solium</i>	105
<i>Tabla A 2. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 2 (C2) que hacen match con el secretoma de Taenia solium</i>	109
<i>Tabla A 3. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 3 (C3) que hacen match con el secretoma de Taenia solium</i>	113
<i>Tabla A 4. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 4 (C4) que hacen match con el secretoma de Taenia solium</i>	116
<i>Tabla A 5. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 5 (C5) que hacen match con el secretoma de Taenia solium</i>	119

RESUMEN

La neurocisticercosis (NC) es una enfermedad causada por el establecimiento de la larva de *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC) del humano. Al ser una patología endémica de nuestro país de importancia médica, un diagnóstico óptimo es de vital importancia. Sin embargo, su diagnóstico hasta el momento se encuentra envuelto en controversia debido al alto costo y difícil operatividad de las pruebas imagenológicas y la ausencia de pruebas serológicas altamente sensibles y específicas. Se sabe que el cisticerco secreta moléculas diversas entre las cuales podemos distinguir las proteínas de secreción (ESP).

Las proteínas ESP representan un interés particular para el diagnóstico de la NC. En este trabajo se tuvo como objetivo aislar, identificar y caracterizar las proteínas secretadas por los cisticercos de *Taenia solium*. Con el fin de diseñar un ensayo que nos permita aumentar la sensibilidad y especificidad del inmunodiagnóstico de la NC.

La identificación de ESP se realizó a través de proteómica y de bioinformática. Con la ayuda de ambas estrategias se identificó un set de proteínas de interés biológico. Se seleccionaron 5 ESP, de las cuales 2 fueron expresadas de forma recombinante en *Escherichia coli* (*E. coli*), mientras que las otras 3 fueron sintetizadas por *Apeptide*[®]; todas fueron evaluadas a través de un ELISA indirecto utilizando 283 LCR humanos. Encontramos que de las 5 proteínas seleccionadas tuvieron una sensibilidad y especificidad de P1S (Se: 83% y Es: 64%), P2S (Se:61% y Es:70%), P3RS (Se: 86% y Es: 79%), P3RI (Se: 75% y Es: 60%), P4S (Se: 72% y Es: 66%), P5RI (Se:73% y Es: 55%), AgV (Se: 78% y Es: 75%) y HP10 (Se: 77% y Es: 77%). Presentándose como la proteína más interesante la proteína 3 recombinante soluble (P3RS). La proteína P3RS fue usada en un ELISA indirecto para determinar los anticuerpos en el LCR de pacientes con NC. El análisis con una curva ROC del ensayo mostro una sensibilidad del 86%, una especificidad del 79% y un área bajo la curva (AUC) de 0.87. Esto nos indica que la prueba con la P3RS tiene una alta capacidad de discriminar entre positivos y negativos. Por lo que se concluye que la estrategia proteómica-bioinformática fue útil para identificar antígenos únicos de *T. solium* para diagnóstico de NC. Además, que las proteínas de secreción son candidatos excelentes para mejorar el diagnóstico de NC en humanos.

1 INTRODUCCIÓN

Taenia solium es el agente causal de la teniosis y la cisticercosis [1,2]. En el humano la teniosis es una parasitosis causada por la ingesta de carne infestada de cisticercos; que cursa como una parasitosis no grave, en la mayoría de los casos de forma asintomática sin daños importantes en la salud del hospedero [3,4].

Mientras que la cisticercosis se produce cuando el hospedador ingiere huevos de *Taenia solium* infectando tanto a cerdos como al ser humano. Esta infección representa un problema de salud pública debido al rezago de higiene y salubridad en las regiones rurales de México y otros países no desarrollados de América Latina, Asia y África donde la infección por *Taenia solium* es endémica [5–7].

El parásito se establece en diversos tejidos; entre ellos el músculo esquelético, la piel, los ojos, el corazón y el sistema nervioso central (SNC) [8,9]. Interesantemente, la expresión clínica está ligada con la distribución mundial de la enfermedad. Ya que en Asia es común la cisticercosis extraneural (muscular y subcutánea), mientras que para América lo habitual es la cisticercosis neural (encéfalo y SNC) [10–15].

Cuando el parásito se aloja en el sistema nervioso central de su hospedero provoca una patología potencialmente grave conocida como neurocisticercosis (NC), la cual causa efectos devastadores para la salud (Figura 1) (WHO et al 2017). Además de ser la afección neurológica parasitaria más común en el humano [16].

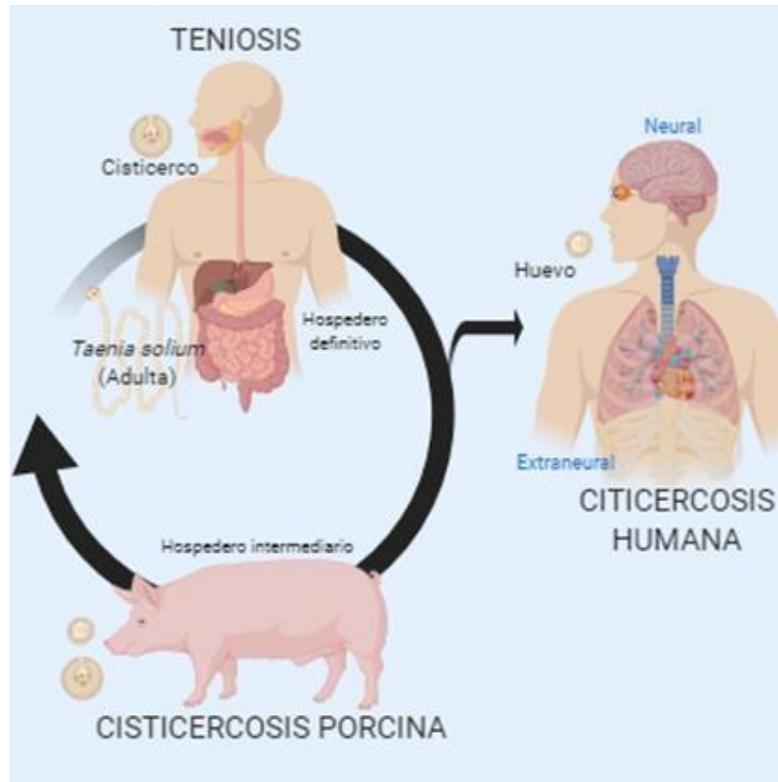


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (Figura creada por el autor, representativa de lo descrito por [17]).

1.1 Epidemiología

Las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs) son un grupo de patologías infecciosas (incluyendo la NC) que proliferan principalmente en las poblaciones más pobres del mundo [18]. Donde, la perpetuación del ciclo de transmisión del agente causal se da debido a la contaminación ambiental y el ambiente caluroso de los climas tropicales, así como las malas condiciones de vida e higiene exacerbadas por la pobreza [19]. Se calcula que existen 1.7 billones de personas con alguna enfermedad tropical desatendida (NTD) [20].

En los últimos años la migración masiva ha jugado un rol importante para la diseminación de estas patologías. Debido a que la población de los países endémicos migra a los países desarrollados y acarrean con ellos diversas parasitosis aumentando la proporción global [21].

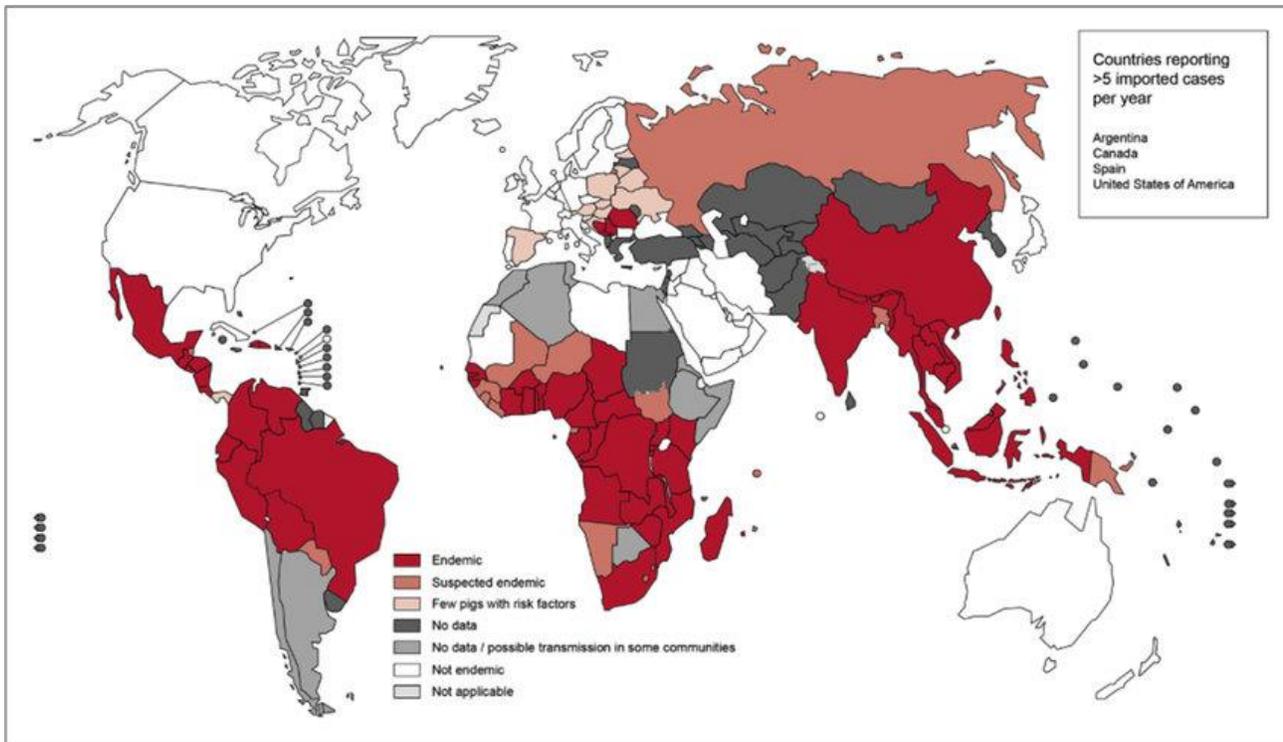
La cisticercosis fue clasificada en el 2010 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una NTD, se calcula que el 10% de los habitantes de las comunidades rurales de países

endémicos se encuentran infectados o han tenido contacto con el parásito [22], y se estima que se producen alrededor de 50,000 muertes cada año a causa de la NC en el mundo [23,24]. La OMS presentó en el 2016 la actualización del mapa de endemicidad de *Taenia solium* en el mundo. Donde, podemos observar que las tasas de prevalencia de NC varían entre los países endémicos (Figura 2).

La NC es responsable del 8% de las hospitalizaciones en centros de referencia nacional constituye la causa del 12% de las intervenciones de neurocirugía, del 20 al 25% de las craneotomías [25,26]. En estudios postmortem se observa una frecuencia entre el 3 y 4% de las necropsias en adultos y el 0.06% en niños [25]. Y la principal causa de consulta neurológica por epilepsia de inicio tardío. Además, se sabe que el 29% de todos los casos de epilepsia son a causa de la neurocisticercosis [27].

En México, se estima una tasa de prevalencia entre 3.7 a 12.2% [28] y entre el 9 al 10% de los habitantes de comunidades rurales del Estado de Morelos y Puebla son positivos para NC; la cual fue confirmada en estudios epidemiológicos basados en Tomografía axial computarizada (TAC) [29–31]. Sin embargo, los datos epidemiológicos confiables sobre la distribución geográfica de la cisticercosis en las personas y los cerdos siguen siendo escasos [32] (WHO et al., 2017).

Considerando los estudios seroepidemiológicos a nivel mundial estos se han realizado basados en la detección de captura de anticuerpos. Donde, podemos observar que los porcentajes de seroprevalencia en Bolivia son del 2 al 9% [33], de 5 a 11% en México [34,35] de 7 al 24% en Perú [36], de 10 a 17% en Guatemala [37,38] y 34% en Honduras [39]. Mientras que, en la detección de antígenos parasitarios la prevalencia de antígenos de *Taenia solium* en circulación es de 4.08 % en Ecuador y de 9.12% en Venezuela [40].



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2016. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 2. Mapa de endemicidad de *Taenia solium* en el mundo (Figura tomada de WHO) [41,42].

1.2 Patología

La Neurocisticercosis (NC) es la forma clínica más grave de la cisticercosis y la más difícil de diagnosticar [43,44]. Debido a que presenta una sintomatología heterogénea que varía dependiendo de la viabilidad, la ubicación y número de quistes, así como de la inflamación asociada del tejido cerebral [45,46].

Específicamente, la ubicación de las lesiones en el sistema nervioso central (SNC) está íntimamente ligada a la prognosis de la NC en el paciente. Así pues, el paciente normalmente tiene un pronóstico benigno si el cisticerco se ancla al parénquima o al espacio subaracnoideo de los surcos. Por el contrario, el pronóstico es poco alentador cuando el cisticerco se encuentra en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo o en los ventrículos. Donde, se ha observado que el tratamiento cisticida es menos efectivo, además de cursar frecuentemente con hipertensión intracraneal formando un cuadro clínico grave para el paciente [22].

Otro ejemplo de la importancia de la ubicación de las lesiones tiene que ver respecto a la

posibilidad de que el cisticerco provoque un foco epiléptico, asociado a la respuesta inflamatoria del hospedero en presencia del parásito. También se han asociado cambios a nivel celular y molecular en el encéfalo debido al desarrollo evolutivo del parásito [47]. Esta infección es una de las causas más frecuentes de trastornos convulsivos [7]. De acuerdo con los datos disponibles sobre la prevalencia de la epilepsia, se estima que entre 2,56 y 8,30 millones de personas padecen neurocisticercosis, sumando los casos sintomáticos y los asintomáticos [48].

1.3 Respuesta inmune

En la NC humana la respuesta inmunológica del hospedero durante la infección por *Taenia solium* pareciera estar asociada a la gravedad de la infección. Esto como resultado da una respuesta inflamatoria exacerbada tanto en periferia como a nivel central. Los pacientes han sido estratificados como leves, moderados o graves dependiendo de su respuesta inflamatoria [49,50].

En pacientes graves (sintomáticos) se ha descrito en sangre periférica niveles séricos aumentados de IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-23 y sICAM-1 con respecto a los controles y a individuos con NC asintomáticos [51]. Además, en pacientes graves con cisticercos vesiculares se observó un aumento de las citocinas TH1/TH2 (IL4, IL12, TNF, IFN, IL2 e IL18), mientras que en pacientes no graves con cisticercos calcificados se observaron niveles aumentados de las citocinas TH2 (IL4, IL5, e IL13) en células mononucleares (PBMC) específicamente estimuladas con antígenos de cisticerco [50].

Por otra parte, a nivel central, se observó que los pacientes con NC grave presentan valores más altos de proteínas, eosinófilos y de IL-1, IL-5, IL-6, IL-12 e IL-10 en pacientes sintomáticos (graves) con respecto a pacientes no graves y controles. Además de esto, se ha observado que pacientes con una respuesta inflamatoria exacerbada presentan hasta 6 veces más IL-10 con respecto a otras citocinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ e IL2). También, se han observado niveles aumentados de TGF- β , e inmunoglobulinas (tipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgE) cuando se compararon con los grupos de pacientes con NC leves y moderados [49,50,52]. Mientras que los pacientes con una forma leve o moderada de la enfermedad también presentan anticuerpos anti-cisticerco específicos de todas las subclases en sus sueros [52].

Interesantemente en pacientes con NC grave, se encontraron células T periféricas y centrales CD4 + CD25high / FoxP3+ (Tregs) capaces de producir IL-10 [51,52]. El aumento en Tregs centrales y periféricos se acompaña de una disminución en las células T activadas. Estos hallazgos sugieren que los cisticercos pueden modular la neuroinflamación en pacientes con NC grave a través de la participación de Tregs, probablemente por contacto célula a célula con células dendríticas y la liberación de IL-10 por Tr1 [51–53].

Además, también se ha descrito que el número de parásitos y los estadios del parásito están fuertemente relacionados con la gravedad [52]. Algunos estudios han detallado la respuesta inflamatoria local que rodea a los cisticercos cuando se encuentra en el cerebro humano, la cual se asocia con un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que permite la entrada en el sistema nervioso central de diferentes células periféricas [51].

En la etapa vesicular el cisticerco presenta una pared translúcida, el líquido de la vesícula es transparente y el escólex es viable e invaginado, la respuesta inflamatoria alrededor del quiste es escasa, compuesta principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos.

Mientras que, en la etapa coloidal cuando el parásito presenta signos de degeneración, se observa una pared gruesa, el líquido vesicular está turbio y el escólex empieza a degenerarse. El infiltrado inflamatorio es intenso con una respuesta natural killer (NK) predominante y abundancia de macrófagos y células T. Así como, una respuesta de anticuerpos IgM. Además de un aumento en las citocinas IL-2, IL-6, IL-12, TGF β e IFN α , mientras que IL-4 está ausente, mostrando el predominio de una respuesta inflamatoria Th1 [51].

En la etapa granular el escólex está totalmente degenerado, en el infiltrado inflamatorio alrededor del quiste las células plasmáticas, los linfocitos B y T, los macrófagos y mastocitos son los más abundantes. También, hay presencia de citocinas Th1 como IFN α , IL-18, las citocinas Th2 IL-4, IL-13 y las citocinas reguladoras TGF β e IL-10. En las etapas coloidales y granulares, se observó una notable proliferación de astrocitos, mientras que la microglía/macrófagos muestran una sobreexpresión de MHC-II y B7-2. Además, se observó en ambos estadios la expresión de las citocinas proinflamatorias IFN α e IL-18. Finalmente, en la calcificación el parásito se transforma en un nódulo grueso rodeado de una intensa proliferación de astrocitos. Así como, de la presencia de una proliferación microglial [51].

Así mismo, el aspecto de los cisticercos y la respuesta inmune también varían con respecto a la localización del parásito en el SNC [52,54].

Cuando los cisticercos se establecen en el parénquima preferentemente se localizan en la corteza cerebral y en los ganglios basales debido a la gran vascularidad de estas áreas. Además, tienden a ser pequeños ya que la presión que ejerce el parénquima cerebral impide su crecimiento, mientras que los cisticercos subaracnoideos (SA) que se localizan en la profundidad de los surcos corticales tienden a ser pequeños, a diferencia de los que se establecen a nivel de las cisternas de LCR en la base del cráneo, ya que estos pueden alcanzar tamaños mayores [55].

Se ha observado que los pacientes con cisticercos localizados en el espacio SA de los surcos o el parénquima tienen niveles más bajos de citocinas, la respuesta inflamatoria está limitada alrededor del cisticerco y en estos casos los datos de celularidad LCR no presentan variación significativa. Por lo tanto, el pronóstico para el paciente es generalmente benigno [51,52,54].

En contraste, aquellos que se establecen en los ventrículos usualmente son únicos y se localizan de preferencia en el IV ventrículo y su tamaño no tiene una tendencia establecida debido a que pueden estar adheridos a la capa endotelial o encontrarse flotando libremente en las cavidades ventriculares [55,56]. Lamentablemente, cuando los cisticercos se establecen en el espacio SA de la base o en los ventrículos la mayoría de los pacientes presenta una sintomatología severa y el pronóstico es poco alentador, debido a que se observa un aumento en los niveles de IL-5, de IL-6 e IL-10 del LCR, presentando una respuesta inmunoinflamatoria exacerbada [51,52,54]. Interesantemente, Chavarria 2005 describe que cuando el parásito se estableció en los ventrículos se observó que el parásito no presentaba ninguna evidencia radiológica de daño, lo cual sugiere que la respuesta inflamatoria no era efectiva, mientras que, en casos con parásitos establecidos en el espacio SA de los surcos o en el parénquima, estos aparecieron con frecuencia dañados, con baja inflamación del LCR [49].

En América latina es común que el cisticerco se instale en el SNC y/o globo ocular, considerados "sitios inmunológicamente privilegiados" [57,58]. Esto podría ser debido a que la respuesta inmunoinflamatoria se encuentra muy limitada en esas localizaciones. Un ejemplo de ello es la barrera hematoencefálica que protege al SNC [21]. Además, se podría explicar por las

características genéticas que se presentan en diferentes las etnias.

1.4 Diagnóstico

Actualmente, existen 3 estrategias para llegar al diagnóstico de la neurocisticercosis (NC) que son: diagnóstico clínico, neuroimagen y diagnóstico serológico. La necesidad de un diagnóstico específico y oportuno para la NC es primordial. Sin embargo, hasta el momento la selección del método diagnóstico no depende de su eficacia, si no del nivel socioeconómico del paciente, así como del método disponible en su localización geográfica. Actualmente, se hace uso de herramientas clínicas, de neuroimagen y serológicas para llegar al diagnóstico de la neurocisticercosis (NC).

El diagnóstico clínico es un apoyo ineludible para lograr el diagnóstico de cada uno de los pacientes. Recientemente fue publicada la actualización de las guías a seguir para optimizar el diagnóstico clínico de la NC. Las cuales, están basadas en las evidencias clínicas, información epidemiológica, de inmunodiagnóstico y de estudios de neuroimagen. Sin embargo, es importante tomar con precaución cada una de estas pautas y adaptarlas lo mejor posible al caso en específico que se esté evaluando [59].

En esta guía se describen los hallazgos que aumentan la probabilidad de un diagnóstico correcto. Entre ellas podemos encontrar a las convulsiones como la manifestación clínica más común, la presencia de un portador de *Taenia solium* en el entorno cercano del paciente, y la presencia de signos neurológicos focales e hipertensión intracraneal [60,61].

Con respecto a la neuroimagen cerebral esta se basa en la tomografía computarizada y/o resonancia magnética nuclear, hasta el momento están consideradas como las pruebas más sensibles y específicas para la NC [28]. Sin embargo, las imágenes en muchos casos no son del todo concluyentes sobre la etiología de los quistes en la NC, pudiendo pasar por alto algunas lesiones o bien generando confusiones. En particular, la tomografía axial computarizada puede pasar por alto pequeños quistes cerca de los huesos del cráneo o en la fosa posterior, mientras que la resonancia magnética nuclear es poco sensible a los quistes calcificados [45,62]. Esto aunado a que por la naturaleza de los focos endémicos esta clase de técnicas tan especializadas son poco accesibles a la mayoría de las zonas más necesitadas (en general rurales). Además,

debido a sus altos costos y difícil operabilidad dificultan enormemente su uso generalizado [28,63].

Por su parte, el diagnóstico serológico ha sido ampliamente desarrollado a través de los años por las grandes ventajas que representa con respecto a la neuroimagen cerebral. Ventajas tales como bajos costos, simplicidad de operación y fácil distribución en las zonas endémicas [45].

Sin embargo, por la misma naturaleza compleja de la NC la búsqueda de un método serológico óptimo ha sido ardua, pero no siempre con los resultados más alentadores. El inmunodiagnóstico presenta una amplia variabilidad con respecto a la sensibilidad y especificidad en cada uno de los ensayos propuestos, ya que depende directamente del antígeno que se utilice o del método de captura de anticuerpos. También, otros factores como la localización y el número de lesiones (quistes) afectan la sensibilidad y especificidad de técnica que sea utilizada [16]. Además, existen problemas de reacción cruzada con otras parasitosis, presentan falsos positivos con otros tenidos, presentan falsos negativos en muestras de pacientes que están por debajo de la sensibilidad de la prueba. Otros problemas relacionados incluyen la existencia de pacientes no respondedores y el uso de preparaciones de antígeno no representativas de todos los antígenos inmunogénicos que secreta el cisticerco [64].

En el diagnóstico serológico de la NC se distinguen dos tipos de procedimientos: el primero basado en la detección de anticuerpos y el segundo en la detección de antígenos propios del parásito como podemos observar en la tabla 1.

Tabla 1. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana a través del tiempo.

Año	Ensayo	Técnica	Muestra	Sensibilidad (Se) / Especificidad (Es)	Referencia
1980-1986	Antígeno B	EITB	Suero	50% de los pacientes no producen suficientes anticuerpos	[65,66]
1982	Extracto crudo del parásito	ELISA	Suero	79% Se	[67]
1986	Fluido vesicular del parásito	ELISA	Suero	95% Se 80-90% Es	[68]
1987	Anticuerpos monoclonales (MAbs)	ELISA	Suero	100% Se ND Es	[64]
1989-2007	HP10	Ag-ELISA	Suero	85% Se Sin embargo, el parámetro desciende al 65% en pacientes con un solo quiste	[69]
			LCR		[22]
1992	Extracto crudo (NovaTec)	Ab-ELISA	LCR	67% Se/ 65% Es	[70]
1995	Antígenos de cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i>	complement fixation	LCR	93% Se	[71]
		ELISA		99% Se	
		EITB		96% Se	
1989-2000	Glicoproteínas (several companies)	LLGP-EITB	Suero	73.7% Se / 92% Es 100% Se / 98% Es	[72,73]
1997	Extracto total (HA-Cc) y fluido vesicular (HA-Cl) de cisticerco de <i>Taenia solium</i>	hemaglutinación indirecta	LCR	85.4% Se HA-Cc 82.9% Se HA-Cl	[74]
1998	Antígenos de cisticerco de <i>Taenia solium</i> 10–26-kD	ELISA	Suero	ND	[75]
		EITB			
1999	Antígenos de 13, 17 y 26 kDa	ELISA	Suero	53%, 88% y 100% Es / Se ND	[76]
1999	Antígeno de 10 kDa	EITB	Suero	97% Se / 98% Es (NC activa)	[77]
				14% Se en pacientes crónicos	
1999	Antígenos de cisticerco de <i>Taenia solium</i>	ELISA	Suero	Solo 1 lesión 56.76% Se 48.64% Es	[78]

		EITB		Múltiples lesiones 80% Se 100% Es	
2001	Antígenos Heterólogos Anti-Ag T. solium (Tso) y T. crassiceps (Tcra)	ELISA (Captura de antígenos basados en el uso anticuerpos policlonales de conejo)	LCR	(Tso) 81.2% Se / 82% Es (Tcra) 90% Se / 98% Es (Tcra <30 kDa) 95.8% Se / 100% Es	[79]
2002	Antígeno B	ELISA	LCR	70% Se / 90% Es	[80]
2003	Familia de antígenos de 8-kDa de cisticercos de T. solium	ELISA	Suero	100% Se / ND Es	[81]
		Western blot		ND Se / 100% Es	
2004	Anti- Ag total de cisticerco	Aglutinación	Suero Orina	75% Se / 100% Es (Co-A)	[82]
	de Taenia solium	(Co-A)	Suero	62.5% Se / 100% Es (Co-A)	
		ELISA	Suero	62.5% Se / 96% Es (ELISA)	
2005	Péptidos de oncosfera	Ab-ELISA	Suero	85% Se / 83.5% Es	[83]
2005	Líquido vesicular de T. solium y T. crassiceps	ELISA	Suero	TsoVF-ELISA 91,3% Se / 96,2% Es	[84]
				TcraVF-ELISA 91,3% Se / 95% Es	
2005	oncosphere adhesion protein HP6	ELISA	Suero	77.4% Se / 80.6% Es	[83]
			LCR	76.9% Se / 73.1% Es	
2006	T24	EITB	Suero	94% Se / 98% Es	[85]
2007	Antígeno de T. solium	IFAT	Suero	85% Se / 94.9% Es	[86]
		ELISA		95% Se / 88.8% Es	
		WB		95% Se / 93.9% Es	
2009	E/S antígeno de 43kDa	EITB	Suero	88.23% Se / 100% Es	[44]
			LCR	89.28% Se	
2009	Antígenos de cisticerco 10-30 kDa	2D-PAGE EITB	Suero	100% Se / 92% Es	[87]
2011	Antígeno TsAg5 del cisticerco de T. solium	EITB	Suero	75.44% Se (múltiples cisticercos)	[88]
				39.62% Se (un solo cisticerco)	
				96.36% Se (NC extraparenquimal)	
				76.70% Es	

2012	Antígenos de cisticerco de <i>T. solium</i>	ELISA	Orina Suero	(Suero) 90% Se / 98% Es (Orina) 86% Se / 88% Es	[89]
2012	Antígeno recombinante Ts8B2 y péptido sintético Ts8B2-4 del cisticerco de <i>T. solium</i> .	ELISA	Suero	Ts8B2: 91.3% Se / 92.5% Es (NC activa) 68.6% / 92.5% (NC inactiva) Ts8B2-4: 21.7%/96.7% (NC activa) 13.7%/96.7% (NC inactiva)	[90]
2012	Antígeno recombinante Tsol-p27	Dot-blot ELISA EITB	Suero	86.7%/94.6% 86.7%/94.6% 76.4%/95.6%	[91]
2013	Fraciones antigénicas de metacestodo <i>T. saginata</i>	Ab-ELISA	Suero	Se 88.8% a 93.4% Es 93.7% a 92.6%	[92]
2013	Anti-Ag de E/S del cisticerco de <i>T. saginata</i>	ELISA	Suero	85.7% Se / 96.9% Es	[93]
2014	Antígenos somáticos y de E/S del cisticerco de <i>T. solium</i>	EITB	Suero LCR Orina	56.9% Se / 93.9% Es (Ag somático) 64.7% Se / 95.4% Es (Ag E/S) 78.6% Se / 95.2% Es (Ag somático) 67.8% Se / 97.6% Es (Ag E/S) 50% Se / 97% Es (Ag somático) 62.5% Se / 96% Es (Ag E/S)	[94]
2015	Antígenos de bajo peso molecular del cisticerco <i>T. solium</i>	ELISA	Suero LCR	25% Se / 100% Es (NC inactiva) 90.9% Se / 100% Es (NC activa) 25% Se / 95.8% Es (NC inactiva) 90.9% Se / 95.8% Es (NC activa)	[95]
2017	T24H	WB ELISA MBA	Sueros	100% Se / 99.4% Es 88.3% Se / 96.5% Es 96.1% Se / 96.5% Es	[96]

2018	secuencia de ADN ribosomal HDP2	cPCR and qPCR	Proglótidos y muestra fecal	ND	[97]
2019	NC41 Péptido sintético	ELISA	Sueros	Se 97.5% Es 97.5%	[98]
2019	La fasciclina TsMFas	EITB	Suero	Se 78,8% Es 93%	[84]
2019	la endofilina B1	EITB	Suero	Se79,7%	[84]
2019	HP10, NOVALISA y ELISA Ts.	ELISA	Sueros	Se 55,2%-81,0% Es 85,4%-97,1%	[100]

Diversos métodos inmunológicos han sido utilizados para el diagnóstico de la neurocisticercosis a través de los años. Se han desarrollado ensayos con el fin de detectar anticuerpos específicos anti-cisticerco en suero, saliva, orina y LCR. Utilizando para la captura de anticuerpos diversas técnicas inmunológicas, tales como la fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, radioinmunoensayo, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), EITB (enzyme-linked immunotransfer blotting), Aglutinación en látex, entre otros [45,101].

La detección de anticuerpos específicos permite la caracterización de la respuesta inmune hacia cisticercos. De hecho, se han observado anticuerpos específicos de todas las clases de inmunoglobulinas en el suero de pacientes con neurocisticercosis [101]. Uno de los primeros ensayos usó el denominado antígeno B o Paramiosina (AgB) purificado a partir de cisticercos de *T. solium*, el cual ha sido estudiado desde inicios de la década de los 80`S. Este AgB se asocia al colágeno y tiene la capacidad de fijar el factor C1q del complemento. Además, reorganiza las células circundantes al fenómeno inflamatorio alrededor del parásito. Debido a lo cual se le hipotetizó una función inmunoreguladora. En el diagnóstico se utilizó para detectar anticuerpos contra cisticercos en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis. Donde, se demostró la presencia de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) contra AgB en 8 de 11 muestras de suero y 11 de 13 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) extraídas de pacientes con neurocisticercosis [101]; presentando una sensibilidad de 80% en suero y del 90% en LCR con una especificidad del 96% y 98% respectivamente. Sin embargo, se ha demostrado que el AgB presenta reacción cruzada con hidatidosis [101,102].

Igualmente, la sensibilidad y especificidad dependen de la ubicación del parásito dentro del sistema nervioso, el número de lesiones y el grado de respuesta inmune del huésped [71].

Tsang y cols. en 1989 caracterizaron 7 glicoproteínas (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13) y diseñaron el ensayo diagnóstico para la cisticercosis humana utilizando la técnica EITB. Donde, se toma como positiva la prueba si cualquiera de los siete antígenos muestra reactividad con la muestra del paciente. Este ensayo mostró una sensibilidad en humanos del 98% y 100% de especificidad. Sin embargo, la sensibilidad es alta cuando el paciente presenta múltiples lesiones, y por el contrario se observa muy disminuida cuando el paciente presenta una lesión única [81].

Además, se ha comprobado que la banda de 50 kDa del EITB presenta reacción cruzada con otras parasitosis. También se demostró que no en todas las regiones endémicas presenta alta sensibilidad. Asimismo, debido a que detecta la presencia anticuerpos específicos, una muestra positiva podría estar simplemente indicando que el sujeto tuvo una exposición al parásito, y no necesariamente una infección por *Taenia solium* en proceso; provocando así altos índices de pruebas falsas positivas [103,104].

En 2009, Zimic y cols. utilizaron 2 antígenos (53/25 kDa) asociados a la catepsina presentes en el fluido vesicular de cisticerco para el diagnóstico de la cisticercosis. Los autores, reportaron que utilizando el método EITB se observó una especificidad de 98%. Pero en cuanto a sensibilidad observaron un 96% en pacientes con múltiples quistes, y un 78% en pacientes con un solo quiste. Por su parte, en el ensayo con ELISA este presentó una especificidad del 92,7% y sensibilidad de 98% para pacientes con múltiples quistes, y de 84% en pacientes con quiste único.

Otra valoración que se ha analizado es la correspondiente a la técnica más conveniente para el diagnóstico de la NC. Al comparar la utilidad de ELISA vs EITB se observó que ambos procedimientos utilizando antígenos totales producen resultados similares en cuanto a sensibilidad y especificidad [28,105]. Sin embargo, el ELISA es de fácil operalización y 10 veces más barato que el EITB [106].

Por otra parte, se han desarrollado diversos ensayos para la detección de antígenos circulantes parasitarios en sueros y LCR de pacientes NC. Estos ensayos permiten analizar la presencia del parásito, así como evaluar la eficacia del tratamiento y además correlacionar la cantidad de antígeno circulante con respecto a la cantidad de lesiones [107].

Por ejemplo, en 1987 Nascimento y cols. utilizaron ELISA para el diseño de su ensayo diagnóstico. Donde, ellos generaron anticuerpos monoclonales a partir de ratones inmunizados con el antígeno SPA (Scolex protein antigen) de *Taenia solium*, reportando el 100% de sensibilidad en las muestras positivas. Sin embargo, se observó una reacción cruzada. Mientras que, en 1997 Ferreira y cols. utilizaron la prueba de hemaglutinación indirecta en LCR reportando una sensibilidad del 84% en promedio, no mostrando datos de especificidad [74].

Cabe señalar que la sensibilidad y la especificidad en los ensayos de detección de antígenos son muy variables. Esto se debe en parte al origen del antígeno con el cual se diseñó el ensayo, siendo los extractos parasitarios purificados más sensibles con respecto a los antígenos parasitarios crudos, debido a que estos presentan reacción cruzada con determinantes antigénicos compartidos con otros helmintos [8,64,98].

Otra variable que considerar es el uso de suero o líquido cefalorraquídeo (LCR). Se ha descrito que los ensayos diagnósticos donde se utiliza el LCR presentan una sensibilidad del 90% ([108]), mientras que aquellos en los que se utiliza suero presentan una sensibilidad del 70% [108,109]. Esto podría ser debido a que el LCR se encuentra en contacto directo con los antígenos que secretan los parásitos.

En el año de 1986 Corona y cols. analizaron prospectivamente 51 casos de NC confirmados por neuroimagen y cirugía, con la prueba de ELISA para detectar anticuerpos en suero y LCR. Los autores encontraron una sensibilidad en suero del 87% y una especificidad del 90%, mientras que en LCR se encontró una sensibilidad del 87% con una especificidad del 100%. Sin embargo, cuando se realizó la comparación entre NC maligna y NC benigna, se observó que la sensibilidad en suero disminuye para el grupo benigno con respecto del maligno tanto en suero como en LCR [110].

Harrison y cols. en 1989 identificaron al antígeno HP10 en *Taenia saginata* y posteriormente en *Taenia solium*, con el diseñaron un ensayo diagnóstico por captura de antígeno utilizando el anticuerpo monoclonal HP10 [22,107,111,112]. El cual, presenta diferentes sensibilidades dependiendo si la infección fue detectada en LCR o Suero; así como si la infección es grave o leve. Teniendo en cuenta como "Grave" cuando el cisticerco se ha establecido en el espacio subaracnoideo de la base o en los ventrículos, y como "Leve" cuando

se establece en el parénquima y en el espacio subaracnoideode los surcos [22]. En la tabla 2 se pueden observar estas diferencias de una forma más explícita.

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad del ensayo diagnóstico HP10 (Tabla tomada de Fleury A, et al., 2007).

Prognosis	Muestra	Sensibilidad	Especificidad
Grave (Maligna)	Suero	84.8%	94%
	LCR	91.3%	
Leve (Benigna)	Suero	No detectado	ND
	LCR	Solo se detecta el 5% de los casos	ND

Como podemos observar, la sensibilidad de este ensayo está completamente ligada a la prognosis del paciente, la ubicación y número de cisticercos en el SNC. Donde, la sensibilidad desciende al 65% en pacientes con un solo quiste [8]. Además, en nuestro país la mayoría de los pacientes tienen un pronóstico benigno (infección leve). Por lo cual, este método diagnóstico no es el más útil en nuestro país.

Finalmente, el panorama en el inmunodiagnóstico de la NC necesita una prueba serológica altamente sensible y específica, así como capaz de discriminar las infecciones activas de las inactivas. Aunque, hasta este momento ese panorama está un tanto limitado, los avances en áreas como la genómica y biotecnología ayudarán a la obtención de este, lo cual significa el diagnóstico oportuno de la NC en las zonas endémicas.

1.5 Proteínas de secreción (ESP)

Las interacciones entre los organismos infecciosos y sus hospederos están mediadas en gran parte por las proteínas secretadas, conocidas colectivamente como “secretoma” [113]. El cual, se refiere al conjunto de proteínas que son excretadas/secretadas por una célula dada [114].

Los secretomas varían de tamaño entre cada organismo, pero se sabe que para los helmintos el tamaño promedio de su secretoma es de 7.1% con relación al del total de su proteoma [113]. Estos, han sido estudiados en diversos nematodos, trematodos y cestodos

durante los últimos 30 a 40 años [115]. La composición de un secretoma, así como su función varían dependiendo del medio ambiente y/o estilo de vida del hospedero, además de que se ha confirmado que la composición del secretoma es específica del estadio del parásito [115].

Dentro de las funciones de este secretoma está el servir como productos de desecho, adhesión, inhibidores de proteasas, citocinas, moléculas para evadir la respuesta inmune, así como promotores de la síntesis de nutrientes propios del hospedero para el parásito [113,114]. Dentro de los aspectos más estudiados está su caracterización funcional, sus propiedades inmunomoduladoras, su potencial como vacunas, así como su utilidad en el inmunodiagnóstico [115].

Se sabe que las proteínas de secreción (ESP) son sintetizadas en los ribosomas adheridos al retículo endoplásmico rugoso y son transportadas en vesículas a diferentes compartimentos celulares. Existen dos vías de secreción de proteínas descritas hasta el momento, la vía clásica y la vía no clásica. Estas se diferencian entre sí propiamente por el camino que recorre cada una de las proteínas desde su origen en los ribosomas.

En la vía clásica las moléculas sintetizadas en los ribosomas entran al retículo endoplásmico dependiendo del péptido señal específico de donde se lleva a cabo la traducción. Para después ser dirigida a la cara cis del aparato de Golgi. Donde, se llevan a cabo el resto de las modificaciones postraduccionales. Así mismo, las proteínas se clasifican y empaquetan para su liberación a través de vesículas las cuales se fusionan con la membrana plasmática [116] (Figura 3).

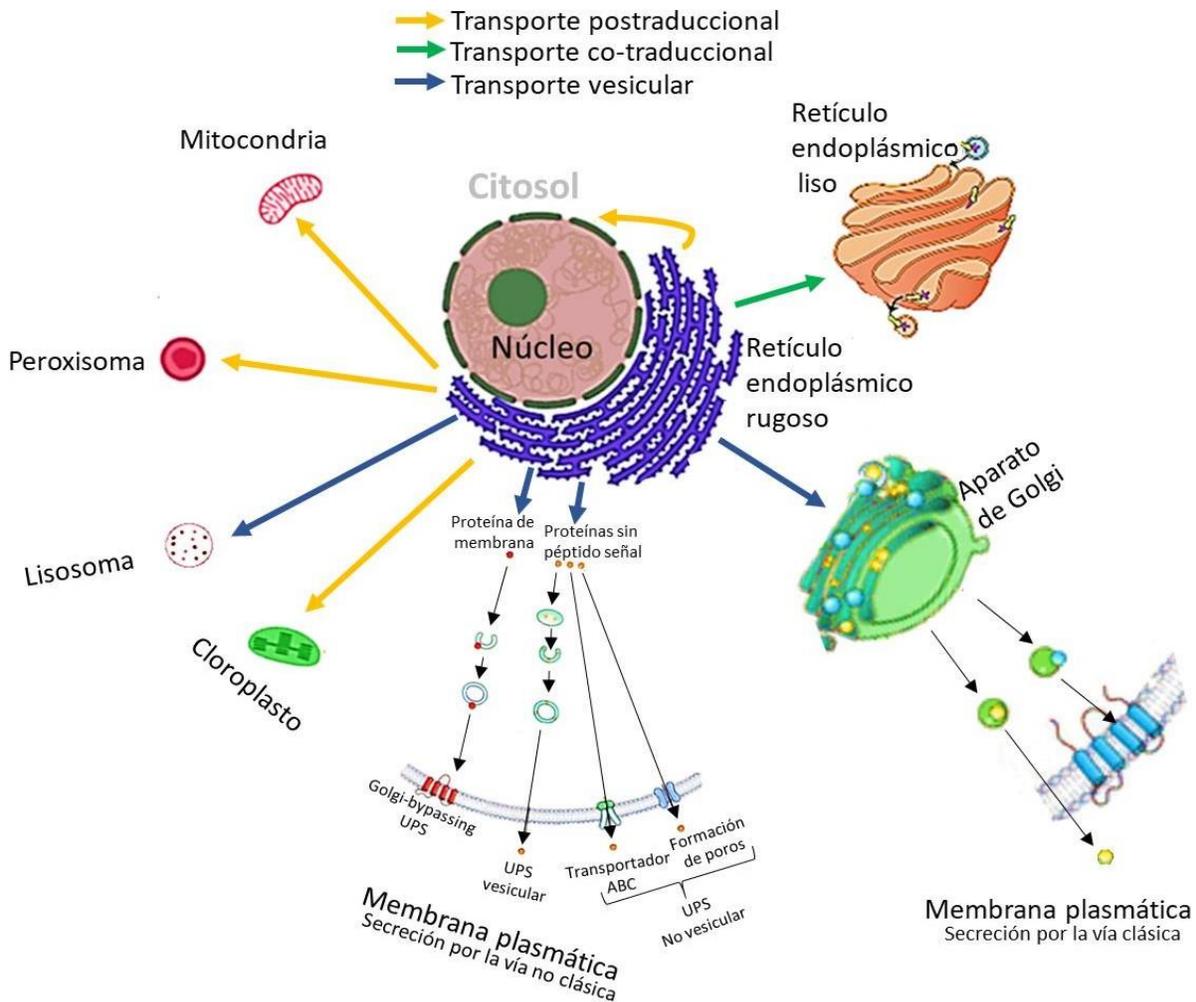


Figura 3. Secreción clásica y no clásica de proteínas (Figura creada por el autor, representativa de lo descrito por [117]).

Por otra parte, en 1990 se descubrió que un gran número de proteínas no utilizan el camino del retículo endoplásmico/aparato de Golgi, debido a la carencia del péptido señal, a lo cual se le nombró vía no clásica de secreción de proteínas. Aunque aún no se conoce en su totalidad el mecanismo de secreción de la vía no clásica, se sabe que la traducción de se lleva a cabo en el citosol. Además, se han identificado algunas moléculas que al parecer cumplen la función del péptido señal de la vía clásica. Un ejemplo de esto, son las proteínas GRASP (proteína asociada al aparato de Golgi en hongos) y Acb1 (en levaduras) ambas necesarias para la secreción no convencional de ACBP, haciendo uso de autofagosomas. Aunque en la literatura se ha descrito que la función de los autofagosomas es la degradación del contenido de vacuolas. Sin embargo, cuando el autofagosoma contiene GRASP o Acb1 este cambia su función a vesícula de transporte hacia la membrana para su posterior liberación [118].

Se sabe que muchas de las proteínas de secreción (ESP) de los parásitos desempeñan roles importantes, tales factores de virulencia o como la regulación inmune siendo la clave en la relación hospedero-parásito [119]. Donde, el parásito es capaz de modificar el entorno de su hospedero para controlar el reconocimiento inmune durante la infección con el fin de crear un ambiente propicio para su supervivencia [113,114].

De ahí la importancia de caracterizar las proteínas de secreción, siendo los análisis proteómicos una forma directa de realizarlo. Sin embargo, ahora las aproximaciones transcriptómicas han permitido la predicción bioinformática de las proteínas de secreción de diversas especies; haciendo uso de la presencia o ausencia de péptidos señal, dominios de secreción y transmembrana [119].

Las ESP representan moléculas atractivas para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico. Debido a que están implicadas en las manifestaciones clínicas de su hospedero, aunado a que son capaces de circular en el espacio extracelular de un organismo [114,115]. Por lo tanto, una considerable atención se ha volcado en ellas para ser usadas como biomarcadores que detectan la presencia del parásito y/o el estado de infección en diferentes enfermedades infecciosas [120–123].

1.6 Secretoma de *Taenia solium*

Con el fin de identificar targets terapéuticos útiles para la neurocisticercosis decidimos identificar las secuencias antigénicas del secretoma de *Taenia solium*, partiendo de la base de datos del genoma de *Taenia solium* (12.902 secuencias) el cual nos fue otorgado por parte del consorcio formado por investigadores de la UNAM antes de que este fuera publicado [123].

Inicialmente la base de datos fue curada con los algoritmos Signal P (versión 4.1) [125] y SecretomeP (versión 2.0) [126], usados para predecir proteínas de secreción. Todas las proteínas predichas como de secreción se agruparon en una nueva base de datos. La cual, fue analizada mediante el algoritmo TargetP [127] para predecir proteínas de localización subcelular mitocondrial; estas fueron descartados del conjunto de datos de proteínas de secreción. Finalmente, el conjunto de datos de proteínas de secreción fue analizado para predecir la presencia de hélices transmembranales por TMHMM (versión 2.0) [128]. Aquellas que mostraron hélices transmembranales fueron excluidas del set de datos final (Figura 4).

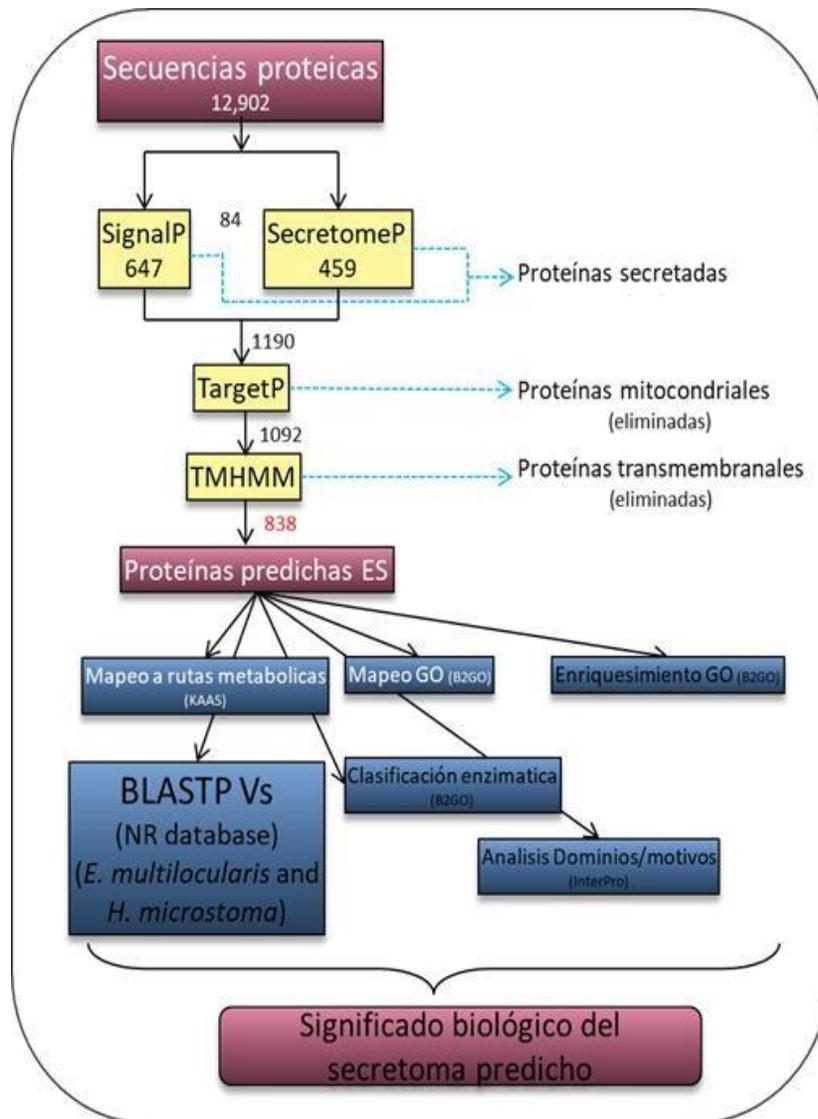


Figura 4. Predicción de las proteínas ESP del genoma de *Taenia solium* (Figura del autor, tomada de [114]).

Para la identificación de proteínas homólogas, las proteínas ESP fueron analizadas por BLAST contra la base de datos no redundante (nr) de NCBI utilizando el paquete Blast2GO [129]. Además, con el fin de buscar secuencias similares entre el secretoma predicho de *Taenia solium* (838 proteínas ESP), el genoma de *Hymenolepis microstoma* (Familia:Hymenolepididae) y *Echinococcus multilocularis* (Familia: Taeniidae) se realizó un análisis por BLAST (E-valor de corte se fijó en 1.0E-3) para obtener el secretoma único de *Taenia solium* (Figura 5). Finalmente, el consorcio del Genoma de *Taenia solium* nos dio acceso a la base de datos de proteínas con soporte de RNA (datos no publicados). Gracias a esto, sabemos que 48 de las 121 proteínas del secretoma único de *Taenia solium* cuentan con soporte de RNA.

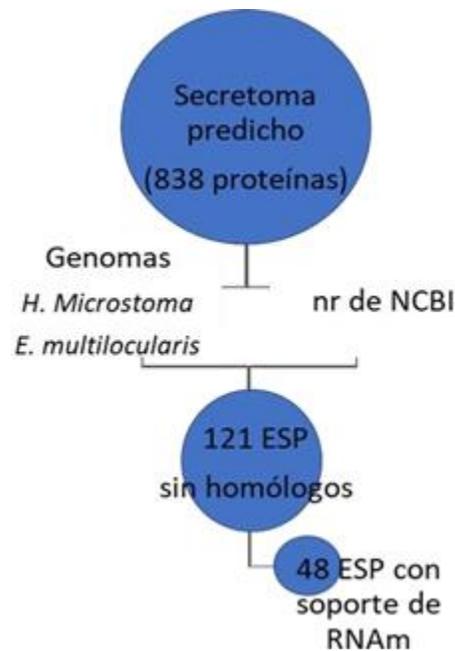


Figura 5. Obtención del secretoma único de *Taenia solium* (Figura del autor, tomada de [114]).

1.7 Abundancia de regiones antigénicas (AAR)

El número de regiones antigénicas se calculó utilizando el método de Kolaskar y Tongaonkar para cada proteína [130]. Este método se basa en diversas propiedades fisicoquímicas de los epítopos determinados experimentales para predecir determinantes antigénicos. La abundancia de regiones antigénicas (AAR) se calculó de la siguiente forma (Figura 6).

$$xP = \frac{Lp}{Ap}$$

Figura 6. Fórmula para la obtención de la abundancia de regiones antigénicas (AAR). Donde xP : es la abundancia de regiones antigénicas de la proteína p , Lp : es el largo de la secuencia de la proteína p , Ap : es el número de regiones antigénicas de la p

El valor AAR se introdujo para definir el número de aminoácidos entre las regiones antigénicas para cada proteína. Este valor se obtuvo como la relación entre la longitud de la secuencia y el número de regiones antigénicas predichas para cada proteína. Por lo tanto, el valor final determina el número de aminoácidos promedio que se necesitan para encontrar una región antigénica en la secuencia correspondiente.

Finalmente, los antecedentes anteriores nos llevaron a formar una estrategia con un enfoque bioinformático basado en datos experimentales proteómicos, a través de la interrelación de novedosas técnicas. Permitiéndonos identificar proteínas conservadas y diferenciales del secretoma de *Taenia solium*, además de elucidar sus funciones y haciendo posible el diseño de un método diagnóstico útil para la neurocisticercosis.

2 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La NC es causada por el establecimiento del cisticerco de *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC) en el humano. Las manifestaciones neurológicas de esta enfermedad pueden llegar a ser muy graves, tales como hipertensión intracraneal e incluso la muerte. El diagnóstico de la NC se basa principalmente en criterios clínicos, técnicas de neuroimagen e inmunodiagnóstico.

A través de los años, diferentes enfoques se han utilizado para establecer un diagnóstico oportuno. Sin embargo, no siempre con los mejores resultados. Por ejemplo, en el diagnóstico clínico aún presenta limitaciones debido a su poca especificidad. Mientras que el uso del diagnóstico radiológico se encuentra limitado en los focos endémicos debido a sus altos costos y difícil operabilidad.

Debido a lo anterior este proyecto pretende identificar y caracterizar el secretoma experimental de los cisticercos de *Taenia solium* provenientes de cerdos hembra infectados naturalmente en el foco endémico del estado de Guerrero, México. Con el fin de identificar proteínas de secreción candidatas para la optimización del inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis humana. A través, del uso de herramientas propias de la bioinformática y la proteómica. Para finalmente, generar una prueba diagnóstica útil, de alta especificidad y sensibilidad de bajo costo. Que permita su fácil distribución en las zonas endémicas de NC.

3 HIPÓTESIS

Las proteínas antigénicas de secreción permitirán el desarrollo de una prueba diagnóstica útil para la neurocisticercosis humana, sensible y de alta especificidad.

4 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de inmunodiagnóstico de alta sensibilidad y especificidad para neurocisticercosis humana empleando antígenos de secreción de *Taenia solium* recombinantes y sintéticos, identificados por proteómica y bioinformática.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y caracterizar el secretoma de los cisticercos de *Taenia solium* provenientes de estado de Guerrero, México. a través de su resolución en geles bidimensionales.
- Identificar proteínas de secreción antigénicas útiles para el diagnóstico a través del uso de proteómica y algoritmos bioinformáticos.
- Clonar y expresar proteínas de secreción para su producción como proteínas recombinantes.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de las proteínas recombinantes y sintéticas en

placas de ELISA con LCR de pacientes con neurocisticercosis a través del uso de curvas ROC.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

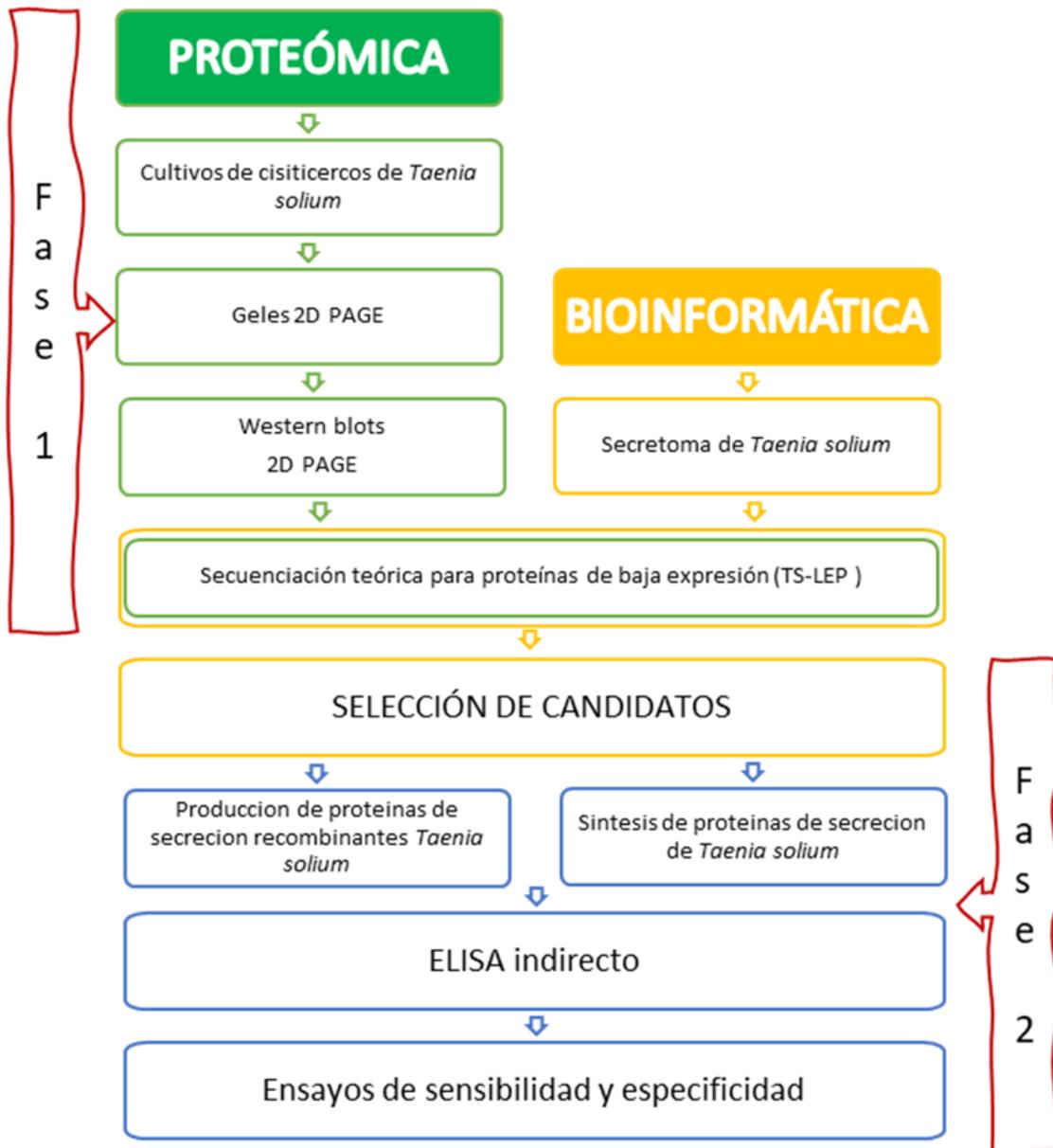


Figura 7. Plan de trabajo.

6.1 Identificación de las proteínas de secreción

Teniendo como objetivo el desarrollo de un método diagnóstico basado en el uso de proteínas de secreción del cisticerco de *Taenia solium*, se planteó una estrategia que hace uso de potentes herramientas ampliamente utilizadas en la proteómica y la bioinformática (Figura 7). En la primera fase del plan de trabajo el objetivo fue la predicción de las secuencias de las proteínas pertenecientes al proteoma de los cisticercos de *Taenia solium* (Geles 2D PAGE). Para lo cual, se realizó el cultivo de cisticercos de *Taenia solium*, posteriormente realizamos geles bidimensionales de los sobrenadantes de cultivo de cisticercos, y a la par realizamos Western Blots bidimensionales (WB 2D PAGE) de todas las muestras. Los datos obtenidos de esta estrategia en conjunto con la base de datos del secretoma de *Taenia solium*, fueron utilizados para predecir la secuencia de estas proteínas mediante el método de secuenciación teórica (TS-LEP), método que desarrollamos en esta tesis con el fin de dotar de una secuencia y un nombre a proteínas de baja expresión.

En la segunda fase del plan de trabajo se utilizó la base de datos de proteínas a las cuales se les asignó una secuencia y nombre mediante el método TS-LEP. las cuales, fueron analizadas a través de bioinformática en cuanto a su antigenicidad y su inmunogenicidad con el fin de identificar candidatos viables para el desarrollo de un método diagnóstico útil para la neurocisticercosis. Una vez que fueron identificadas las proteínas candidatas, estas fueron sintetizadas o producidas de forma recombinante según las características de cada una de ellas, y realizamos ensayos de ELISA indirecto con un banco de LCR de pacientes y sujetos sanos. para finalmente realizar ensayos de sensibilidad y especificidad.

6.1.1 Cultivo de cisticercos

Fueron diseccionados 900 cisticercos en cada uno de los cerdos infectados, los cuales fueron cultivados en 900 ml de medio RPMI 1640 (Gibco cat. 11875) suplementado con 10% de FCS (cat 10438-034, Gibco) y antibióticos Pen-strep (Gibco cat.15140) durante 3 días a 37°C en 5% CO₂ El medio se reemplazó cada 24 horas para eliminar los componentes del huésped. El día 4, el medio fue cambiado por medio DMEM (Gibco cat.31053) suplementado con L-glutamina (Gibco cat.25030) y antibióticos (Gibco cat.15140). El medio se recogió cada 48 horas y se añadió un nuevo medio DMEM. El cultivo se mantuvo hasta el día 20 a 37°C en 5% de CO₂

(todos los reactivos se compraron de Life Technologies/Gibco), con el fin de obtener los productos de secreción y excreción del sobrenadante este se colectó y se centrifugo 1200 rpm 10 min. El sobrenadante se dializó contra agua de destilación usando una membrana Spectra3 con un tamaño de poro de 3,5 kDa (cat. 132725 Spectra/Por®). La muestra se liofilizó y el polvo se reconstituyó con agua destilada sin DNAsas/RNAsas (cat. 10977-015, UltraPure™, Invitrogen). La concentración de proteína se determinó mediante el kit 2-D Quant (cat. 80-6483-56, GE Healthcare).

6.1.2 Geles bidimensionales

Utilizando la técnica de electroforesis bidimensional se analizaron los proteomas de 5 cultivos de cisticerco de *Taenia solium* (900 parásitos) de cerdos hembra infectados naturalmente en la zona endémica de Guerrero, México. La muestra se desaló con columnas Illustra NAP 5 (cat. 17-0853-02, GE healthcare), las proteínas se concentraron por liofilización (labconco) y se precipitaron por el método TCA-DOC-ACETONA.

- **Rehidratación de tiras IPG**

Cada pellet se resuspendió en 130µl de buffer de rehidratación (urea 8 M, CHAPS al 2%), 1.5 µL de DTT 50X y 1.5 µL de anfolitas, se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación constante. Posteriormente, se rehidrató cada tira IPG Immobiline DryStrip pH 3-10, Tiras de gradiente lineal de 7 cm (cat.17-6001-11, GE Healthcare) con 125 µL de buffer de rehidratación/muestra durante 16 h en el recipiente de rehidratación cubriendo con aceite mineral (1500 µL) para evitar desecación.

- **1ra dimensión (IEF)**

Una vez rehidratadas las tiras, se colocaron en el manifold cuidando la orientación de la tira (el lado ácido (+) hacia el ánodo -arriba-); Se preparó el equipo de IEF IPGphor III a 20°C, el manifold se recubrió con aceite mineral (aproximadamente 110mL). Los wickpads se humedecieron con 150µl de agua milliQ quitando ligeramente el exceso de agua cuidando no secarlos y se colocaron sobre cada extremo de la tira, tocando aproximadamente 0.5cm del gel.

Finalmente, se colocaron los electrodos sobre los pads de manera que se asegure el contacto entre ellos y con la plataforma de corriente. En el sistema de enfoque isoeléctrico

Ettan™ IPGphor™ 3 (cat. 11-0033-64, GE Healthcare). Una vez focalizadas las tiras se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

El IPGphor se corrió con el siguiente programa:

Por pasos	100 V	150 V/h
Por pasos	300 V	200 V/h
Por gradiente	1000 V	300 V/h
Por gradiente	5000 V	4500 V/h
Por pasos	500 V	2000 V/h

- **2da dimensión (2D PAGE)**

Las tiras almacenadas a -80°C se equilibraron con buffer de equilibrio (SDS al 2%, Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30%, azul de bromofenol al 0,002% y DTT al 0,5%), a cada tira de 7 cm se le agregó 1 mL de buffer de equilibrio durante 10 min a temperatura ambiente en agitación constante, repitiendo la operación en dos ocasiones. Se prepararon con anterioridad geles de 10 x 12 cm con un espesor de 1.5 mm.

El gel separador se preparó a una concentración de acrilamida (BioRad) de 15% y el gel concentrador al 4.5%. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Con ayuda de unas pinzas, espátula y tijeras, se acomodó la tira ya equilibrada dentro del pozo en el gel, teniendo siempre en cuenta la carga de la tira y que el plástico de la tira quede en contacto con el vidrio. El gel se corrió en la cámara fría (4 °C) a 80 V hasta que superó el límite del gel concentrador. Posteriormente, se eleva el voltaje a 150 V, hasta el final del gel.

Todas las muestras se corrieron por triplicado. De los cuales, un gel se tiñe con Bio-Safe Coomassie Stain (BioRad Cat. 161-0786).

6.2 Western Blots de antígenos de secreción de *Taenia solium*.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de Fluoruro de Polivinilideno con un

tamaño de poro de 0.2 μm (Immun-Blot PVDF, BioRad) mediante transferencia semiseca utilizando el equipo Trans-Blot Turbo system (BioRad). La membrana se activó con metanol durante 15 seg y enseguida se enjuago con agua milliQ durante 2 min, y se dejó en incubación por 5 min con TBS 1X (100mM Cloruro de sodio, 50nM Tris, pH 7.2 at +25°C). Posteriormente se colocó en el Trans-Blot evitando la formación de burbujas, se dejó transfiriendo a temperatura ambiente durante 1h a 23V. Posteriormente, la membrana se bloqueó con TBS 1X-BSA 5% durante 1h en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario en dilución 1/1000- TBST 0.05% (pool sueros de pacientes cisticercosos para los Western Blot positivos y pool de sueros de sujetos sanos como control negativo) durante 2 h con agitación constante. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a Peroxidasa HRP-Goat Anti-Human IgG (H+L) Conjugate (ZyMax Grade) (Invitrogen) en dilución 1/50000-TBST 0.05% durante 2 h con agitación constante. Finalmente, se reveló con Ortocloronafthol.

6.3 Predicción de proteínas sin secuenciación

Se realizaron geles bidimensionales (2D PAGE) de sobrenadantes de cultivo de cisticercos de *Taenia solium*, y a la par se realizaron Western Blots bidimensionales para cada uno de los cultivos. El objetivo era identificar el proteoma de los cisticercos y a su vez encontrar a las proteínas más antigénicas. Esto con la finalidad de encontrar proteínas candidatas para el desarrollo de un método diagnóstico útil para la Neurocisticercosis (NC). Sin embargo, cuando enviamos a secuenciación por espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS) los geles bidimensionales de cada muestra, no fue posible identificar las secuencias de la mayoría de los spots. Esto debido a que la concentración de proteína en cada spot era insuficiente para resolverse adecuadamente en ESI-MS/MS. Se intentó enriquecer la muestra, pero aun así no fue suficiente. Por lo tanto, se ideó un método que nos permitiera identificar la secuencia de las proteínas de baja expresión.

Contábamos con la base de datos del secretoma de *Taenia solium*, esto como resultado de mi tesis de maestría, donde publicamos en secretoma del cisticerco de *Taenia solium*. Y a su vez teníamos los geles 2D PAGE de 5 cultivos de cisticercos, así como los WB 2D PAGE correspondientes a cada uno de esos cultivos.

Como premisa, sabíamos que todos los spots que se habían resuelto en el 2D PAGE

deberían estar contenidos dentro del secretoma de *Taenia solium* que habíamos descrito en un trabajo previo. Para el cual contamos con el genoma de *Taenia solium*.

Buscando cómo correlacionar ambas bases de datos nos dimos cuenta de que en ambos sets contábamos con los datos de punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (PM). En el caso de los geles 2D PAGE estos datos se obtuvieron con el análisis de estos a través del software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 por GE Healthcare. Mientras que para los datos de PI y PM del secretoma de *Taenia solium* habían sido obtenidos directamente del genoma de *Taenia solium*.

Se sabe que todas las proteínas cuentan con datos de PI y PM específicos para cada una de ellas. Por lo tanto, estos fueron los datos ideales para la correlación entre ambos sets de datos.

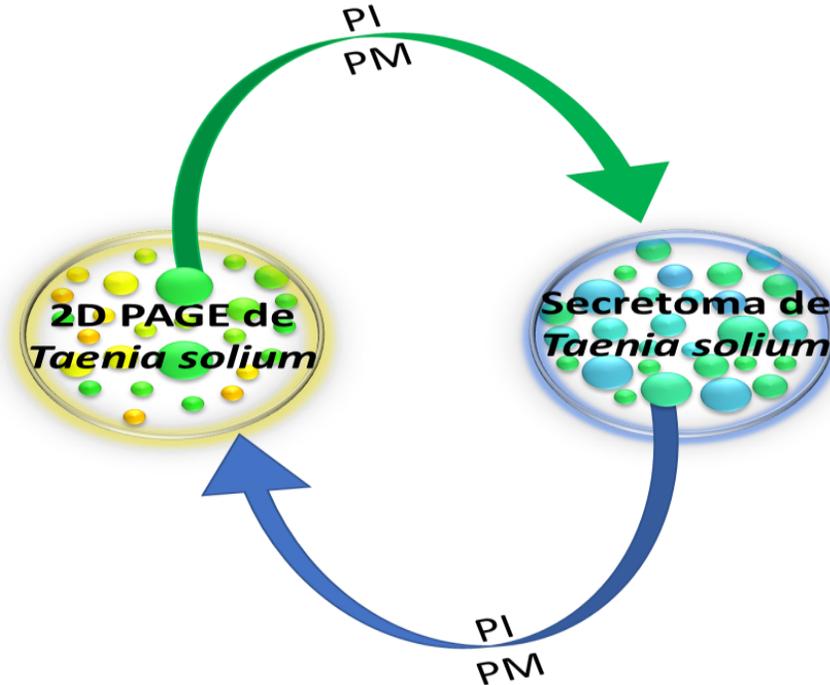


Figura 8. Identificación de proteínas de baja expresión provenientes de una fuente biológica compleja (TS-LFP).

Se analizaron una a una cada una de las proteínas buscando que los PI y PM coincidieran entre las proteínas de ambos sets de datos, este análisis se realizó tal como se muestra en la figura 8, realizando la búsqueda en ambos sentidos en las bases de datos.

Posteriormente, ya analizadas todas las proteínas de cada set en ambos sentidos, iniciamos la caracterización antigénica de las proteínas de secreción.

6.3.1 Algoritmos bioinformáticos

- **SignalP**

Predice la presencia de péptidos señal y la ubicación de sus sitios de escisión en proteínas de Archaea, bacterias Grampositivas, Bacterias Gramnegativas y Eucaria. Se basa en una profunda co-evolutiva y recurrente arquitectura de red neuronal que incluye un campo aleatorio condicional [131].

- **SecretomeP**

Predice la secreción de proteínas no clásicas, no activada por un péptido señal. El método consulta una gran cantidad de otros servidores de predicción para obtener información sobre varios aspectos postraduccionales y de localización de la proteína, que se integran en la predicción final de secreción [126].

6.4 Análisis de antigenicidad

Con el fin de identificar proteínas candidato para el desarrollo de un ensayo serológico útil para la neurocisticercosis, las proteínas de nuestro set de datos de los geles 2D PAGE y el secretoma único de *Taenia solium* fueron analizadas con la finalidad de predecir regiones antigénicas.

6.4.1 Algoritmos bioinformáticos de predicción antigénica

- **Antigenic propensity**

Método semiempírico que hace uso de propiedades fisicoquímicas de los residuos de aminoácidos y sus frecuencias de ocurrencia en los epítopes segmentarios conocidos. Se desarrolló para predecir antígenos determinantes de las proteínas. La aplicación de este método a un gran número de proteínas ha demostrado que este método puede predecir determinantes antigénicos con aproximadamente el 75% de precisión [130].

- **BepiPred**

Servidor web para predecir epítomos de células B a partir de secuencias de antígenos. BepiPred-2.0 se basa en un algoritmo forestal aleatorio entrenado (random forest algorithm

trained) en epítomos anotados, a partir de estructuras de proteínas antígeno-anticuerpo [132].

- **Cbtope**

Predice los epítomos conformacionales de células B en un antígeno a partir de su secuencia de aminoácidos. Utilizando la composición de aminoácidos como una característica de entrada para la máquina de vectores de soporte (SVM), desarrollaron un modelo con una precisión de predicción de más del 85% [133].

- **SVMTriP**

Método para predecir epítomos antigénicos lineales, La máquina de vectores de soporte se ha utilizado combinando la similitud de Tripéptido y puntuaciones de propensión (SVMTriP). Alcanza una sensibilidad del 80.1% y una precisión del 55.2% con una validación cruzada de cinco veces [134].

6.5 Producción de proteínas de secreción recombinantes

Se seleccionaron las proteínas candidatas con una alta antigenicidad para su expresión como proteínas recombinantes. La proteína 3_pJET1.2blunt y la proteína 5_pJET1.2blunt

6.5.1 Subclonación

Se llevó a cabo la transformación mediante electroporación de 3_pJET1.2blunt y 5_pJET1.2blunt a células competentes de *E. coli*, donde alícuotas de 1µl de mezcla de ligación fueron mezcladas con 50µl de células electrocompetentes. El electroporador GenePulser fue ajustado al voltaje 1.8 kV y se utilizaron cubetas de electroporación (Gene Pulser®/MicroPulser™ Electroporation Cuvettes BioRad 0.1 cm gap). Se observaron constantes de tiempo de entre 4.6 a 4.8 msec. Después del pulso se dejó reposar las células en 1ml de medio SOC a 37°C con agitación constante (250 rpm) durante 1 hora. Finalmente, se plaquearon 200µl en placas de LB-ampicilina (100 µg / ml), y se incubaron a 37 ° C durante la noche.

6.5.1.1 Vectores

- **pUC57 (GenScript)**

El plásmido de clonación pUC57, tiene 2710 pb de longitud, con un marcador de resistencia a la ampicilina; es un derivado del vector pUC19. El MCS de pUC57 contiene 6 sitios

de restricción con protuberantes extremos 3', que son resistentes a la exonucleasa III de *E. coli*. Este vector está diseñado para la clonación y la generación de deleciones de ExoIII. La replicación del ADN inicia en la posición 890 (+/- 1) y continúa en la dirección indicada. Los nucleótidos del gen bla 2510-2442 (cadena complementaria) codifican un único péptido (Figura 9).

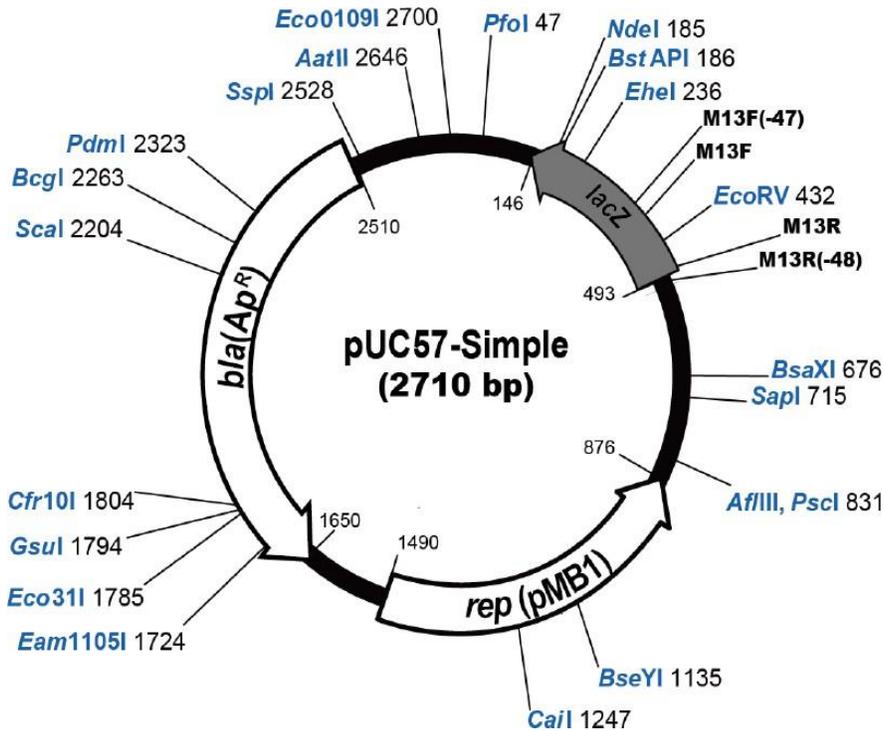


Figura 9. Mapa del Vector pUC57, genescript (imagen tomada del inserto).

- **pJET 1.2 blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific)**

Vector de clonación de selección positiva que contiene un gen enzimas de restricción letal que se inactiva al insertarse el ADN en el sitio de clonación. Como resultado, sólo las células bacterianas con plásmidos recombinantes pueden formar colonias. Las moléculas del vector pJET1.2/blunt que no disponen de insertos expresan una enzima de restricción letal, que mata la célula de *E. coli* huésped después de la transformación. El sitio de clonación múltiple del vector de clonación pJET1.2/blunt contiene dos secuencias de reconocimiento BglIII que flanquean el sitio de inserción. Además, el vector contiene un promotor T7 para las transcripciones in vitro e in vivo, así como para la secuenciación del inserto (Figura 10).

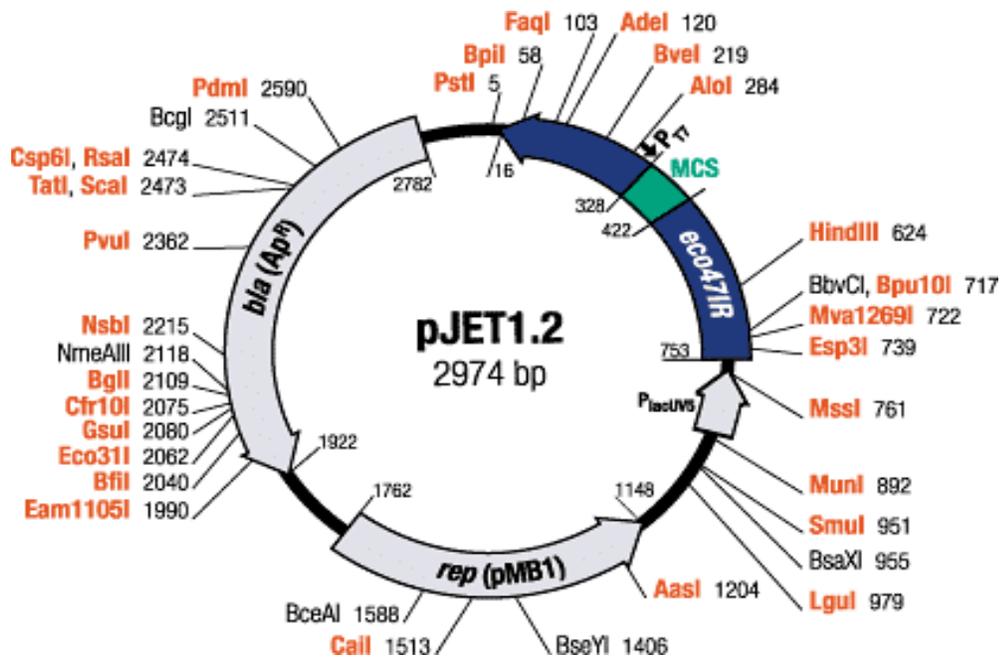


Figura 10. Mapa del Vector pJet1.2/blunt, Thermo Scientific CloneJet (imagen tomada del inserto).

6.5.1.2 Cepas bacterianas

- ***E. coli* XL1-Blue MRF** (Genotipo Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacIq Z Δ M15Tn10 (tetr)]): La cepa XL1-Blue permite el cribado de color azul-blanco para plásmidos recombinantes mediante el gen lacIqZ Δ M15 en el episoma F' permitiendo la selección de clones recombinantes mediante la detección de la actividad de la β -galactosidasa, es una cepa de alta eficiencia hospedadora excelente para aplicaciones de clonación de rutina que usan vectores plasmídicos o lambda. Son resistentes

a tetraciclina. Además, de ser deficientes en endonucleasa (endA), lo que mejora en gran medida la calidad del ADN del miniprep. Son deficientes en recombinación (recA), mejorando la estabilidad de la inserción. La mutación hsdR evita la escisión del ADN clonado por el sistema de endonucleasa EcoK.

- **ROSETTA II** (Genotipo F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)): Rosetta™ 2(DE3) Competent Cells: Son derivados de BL21 diseñados para potenciar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente utilizados en *E. coli*. Estas cepas suministran ARNt para 7 codones raros (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC y CGG) en un plásmido compatible resistente al cloranfenicol. Los genes tRNA son impulsados por sus promotores nativos. Las cepas de expresión de T7 son lisógenos del bacteriófago DE3, como se indica mediante(DE3). Estos hospedadores portan una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5. Tales cepas son adecuadas para la producción de proteína a partir de genes diana clonados en vectores de expresión de T7 apropiados, usando isopropil 1- tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) como inductor.
- **C41** (Genotipo F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)): La cepa C41 (DE3) se derivó de BL21 (DE3) [*E. coli* F ompT hsdS B (rB-m B-) gal dcm (DE3)]: Esta cepa tiene al menos una mutación no caracterizada que previene la muerte celular asociada con la expresión de muchas proteínas recombinantes tóxicas. Eficaz para la expresión de proteínas tóxicas y de membrana de todas las clases de organismos, incluidos virus, eubacterias, arqueas, levaduras, plantas, insectos y mamíferos. Acarrea el lysogen Lambda DE3, que expresa la ARN polimerasa T7 del promotor lacUV5 por inducción de isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG). Estas células pueden usarse para expresar cualquier gen clonado en un plásmido que contenga el promotor T7.

6.5.2 Inducción de la expresión de proteínas mediante isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)

Se realizó una curva de crecimiento para ambas proteínas. Con el fin de estandarizar los tiempos de inducción y cosecha (Figura 11). Como se puede observar en ambas proteínas a las

3h alcanzaron la fase exponencial y fue en ese momento donde se añadió el IPTG. Mientras que, a las 6 horas el cultivo entraba en fase estacionaria y fue ahí donde realizamos la cosecha.

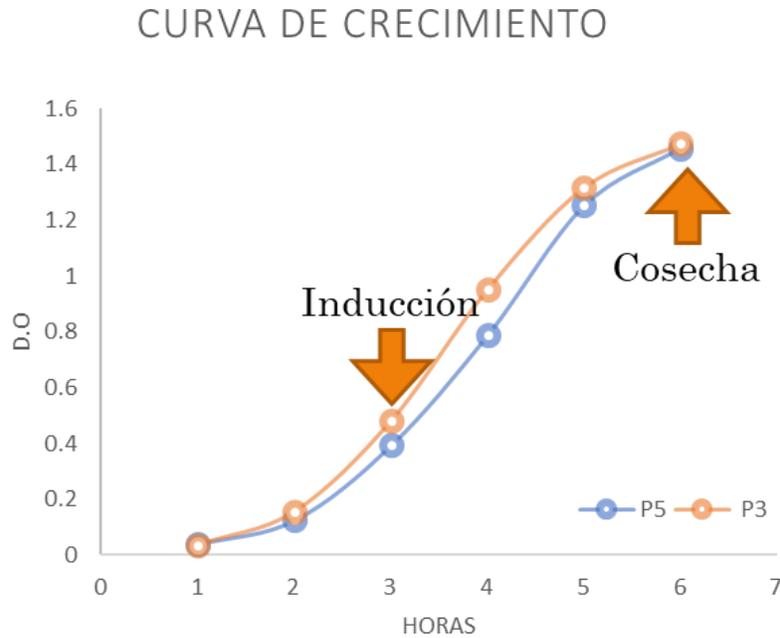


Figura 11. Curva de crecimiento de las proteínas 3 y 5 a 37° C.

Se realizó la inducción de la producción de la proteína 3_pJET1.2blunt bajo dos condiciones de temperatura: a 37° C donde la proteína forma cuerpos de inclusión y a 16° C donde la proteína se produce de forma soluble. Mientras que para la proteína 5_pJET1.2blunt se realizó la inducción a 37° C.

6.5.2.1 Inducción con isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)

Las células se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de cloruro sódico), bajo selección de ampicilina (100 µg / ml) a 37°C o 16° C con agitación constante (200 rpm) durante 3 h tras llegar a la fase exponencial del cultivo (A600 nm de 0,4 -0.6.) Después, se indujo la expresión de proteínas recombinantes con isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) a diferentes concentraciones (0.1 mM para la proteína 3 y 1 mM para la proteína 5) durante 3h a 37°C o 16° C con agitación constante (200 rpm) hasta llegar a la fase estacionaria del cultivo.

6.5.2.2 Cosecha del cultivo

La cosecha del cultivo se realizó a través de centrifugación por 15 min a 4500 rpm, posteriormente se desechó el sobrenadante y se procedió a lavar la pastilla celular con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS) (cloruro de sodio 81%, fosfato dibásico de sodio 14%, fosfato monobásico de potasio 3.0% y cloruro de potasio 2%, pH 7.2), se repitió la centrifugación y se conservó la pastilla a -70°C.

6.5.3 Sonicación

Con el fin de solubilizar las proteínas 3 y 5 recombinantes de los cuerpos de inclusión que forman cuando se realiza la inducción a 37°C estas fueron sonicadas a través del siguiente protocolo.

La biomasa de ambas proteínas que se cosechó por separado con la intención de conservar los cuerpos de inclusión que se formaron en nuestros cultivos. Se realizó la resuspensión de la biomasa de cada una de las proteínas en una proporción 1:3 con PBS (cloruro de sodio 81%, fosfato dibásico de sodio 14%, fosfato monobásico de potasio 3.0% y cloruro de potasio 2%, pH 7.2, Inhibidor de proteasas 0.1mM) y se mantuvo en hielo. Luego, la suspensión celular se sonicó por 12 min (1min ON, 1min OFF) a 50% de potencia sobre hielo. Después, los restos celulares se eliminaron mediante ultracentrifugación a 4 ° C durante 10 min a 14 000 rpm. Finalmente, la biomasa fue lavada 3 veces con 1ml de PBS-2% Tritón 100X, mediante ultracentrifugación a 4 ° C durante 10 min a 14 000 rpm siempre desechando el sobrenadante la biomasa fue conservada a -80°C.

6.5.4 Purificación de proteínas recombinantes.

La purificación de las proteínas 3 y 5 recombinantes obtenidas en cuerpos de inclusión (inducción a 37°C) se realizó usando Ni-NTA Agarose (nickel-charged affinity resin (cat. 90101, Invitrogen, EE. UU.) de acuerdo con la guía del fabricante. En esta etapa, la biomasa obtenida fue resuspendida con buffer de unión (NaCl 100 mM, Tris HCl 100 mM, Urea 8M, Imidazol 20 mM) en una proporción de 1:3, y se incubó durante 16 h en agitación constante a 4°C. Posteriormente, la biomasa solubilizada fue centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, al finalizar se desechó

el pellet celular y el sobrenadante fue conservado a 4°C. Mientras, la columna de afinidad Ni-NTA Agarose fue empacada con 2 ml de matriz, la cual fue lavada con 5 ml de agua milliQ filtrada. Así mismo, se dejaron eluir 10 ml más de agua milliQ filtrada a 4°C por la columna, y se añadieron 5 ml de buffer de unión. Enseguida, se adicionaron 3 ml del sobrenadante donde esta solubilizada la proteína de interés y se incubó por 45 minutos a 4°C en agitación constante dejando eluir el sobrenadante. Después, se agregaron 9 ml de buffer de unión (NaCl 100 mM, Tris HCl 100 mM, Urea 8M, Imidazol 20 mM) también dejando eluir el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 3 ml de buffer de elución (NaCl 100mM, Tris HCl 100 mM, Urea 8 mM, Imidazol 300mM), y se dejó eluir el sobrenadante. En esta fracción se encontraba la proteína de interés ya soluble.

Con el fin de favorecer el plegamiento de las proteínas de forma paulatina, se eliminó de forma periódica el imidazol y la urea de nuestra proteína soluble. Para lo cual, dentro de una membrana de diálisis de celulosa (Spectra/Por Regenerated Cellulose Dialysis Membranes 3.5 kDa cat. EF6026) se añadió la proteína soluble y se dejó durante 24 h en agitación constante contra buffer de diálisis (4 mM Urea, Tris HCl 100 mM, NaCl 100 mM) a 4°C. La renovación del buffer de diálisis se realizó cada 24h por un lapso de 5 días. Donde, se redujo la cantidad de urea a la mitad, hasta que en el día 5 se eliminó por completo.

La pureza de la proteína purificada se evaluó mediante electroforesis en el gel de poliacrilamida al 12% y la subsiguiente tinción con azul de Coomassie. La concentración de la proteína purificada se midió por Micro BCA Protein Assay Kit (Cat. 10249133, Thermo Scientific™, EE. UU.).

6.5.5 Gel SDS-PAGE

Para la confirmación de la expresión y pureza de nuestras proteínas, las proteínas de interés fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 12% y se analizó mediante SDS-PAGE y transferencia Western. La electroforesis se realizó en los geles 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (cat. 4561096, Biorad, EE. UU.). Las muestras fueron cuantificadas mediante el uso de Micro BCA Protein Assay Kit (Cat. 10249133, Thermo Scientific™, EE. UU.) y 2-D Quant Kit (Cat. 80-6483-56, GE Healthcare Life Sciences, EE. UU.) siguiendo el protocolo del proveedor. Una vez obtenida la concentración de proteína se añadieron 150 µg de proteína a cada carril, fueron desnaturalizadas diluyéndose 1:1 (v:v) con buffer de muestra (Tris 120 mM pH 6.3,

glicerol 10 %, SDS 4 %, azul de bromofenol 0.1 % y β -mercaptoetanol 6%). La electroforesis se corrió a 60 V, hasta que el gel separador hubo sido resuelto, entonces se elevó el voltaje a 120 V hasta el fin del gel. Posteriormente, el gel se tiñó durante una hora con azul de Coomassie (Cat. 161-0786, BioRad, EE. UU.) y se destiñó con solución desteñidora (50% agua milliQ, 40% metanol, 10% ácido acético).

6.5.6 Western Blots de antígenos de secreción de *Taenia solium*

Las proteínas se transfirieron a una membrana de Fluoruro de Polivinilideno con un tamaño de poro de 0.2 μm (Immun-Blot PVDF, BioRad) mediante transferencia semiseca utilizando el equipo Trans-Blot Turbo system (BioRad). La membrana se activó con metanol durante 15 seg y enseguida se enjuago con agua milliQ durante 2 min, y se dejó en incubación por 5 min con TBS 1X (100mM Cloruro de sodio, 50mM Tris, pH 7.2 at +25°C). Posteriormente se colocó en el Trans-Blot evitando la formación de burbujas, se dejó transfiriendo a temperatura ambiente durante 1h a 23V. Posteriormente, la membrana se bloqueó con TBS 1X-BSA 5% durante 1h en agitación constante a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo primario en dilución 1/1000- TBST 0.05% (pool sueros de pacientes cisticercosos para los Western Blot positivos y pool de sueros de sujetos sanos como control negativo) durante 2 h con agitación constante. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a Peroxidasa HRP-Goat Anti-Human IgG (H+L) Conjugate (ZyMax Grade) (Invitrogen) en dilución 1/50000-TBST 0.05% durante 2 h con agitación constante. Finalmente, se reveló con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Cat. 34580, Thermo Scientific™, EE. UU.).

6.5.7 Dot-BLOTS de antígenos de secreción de *Taenia solium*.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro 0.45 μm (BioRad) a temperatura ambiente y se utilizó el equipo DotBlot SF Microfiltration Apparatus (BioRad). La membrana se humedeció durante 10 min en 20 ml de TBS 1X (100mM Cloruro de sodio, 50mM Tris, pH 7.2 at +25°C) y se deslizo lentamente para colocarlo de tal manera que cubra todos los pozos, evitando la formación de burbujas de aire atrapadas entre la membrana. Finalmente se ensablo el equipo. Para cada muestra se colocó un volumen 100 μl

y se permitió el drenado de todos los pozos por gravedad durante 1h. Después, se añadieron 100 µl TBS 1X a cada pozo. Posteriormente, se bloqueó la membrana con PBS 1X (0,137 M de NaCl, 0,0027 M de KCl y 0,0119 M de fosfatos)-leche descremada al 2% en agitación lenta durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo Goat Anti-mouse IgG (H+L) Poly-HRP dilución 1:5000 (Cat. 32230, Thermo Scientific) en PBS Tween 0.1% y se incubó en agitación lenta durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se llevó a cabo el revelado por Quimioluminiscencia acuerdo a las instrucciones del kit Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Cat. 34096 Thermo Scientific) por autorradiografía con películas de la marca Kodak, a diferentes tiempos de exposición y revelado.

6.6 Síntesis de proteínas de secreción (APeptide)

Las proteínas P1, P2, y P4 se enviaron a sintetizar mediante la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida, esta consiste en ensamblar en un soporte sólido insoluble el residuo C-terminal del péptido a sintetizar, con lo cual la cadena de aminoácidos iría creciendo anclada al soporte sólido mediante una estrategia de elongación gradual. Finalmente, el producto deseado es desprendido del soporte, y su purificación y caracterización se llevan a cabo en solución (APeptide™). El único procesamiento que llevamos a cabo en nuestro laboratorio fue la resuspensión de las proteínas, estas se resuspendieron en DMSO. Suficiente para llegar a una concentración de 1g/ml (Figura 12).

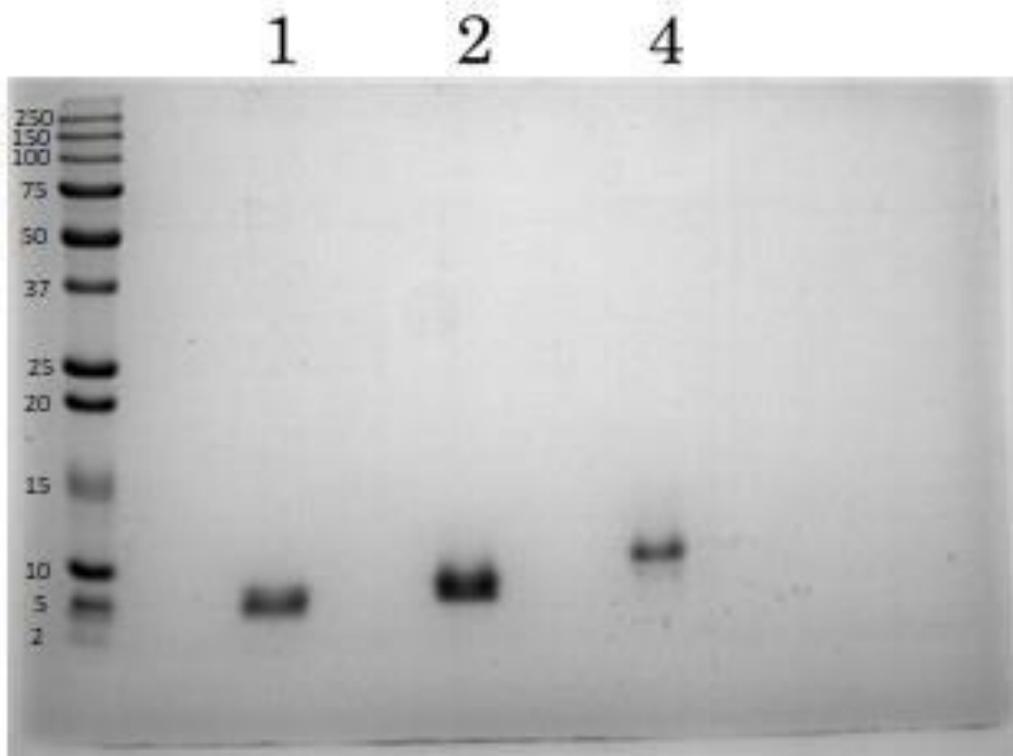


Figura 12. SDS PAGE de las proteínas sintéticas resuspendidas en DMSO a una concentración de 1g/ml.

6.7 Población de estudio y muestras de líquido cefalorraquídeo.

En este ensayo se probaron las proteínas recombinantes y sintéticas con un total de 283 muestras de LCR de adultos admitidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” de la Ciudad de México, México. Todas las muestras de LCR fueron conservadas a -80°C y fueron colectadas durante el periodo de enero 2016 a octubre 2018. Las cuales, se organizaron en 4 paneles. Panel 1 panel reactivo para neurocisticercosis (NC), paneles 2, 3, 4 paneles no reactivos para NC provenientes de otras patologías neuroinflamatorias.

- Panel 1: Contiene 111 LCR's positivos para NC, de las cuales 84 son NC activa y 27 NC inactiva.
- Panel 2: Contiene 13 LCR's positivos para Meningitis.
- Panel 3: Contiene 29 LCR's positivos para Encefalitis.
- Panel 4: Contiene 130 LCR's positivos para otras patologías (Tuberculosis, Neuroinfección, Epilepsia, Cáncer, Tumor no canceroso, Cefalea, Criptococosis, Encefalopatía hepática, Enfermedad vascular, Herpes, Hipertensión intracraneal, Neumonía, Neuritis, Neuropatía, Patología postraumática, Patología psiquiátrica, VIH).

6.8 Enzyme Linked immunosorbent Assay (ELISA)

Las placas de 96 pozos fueron sensibilizadas toda la noche a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de carbonatos (0.29 g de NaHCO_3 y 0.59 g de Na_2CO_3 en 100 ml, pH 9.6) y con 0.1 μg /pozo de los antígenos P1S, 2s y P4S. Mientras que, para los antígenos P3RS, P3RI y P5RI se utilizó 0.1 μl . Posteriormente, se lavaron los pozos 3 veces con 200 μl de 0.3% de Tween 20 en PBS1x (PBS-Tween) por pozo y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween por 1 h a temperatura ambiente. Después de lavarse nuevamente con 300 μl de PBS-Tween por pozo en 4 ocasiones, se incubaron con LCR's del banco arriba descrito (100 μl /pozo), en dilución 1/10 con PBS-Tween con BSA por 2h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron nuevamente con 300 μl de PBS-Tween por pozo en 5 ocasiones y se incubaron 2h a temperatura ambiente con anticuerpo de cabra anti-IgG de humano unido covalentemente a peroxidasa (HRP Anti human IgG Goat, Invitrogen Zymed Laboratories), diluido 1/150 000 en PBS-Tween y BSA en un volumen final de 100 μl por pozo. Las placas fueron nuevamente lavadas con PBS-Tween 4 veces con 300 μl por pozo. Finalmente, a cada pozo se le agregó 100 μl del sustrato TMB y se dejó incubar en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción de revelado se detuvo adicionando 50 μl /pozo de HCl 1N por pozo y se evaluó la absorción de luz a 450 nm en el espectrofotómetro.

6.8.1 Referencia de Diagnóstico serológico

Debido a que no existe un estándar de oro de referencia ampliamente aceptado para el diagnóstico de la Neurocisticercosis, decidimos utilizar como prueba de referencia la prueba diagnóstica de rutina del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suarez", el anticuerpo HP10. con el cual, se probaron las 283 muestras del banco de LCR.

6.9 Análisis de datos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software, EE. UU.). Donde, los datos de las densidades ópticas obtenidas de los ensayos de ELISA indirecto a través de graficas de dispersión, el punto de corte fue obtenido del

promedio de los controles negativos más tres desviaciones estándar. Las muestras se consideraron positivas cuando el valor de absorbancia sobrepasaba el punto de corte (PC).

Posteriormente, fueron analizados con curvas ROC (receiver operating characteristic). Mediante las cuales, se determinó la sensibilidad (Se), Especificidad (Es), el área bajo la curva (AUC) y el intervalo de confianza a 95% (95% CI) para cada uno de los antígenos recombinantes (antígenos P3RS, P3RI y P5RI) y sintéticos (P1S, P2S y P4S).

6.9.1 Curvas ROC

Las pruebas diagnósticas son parte de la metodología clínica que nos permite conocer la patología o naturaleza de la enfermedad que aflige al paciente (vera et al 2005). Las curvas ROC (receiver operating characteristic) son sumamente útiles en medicina, siendo ampliamente utilizadas en la evaluación de pruebas diagnósticas (Sachs et al 2019). Las pruebas o curvas ROC fueron diseñadas para mostrar simultáneamente las características operativas en todos los valores posibles de una prueba de diagnóstico continua (Sachs et al 2019).

En las pruebas diagnósticas la curva ROC muestra la sensibilidad y especificidad de los resultados de laboratorio que se ingresaron, e indican el punto de reacción óptimo (corte), sensibilidad (Se), especificidad (Es), área bajo la curva (área bajo la curva; AUC) (Figura 13).

El resultado de la prueba se obtiene entre un grupo de pacientes en comparación con un grupo de controles, GraphPad Prism calcula la sensibilidad y la especificidad utilizando cada valor de la tabla de datos como valor de corte. La tabla etiquetada como curva "ROC" se utiliza para crear el gráfico de 1-Especificidad vs Sensibilidad. La tabla denominada "Sensibilidad y especificidad" tabula esos valores junto con su intervalo de confianza del 95% para cada posible corte entre normal y anormal. Y la calcula como $\text{Sensibilidad}/[1-\text{Especificidad}]$, y $[1-\text{Sensibilidad}]/\text{Especificidad}$, respectivamente), y el índice de Youden, que es una medida del poder discriminativo general de un procedimiento de diagnóstico (calculado como $[\text{Sensibilidad}+\text{Especificidad}-1]$) (Berrar et al 2011). Donde, se presentó una confianza del 95% para los cálculos de Se, Es y AUC y se consideró como diferencias estadísticamente significativas

cuando la $P < 0,05$ (Martínez et al 2003) (Figura 13).

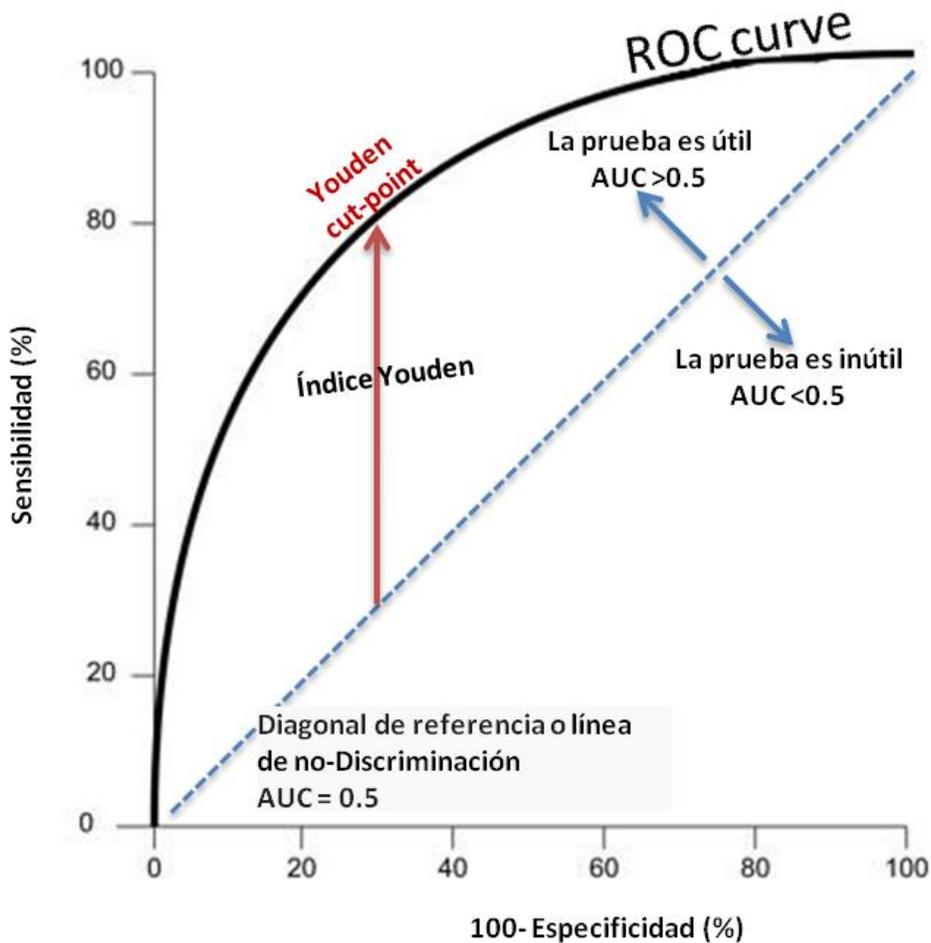


Figura 13. Algunas características de análisis de una curva ROC (Figura creada por el autor, representativa de lo descrito por [135])

Con respecto al área bajo la curva (AUC), esta representa la probabilidad de que un sujeto enfermo elegido al azar sea calificado (correctamente) o clasificado con mayor sospecha que un sujeto no enfermo elegido al azar. Por lo tanto, los valores cercanos a 1 (cero falsos positivos y cero falsos negativos) indican una prueba más certera y eficaz, mientras que los valores cercanos a 0.5 indican una prueba sin información de diagnóstico [135]. Para la comparación de AUC entre los antígenos recombinantes (P3RS, P3RI y P5RI) y sintéticos (P1S, P2S y P4S) se utilizó el programa informático GraphPad Prism versión 8.2.1 (GraphPad Software, EE.UU.) considerando $P < 0.05$ [136].

7. RESULTADOS

Nuestro estudio se centró en el análisis las proteínas de excreción/secreción (ESP) de los cisticercos de *Taenia solium* provenientes de 5 cerdos hembra infectadas naturalmente provenientes del foco endémico del estado de Guerrero, México. El pool de cisticercos de cada cerdo fue cultivado individualmente, por lo que cada cultivo se identificó con números consecutivos del 1 al 5 (Figura 14).

En la figura 14A se observa el gel dimensional de cada cultivo y se observa que cada uno presenta diferente número de spots: 130 en el cultivo 1, 153 en el cultivo 2, 148 en el cultivo 3, 147 en el cultivo 4 y 105 en el cultivo 5. Sin embargo, como podemos observar se conserva el mismo patrón de distribución de spots entre geles, en la región de bajo peso molecular (<20 kDa).

Como se muestra en la Figura 1A, observamos la huella digital proteómica de cada cultivo de cisticercos, el número de manchas varía de (105 para el cultivo 5 a 153 al cultivo 2).

Posteriormente se analizó cada gel con el programa con el software ImageMaster, el cual nos permitió conocer el punto isoeléctrico (PI) y peso molecular (MW) predicho de cada uno de los spots presentes.

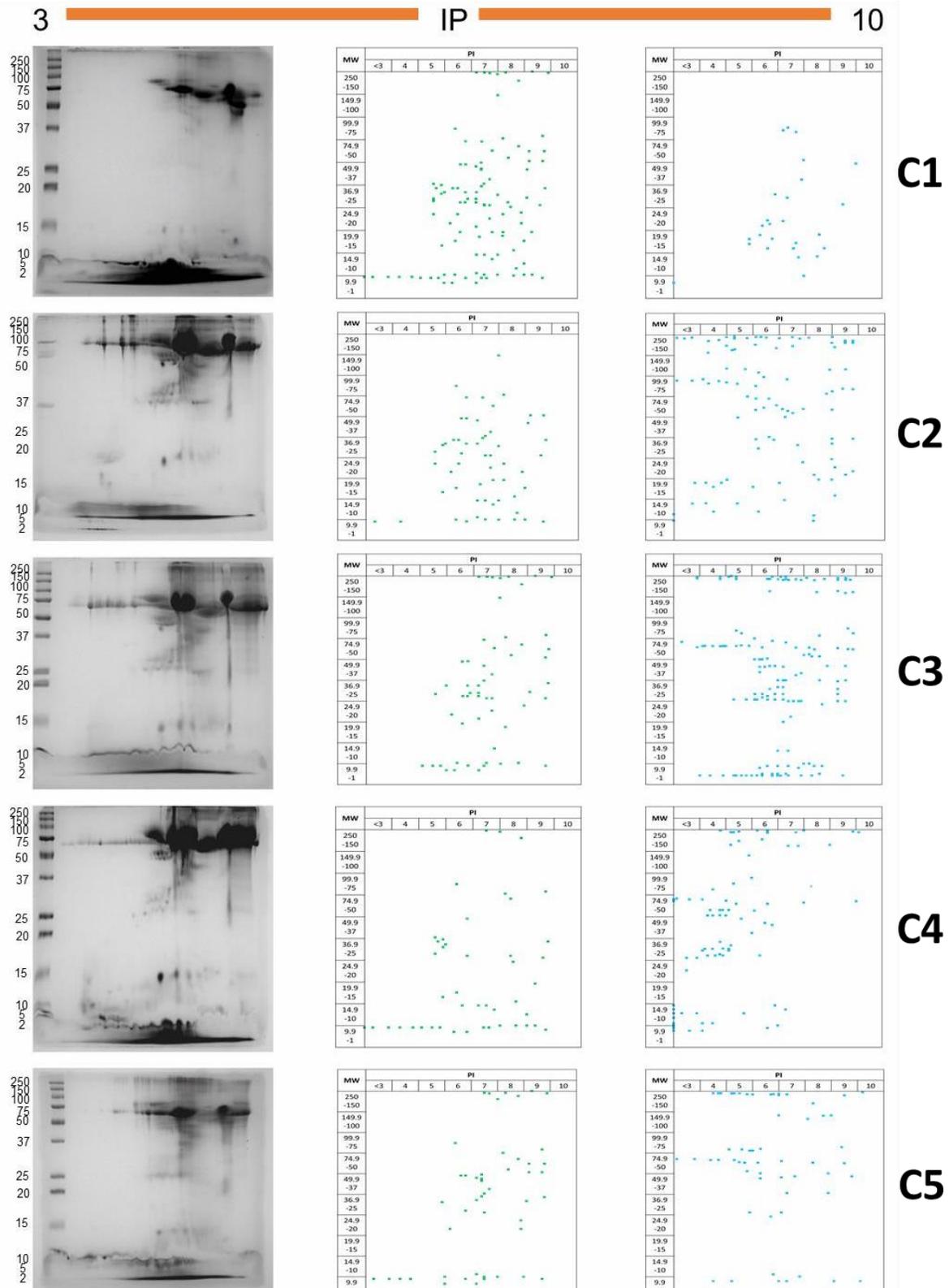


Figura 14. Identificación de spots en geles bidimensionales con el software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare), A) 2D PAGE, B) Spots conservados marcados en verde, C) spots diferenciales marcados en azul (punto isoeléctrico (IP), cultivo 1).

Con el fin de determinar los spots conservados y diferenciales entre cultivos, nosotros consideramos como un spot conservado cuando identificamos el mismo spot (igual PI y MW) en por lo menos 2 cultivos de cisticerco (geles 2D PAGE) (Figura 14B). Mientras, que cuando el spot no coincide entre spots de otros cultivos (geles 2D PAGE) lo consideramos un spot diferencial (Figura 14C). Interesantemente, por lo menos un tercio de los spots se conservan entre los diferentes cultivos de cisticercos (geles 2D PAGE).

Paralelamente, decidimos identificar regiones antigénicas específicas para *T. solium* a través de ensayos de Western Blot en 2D-PAGE. Para esto se usaron sueros de pacientes con neurocisticercosis. Los resultados de la figura 15 muestran que hay 2 regiones que podrían considerarse antigénicas: 1) Una región con la mayor densidad de spots antigénicos que está por debajo de los 20 kDa, sin distinción del punto isoeléctrico y 2) Otra región entre 5 y 8 de punto isoeléctrico sin distinción del peso molecular

Una vez identificadas las regiones altamente antigénicas, era de nuestro interés llevar a cabo la secuenciación de los spots presentes en esas regiones a través de espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS). Para lo cual, los geles 2D PAGE se enviaron a la unidad de proteómica del INMEGEN. Lamentablemente, a pesar de que la espectrometría de masas es una estrategia muy madura y ampliamente distribuida, en el caso particular de nuestros spots de interés nos fue imposible obtener su secuencia de aminoácidos. Esto debido a las características fisicoquímicas propias de los spots presentes en nuestros los geles 2D PAGE. Entre las cuales podemos anotar la concentración relativa de cada uno de los spots, la cual era muy baja debido a su origen como proteínas de excreción/secreción (ESP). La cual, no pudimos subsanar aun llevando a cabo el enriquecimiento de los spots.

Afortunadamente, algunos de los spots identificados en los geles bidimensionales si pudieron ser caracterizados a través de espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS), debido a que su concentración relativa era mayor. La secuencia proteica se obtuvo con la ayuda de las bases de datos públicas (BLAST) y en las del genoma de *Taenia solium*.

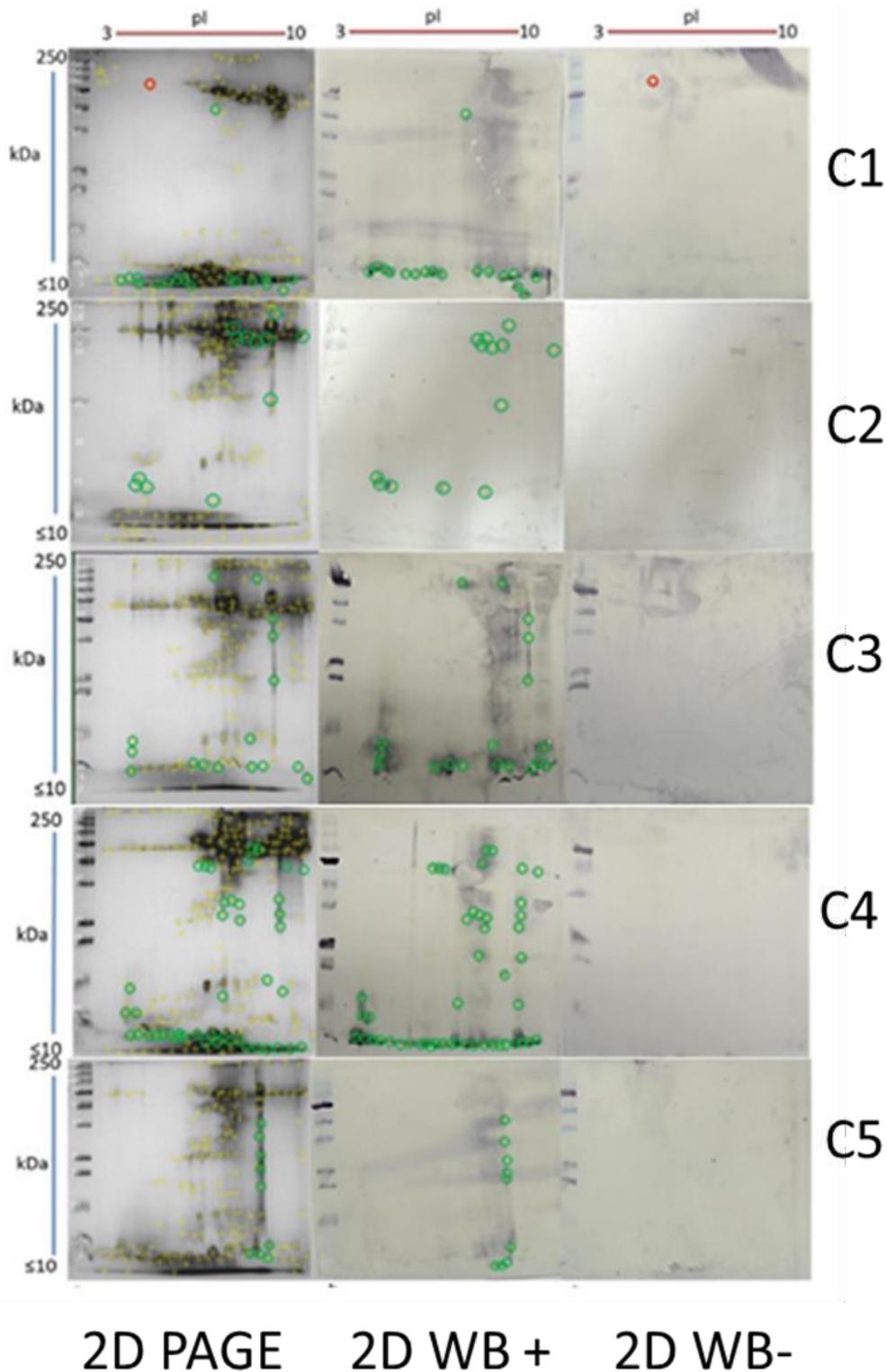


Figura 15. Identificación de regiones antigénicas a través de ensayos de Western Blot A) 2D PAGE, B) Western Blot con panel de sueros reactivos para NC (WB+), C) Western Blot con panel de sueros no reactivos para NC (WB-), cultivo 1 (C1), cultivo 2 (C2), cultivo.

Los spots que identificamos correspondían a las proteínas 8 kDa Diagnostic antigen TsRS2 variant 1, Immunogenic protein Ts21, Secreted antigen Ts8B2, Enolase, Antigen cC1 y Trypsin-like protein. Todas ellas previamente utilizadas en ensayos diagnósticos contra la NC. Esto nos alentó a seguir en la búsqueda, ya que nos indicaba que estábamos identificando spots de interés en las regiones correctas. Por lo cual, diseñamos una nueva estrategia proteómico/bioinformática que nos permitiría analizar las regiones antigénicas de interés desde otro enfoque.

7.1 Estrategia Proteómico/Bioinformática.

Partiendo de la premisa que todas las proteínas presentes en los geles 2D PAGE son proteínas de secreción (ESP) y que teóricamente todas estas deberían estar contenidas en el secretoma; realizamos un gel teórico bidimensional haciendo uso de las secuencias proteicas de la base de datos del secretoma único de *Taenia solium* (Datos previos publicados en Gomez et al 2015). Así, construimos un gel teórico bidimensional, donde los spots se distribuyen dependiendo del PI y MW (Figura 16).

Es de vital importancia anotar que el consorcio del genoma de *Taenia solium* nos permitió hacer uso de sus datos antes de que lo publicaran. Lamentablemente en ese momento no tuvimos acceso a los datos de PI y MW de las secuencias proteicas del genoma de *Taenia solium*. Por lo cual, para la predicción de PI y MW de las proteínas del secretoma único de *Taenia solium* utilizamos el algoritmo Compute pI/Mw tool de Expasy tools, el cual realiza la predicción del punto isoeléctrico y el peso molecular a partir de la secuencia de aminoácidos. Posteriormente estos datos fueron corroborados con el genoma de *Taenia solium* una vez que este fue publicado.

MW	PI						
	3-3.99	4-4.99	5-5.99	6-6.99	7-7.99	8-8.99	9-10.00
250-150							
149.9-100							
99.9-75							
74.9-50							
49.9-37							
36.9-25		68,	41,				88,
24.9-20						75,	17,
19.9-15	53,64,73,	70,93,	104,	2,6		89,	13,18,25,38,59,100,120
14.9-10	114,118,	63,80,86,	83,91,108,121	28,44,90,109,117,	9,66,76,77,112,	36,54,61,85,119,	10,14,16,19,20,21,45,46,48,49,51,57,74,82,99,105,
9.9-5	11,12,40,	23,29,33,34,43,50,55,72,84,87,103,111,	1,4,30,58,96,101,110,	5,32,47,62,81,94,115,	7,22,39,69,	15,26,37,71,92,97,	24,27,31,35,42,56,67,78,79,95,102,106,107,116,
4.9-2	65,	8,60,	113,		3,	98,	52,

Figura 16. Gel teórico bidimensional del secretoma único de *Taenia solium*.

Por otra parte, se realizó otro gel teórico bidimensional con los datos de PI y MW de los spots presentes en los Western blots 2D-PAGE analizados con el software ImageMaster™ 2D Platinum v7.0 (Figura 17).

MW / PI	3-3.9	4-4.9	5-5.9	6-6.9	7-7.9	8-8.9	9-10
1 (>250 - 100)			C3	C3	C4, C5	C4	C4
2 (99.9 - 50)			C5	C2, C5	C5	C1, C5	C5
3 (49.9 - 25)					C1, C5	C1, C4, C5	
4 (24.9 - 15)	C1, C5	C4		C3, C4, C5	C3, C4	C3, C5	
5 (14.9 - 2)	C1, C2, C3, C5	C2, C3, C5	C1, C2, C3, C5	C1, C3, C5	C1, C2, C5	C1, C2, C5	C1, C2, C5
	A	B	C	D	E	F	G



Figura 17. Gel teórico bidimensional de regiones antigénicas en Western blots 2D-PAGE de sobrenadantes de cultivos de cisticercos de *Taenia solium*.

Este gel teórico nos permitió la identificación de regiones antigénicas compartidas entre cultivos de cisticercos provenientes de 5 cerdos infectados naturalmente. Donde, podemos observar que las regiones A5 y C5 (en verde) son las regiones con mayor densidad de spots antigénicos.

Con el fin de establecer una caracterización indirecta de las posibles proteínas antigénicas de interés realizamos el empalme entre el gel teórico bidimensional del secretoma único de *Taenia solium* con el gel teórico bidimensional de regiones antigénicas en Western blots 2D-PAGE de sobrenadantes de cultivos de cisticercos de *Taenia solium*, tal como se observa en la Figura 18.

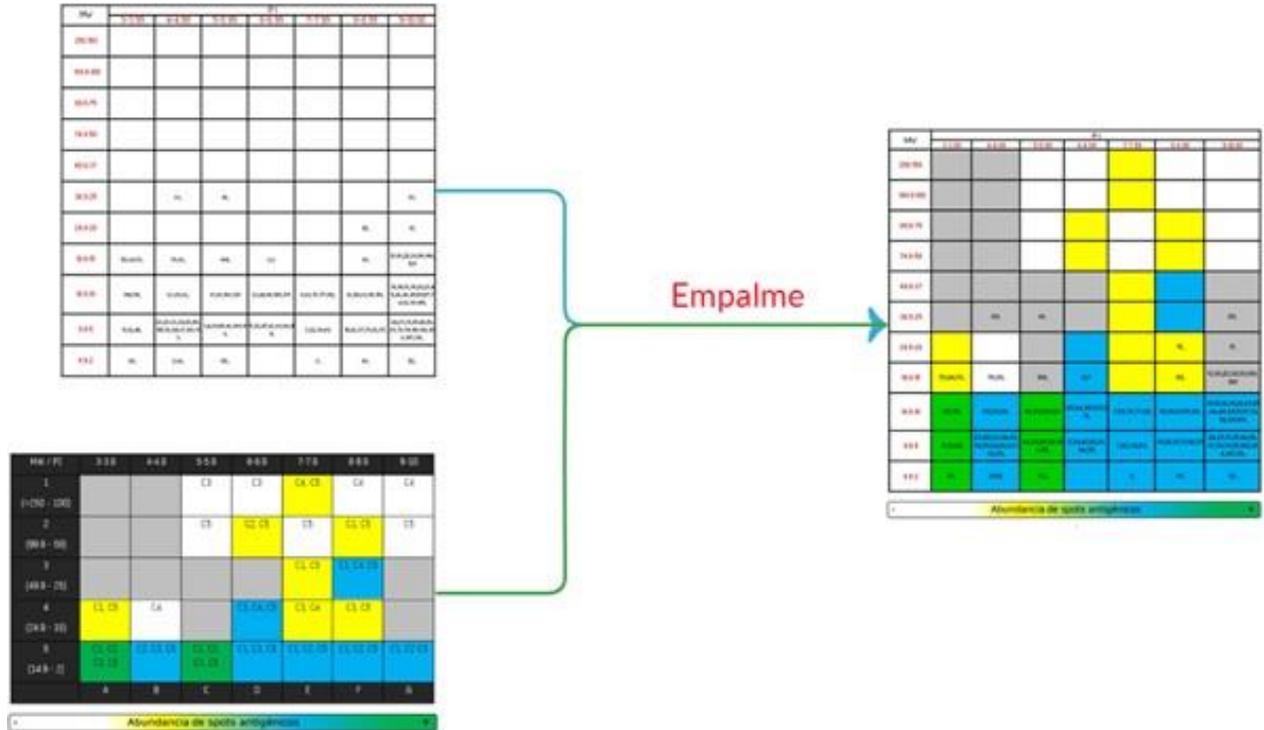


Figura 18. Diagrama de flujo ilustrativo del diseño de empalme entre geles teóricos.

En la figura 19, se puede revisar a detalle el empalme entre geles teóricos. Como podemos observar en las regiones por debajo de los 15 kDa de MW entre los PI 3-4 y 5-6 (en verde) teóricamente están presentes las proteínas del secretoma único de *Taenia solium* más antigénicas, según los ensayos de Western Blots 2D-PAGE en los cultivos de cisticercos de *Taenia solium*. Lo cual convierte a estas regiones en zonas de interés para la búsqueda de proteínas candidatas para el desarrollo de un nuevo método diagnóstico serológico para la NC.

MW	PI						
	3-3.99	4-4.99	5-5.99	6-6.99	7-7.99	8-8.99	9-10.00
250-150							
149.9-100							
99.9-75							
74.9-50							
49.9-37							
36.9-25		68,	41,				88,
24.9-20						75,	17,
19.9-15	53,64,73,	70,93,	104,	2,6		89,	13,18,25,38,59,100,120
14.9-10	114,118,	63,80,86,	83,91,108,121	28,44,90,109,117,	9,66,76,77,112,	36,54,61,85,119,	10,14,16,19,20,21,45,46,48,49,51,57,74,82,99,105,
9.9-5	11,12,40,	23,29,33,34,43,50,55,72,84,87,103,111,	1,4,30,58,96,101,110,	5,32,47,62,81,94,115,	7,22,39,69,	15,26,37,71,92,97,	24,27,31,35,42,56,67,78,79,95,102,106,107,116,
4.9-2	65,	8,60,	113,		3,	98,	52,



Figura 19. Empalme gel teórico bidimensional del secretoma único de *Taenia solium* con el gel teórico bidimensional de regiones antigénicas en Western blots 2D-PAGE.

Sin embargo, estos resultados presentan una gran cantidad de proteínas presentes en ambas regiones. Con el fin de identificar y confirmar las proteínas verdaderamente antigénicas realizamos el análisis de las secuencias del secretoma único de *Taenia solium* con 4 algoritmos que tienen la finalidad de predecir regiones antigénicas (Antigenic Propensity, Bepipred, Cbtope y SVMTrip).

Para lo cual, identificamos aquellas proteínas que presentaban un mayor número de regiones antigénicas, así como el mayor número de coincidencias entre algoritmos de regiones altamente antigénicas. Teniendo como premisa el hecho de que si diferentes algoritmos (cada uno con un método diferente de predicción) coinciden en la predicción de cierta región antigénica esto podría indicar una fuerte posibilidad de que esa región antigénica realmente existe (Figura 20).

>g2591--NA--	MDEQAEWWHLPPSQVVSNSASLSLLLPASQLSSTQEAAEVESDVERDREGEGVEDAAAYFLLLLLLPHSSGSNNWEGVAAAYFLHATVAIAVLDPNLDRSSDPPTNPPNKDFTT
Antigenic Propensity	MDEQAEWWHLPPSQVVSNSASLSLLLPASQLSSTQEAAEVESDVERDREGEGVEDAAAYFLLLLLLPHSSGSNNWEGVAAAYFLHATVAIAVLDPNLDRSSDPPTNPPNKDFTT ¹¹⁵
Bepipred	MDEQAEWWHLPPSQVVSNSASLSLLLPASQLSSTQEAAEVESDVERDREGEGVEDAAAYFLLLLLLPHSSGSNNWEGVAAAYFLHATVAIAVLDPNLDRSSDPPTNPPNKDFTT
Cbtope	MDEQAEWWHLPPSQVVSNSASLSLLLPASQLSSTQEAAEVESDVERDREGEGVEDAAAYFLLLLLLPHSSGSNNWEGVAAAYFLHATVAIAVLDPNLDRSSDPPTNPPNKDFTT
SVMTrip	MDEQAEWWHLPPSQVVSNSASLSLLLPASQLSSTQEAAEVESDVERDREGEGVEDAAAYFLLLLLLPHSSGSNNWEGVAAAYFLHATVAIAVLDPNLDRSSDPPTNPPNKDFTT

Figura 20. Análisis Proteínas candidato con los algoritmos Antigenic Propensity, Bepipred, Cbtope y SVMTrip.

Por otra parte, una vez que se publicó el genoma de *Taenia solium* tuvimos la oportunidad de ratificar los PI y PM de nuestra base de datos, y encontramos que si bien la predicción de los PI y PM no había sido exacta si era muy cercana. Confirmándose que la metodología que habíamos seguido era realmente útil cuando no se cuenta con la posibilidad de obtener la secuencia de los spots antigénicos mediante espectrometría de masas y especialmente cuando se cuenta con datos genómicos.

Dado lo anterior, nos planteamos el diseño de un nuevo método de análisis que nos permitiría predecir la secuencia de la mayoría de los spots antigénicos presentes en geles bidimensionales (2D PAGE) y en ensayos de Western Blot. Al cual nombramos Secuenciación teórica para proteínas de baja expresión (TS-LEP por sus siglas en inglés). Este método ya fue publicado por nuestro equipo de trabajo en la revista PLOS Neglected Diseases [137].

7.2 Secuenciación teórica para proteínas de baja expresión (TS-LEP).

El método de secuenciación teórica “TS-LEP” es un análisis bioinformático basado en datos de proteómica, que permite la identificación y caracterización de las proteínas a gran escala, independientemente de su expresión relativa e incluso cuando las condiciones para la secuenciación no son viables. Basándonos en el uso del punto isoelectrico y el peso molecular de

cada proteína. Ya que es conocido que cada proteína cuenta con PI y MW específicos. Esta nueva estrategia es viable siempre y cuando se cuente con el genoma.

TS-LEP nos permitió predecir la secuencia de los spots presentes en geles bidimensionales de cultivos de sobrenadantes de cultivo de cisticercos de *Taenia solium*. Donde, comparamos el IP y MW (obtenido con el software ImageMaster™) de todos los spots de los cultivos con respecto a los datos de PI y MW (provenientes del genoma) del secretoma de *Taenia solium*.

El análisis se llevó a cabo en ambos sentidos. Es decir, cada spot proveniente de los 2D PAGE fue comparado con todas y cada una de las proteínas del secretoma de *Taenia solium*. Así como, cada proteína fue comparada con cada spot de todos y cada uno de los 5 geles bidimensionales. Esto con la finalidad de evitar sesgos debidos al parecido entre algunos datos de PI y MW de las proteínas y spots.

A través de esta estrategia identificamos la secuencia de 297 spots de los geles bidimensionales, caracterizando el total de spots identificados por cada cultivo de cisticercos. Los cuales se pueden ver a detalle por cultivos en anexos (tablas A1-5).

Con el fin de validar nuestro método de predicción de secuencias (TS-LEP), retomamos los 6 spots que fueron secuenciados por espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS), y se analizaron con el método TS-LEP. Como se muestra en la tabla 3, satisfactoriamente encontramos datos de IP y MW muy similares entre ambos métodos.

Lo cual nos confirma experimentalmente, que la metodología del TS-LEP es totalmente útil y aplicable, abriendo un panorama de posibilidades para las proteínas de baja expresión. Donde su uso, se ha visto totalmente limitado debido a sus características inherentes.

Tabla 3. Comparación entre métodos (secuenciación espectrometría de masas frente a predicción de secuencia de TS-LEP).

ID (Secuenciación ESI-MS/MS)	PI (Punto isoeléctrico)		MW (Peso molecular)		ID (Secretoma)	Cultivo de cisticercos <i>Taenia solium</i>
gi 19879960 8 kDa diagnostic antigen TsRS2 variant 1 [<i>Taenia solium</i>]	9.5	9.3	8.7	9.0	TsM_001216700	C2, C4
gi 7339851 immunogenic protein Ts21 [<i>Taenia solium</i>]	9.2	9.2	9.7	10.0	TsM_000537100	C4
gi 23477224 secreted antigen Ts8B2 [<i>Taenia solium</i>]	9.2	9	9.7	10.3	TsM_000286100	C2
gi 261266611 enolase [<i>Taenia asiática</i>]	6.8	6.9	46.7	46	TsM_000132800	C1, C2, C3, C4, C5
gi 311335041 trypsin-like protein [<i>Taenia solium</i>]	7.1	7	54.1	58.9	TsM_000236600	C2
gi 4960053 antigen cC1 [<i>Taenia solium</i>]	5.7	5.7	38.0	31.8	TsM_000563900	C4, C1
gi 6288722 cysticercosis-specific antigen [<i>Taenia solium</i>]	8.9	8.8	9.7	10.9	TsM_001092400	C1

Una vez validado nuestro método, se prosiguió con el análisis de las secuencias candidato interesantes para su uso como antígenos en un ensayo serodiagnóstico útil para el diagnóstico de la neurocisticercosis.

7.3 Análisis de secuencias candidato.

Como resultado de las estrategias previamente descritas obtuvimos una serie de candidatos, los cuales fueron caracterizados antigénicamente. En este apartado se describen las

directrices que se siguieron para la caracterización e identificación de tales candidatos.

- **Análisis de regiones antigénicas:** Se predijo el número de regiones antigénicas y epítomos B, a través de los algoritmos BcePred (Antigenic Propensity), Bepipred, Cbtope, SVMTrip. Seleccionamos aquellas ESP con las regiones antigénicas donde coinciden el mayor número de algoritmos.
- **Análisis de AAR:** Se calculó el número de AAR en todas las ESP utilizando como predictor de regiones antigénicas los algoritmos BcePred (Antigenic Propensity), Bepipred, Cbtope, SVMTrip.
- **ESP con soporte de RNAseq:** Se identificaron los candidatos de interés en la base de datos de proteínas que cuentan con soporte de RNAseq del consorcio del genoma de *Taenia solium*.

Estos análisis nos permitieron identificar los parámetros para la selección de proteínas candidatas para ser producidas de forma recombinante. Los parámetros fueron preponderados por orden de importancia para nuestros fines.

1. Contar con soporte de RNA.
2. AAR menor a 21.
3. Mayor número de regiones antigénicas.

Bajo los parámetros anteriores se encontraron 5 proteínas como candidatas para el diseño del nuevo método diagnóstico para NC (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas de secreción candidato.

ID	TAMAÑO (pb)	AAR	NÚMERO DE REGIONES	mRNA
1	288	24	4	Si
2	207	13.8	5	Si
3	288	23	4	No
4	171	19	3	Si
5	129	21	2	Si

7.4 Clonación y expresión de las proteínas de secreción en un sistema procarionte (*E. coli*).

Las cinco proteínas candidato se enviaron a sintetizar a GenScript. Como vector de origen para las proteínas P1, P2, P3, P4 utilizaron pUC57, mientras que para la proteína P5 se utilizó pJET 1.2. Las proteínas P3 y P5 fueron subclonadas en el vector de mantenimiento pJET 1.2 blunt en las cepas de *E. coli* MC1061 y XL1-BLUE.

Las construcciones 3_pJET1.2blunt y 5_pJET1.2blunt se introdujeron en 8 cepas electrocompetentes de *E. coli* por transformación mediante electroporación (C41, C43, C43 PRIL, ROSETTA II, BL21 GOLD, ROSETTA I, MC1061 TYVE, C41 RARE) (Figura 21).

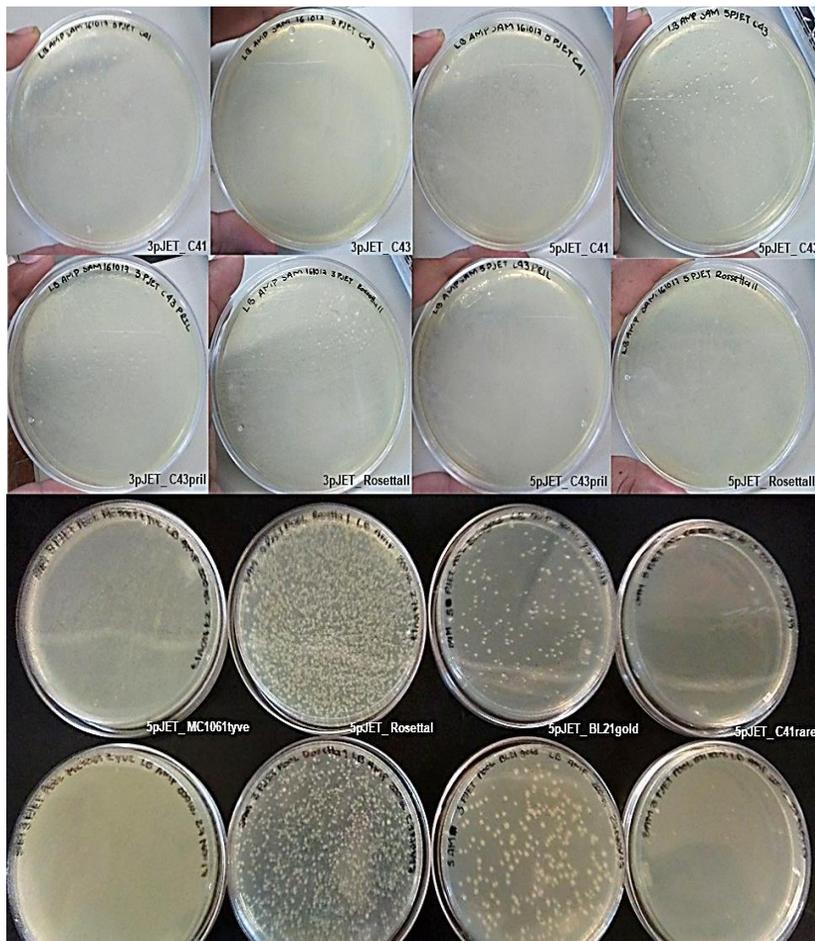


Figura 21. Placas de medio LB correspondientes a las transformaciones de 3_pJET1.2blunt y 5_pJET1.2blunt a células electrocompetentes.

Posteriormente, fueron cultivadas en medio LB con antibiótico (el necesario para cada construcción). Consecutivamente, se indujo la expresión de proteínas recombinantes con

isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) a 37 y/o 16°C. Debido a que el vector pJET 1.2 blunt permite la expresión de proteínas recombinantes haciendo uso de su promotor T7.

Con el fin de corroborar la expresión de las proteínas de interés se realizaron geles SDS-PAGE, aquí solo se presentan los geles SDS-PAGE donde se observa la expresión de las proteínas de interés.

En la Figura 22 se muestra el gel de la proteína 3 recombinante (P3r), se puede observar una banda en aproximadamente 10.5kDa, esto nos indica que la proteína P3r se expresó en la cepa Rosetta 2, tanto a 37°C (cuerpos de inclusión) como a 16°C (soluble) y a diferentes concentraciones de IPTG.

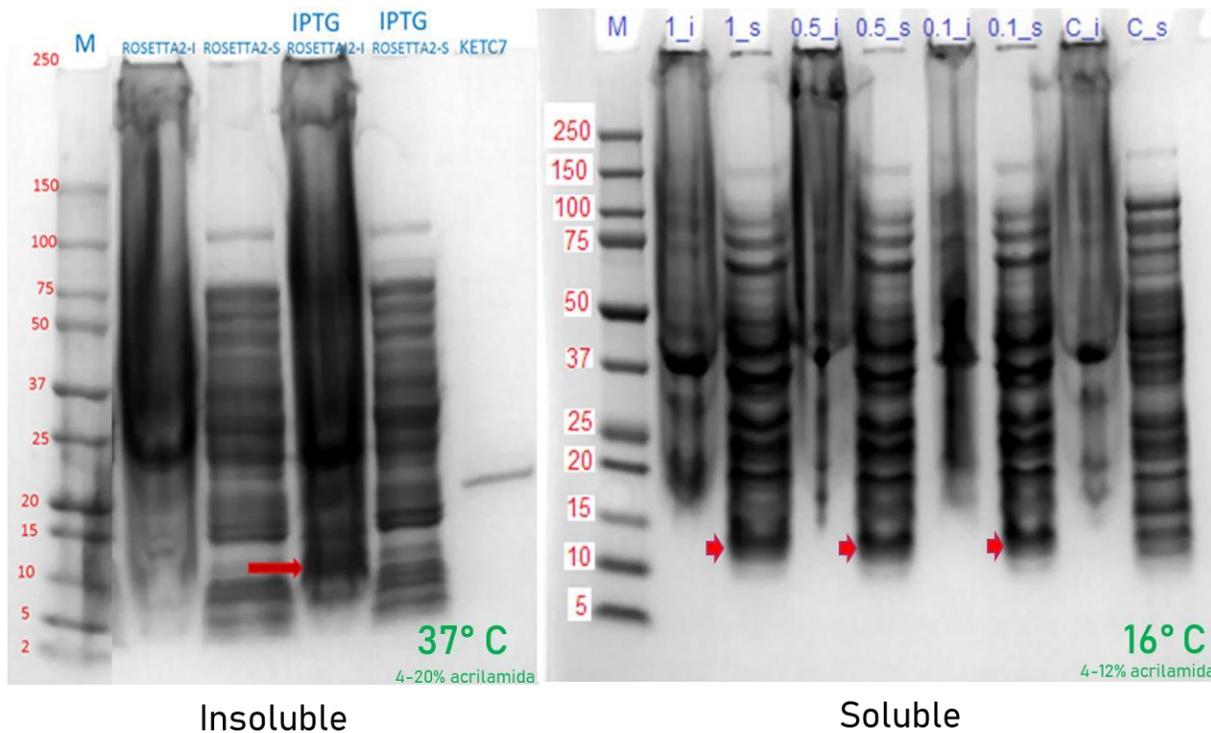


Figura 22. Geles SDS-PAGE de la proteína 3_pJET1.2blunt; M (marcador de peso molecular 250 – 2 kDa).

Mientras que, en la Figura 23 se muestra el gel a 37°C de la proteína 5 recombinante (P5r) se puede observar una banda de aproximadamente 5 kDa, nos indica que la muestra 5pJET1.2blunt en la cepa rare se expresó la proteína de forma insoluble (cuerpos de inclusión), lamentablemente, a 16°C no se observó su expresión.

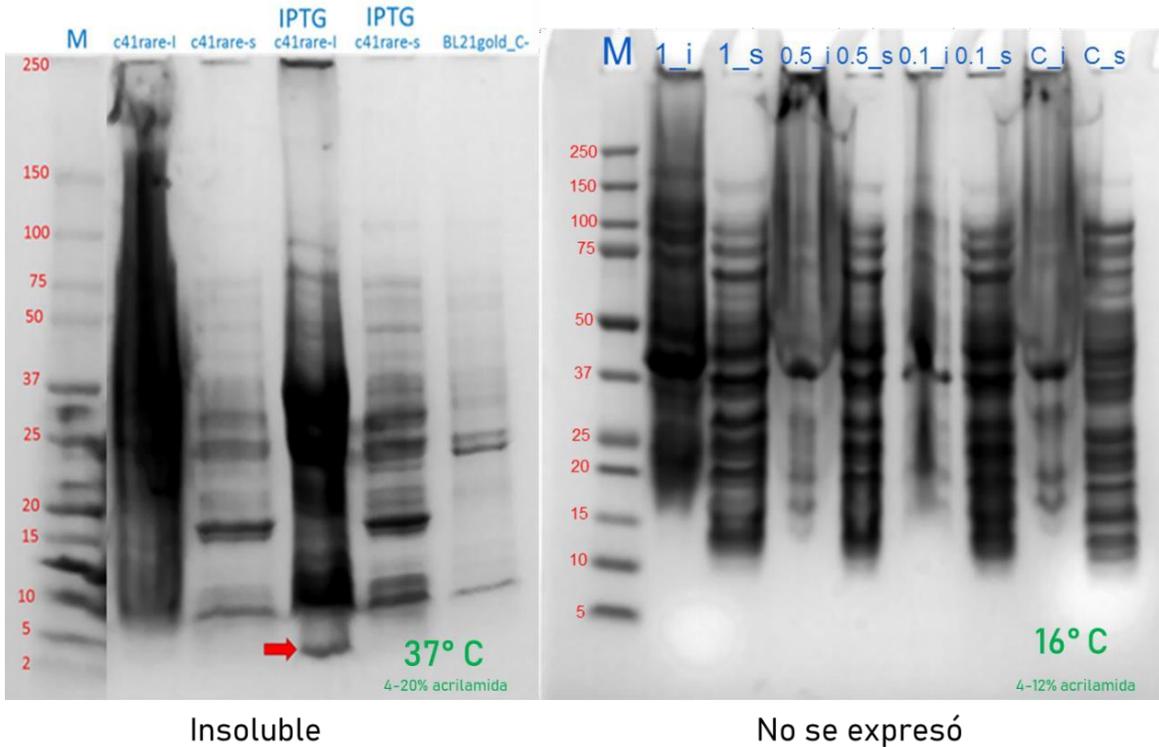


Figura 23. Geles SDS-PAGE de la proteína 5_ pJET1.2blunt; M (marcador de peso molecular 250 – 2 kDa), C41rare_i (control sin IPTG, insoluble), C41rare_s (control sin IPTG, soluble), C41rare_i ([0.5mM IPTG] insoluble), C41rare_s ([0.5mM IPTG] soluble).

Lamentablemente, para las proteínas P1, P2 y P4 no fue posible su expresión a través de un sistema procarionte, por lo tanto, se decidió enviar a sintetizar en APeptide™.

7.5 Ensayos serológicos e interpretación de resultados

Las proteínas recombinantes (P3RS (soluble), P3RI (insoluble) y P5RI (insoluble)) y sintéticas (P1S, P2S y P4S) se utilizaron para el diseño de un ensayo de ELISA para el diagnóstico de la neurocisticercosis humana (NC). La prueba diagnóstica fue diseñada como un ELISA indirecto (Figura 24), como estándar de referencia se utilizó el anticuerpo HP10 y como control positivo antígeno vesicular de cisticerco AgV.

Se analizaron los 283 LCR's (Panel 1 – 4) para detectar antígenos (estándar de referencia HP10) y anticuerpos (ELISA indirecto para todos los antígenos (P1S, P2S P3RS, P3RI, P4S y P5RI).

Para todas las ELISAS que se evaluaron se utilizaron las placas Polystyrene ELISA plates (immulon, flat bottom microtiter®, 96 wells Thermo Labsystems), se estandarizó la concentración de todos los antígenos, y se comprobó la eficiencia de los paneles positivos y negativos de LCR.

Se evaluaron los datos de densidad óptica (D.O.) de cada una de las muestras de LCR, calculando como punto de corte el promedio más 3 desviaciones estándar de los LCR negativos para NC. En esta clasificación obtuvimos falsos positivos para cada proteína evaluada, así como las reacciones cruzadas.

En la Figura 25 se muestran los gráficos de la capacidad diagnóstica de cada uno de los antígenos (P1S, P2S, P3RS, P3RI, P4S y P5RI) contra las muestras de LCR de todos nuestros paneles (Panel 1 reactivo para neurocisticercosis (NC activa e inactiva), Paneles 2, 3, 4 paneles no reactivos para neurocisticercosis provenientes de otras patologías neuroinflamatorias), así como para el estándar (HP10) y el control positivo (AgV). Esto con la finalidad de evaluar la capacidad para diferenciar entre una muestra positiva de una negativa de cada uno de nuestros antígenos y compararlos con el estándar. Los resultados muestran que los antígenos recombinantes (P3RS, P3RI, y P5RI) presentan una mejor capacidad para identificar las muestras positivas que el resto de los antígenos evaluados, incluyendo el estándar (HP10), sobresaliendo fuertemente el antígeno P3RS, en donde podemos observar que solo una muestra no identifico como positiva (98%).

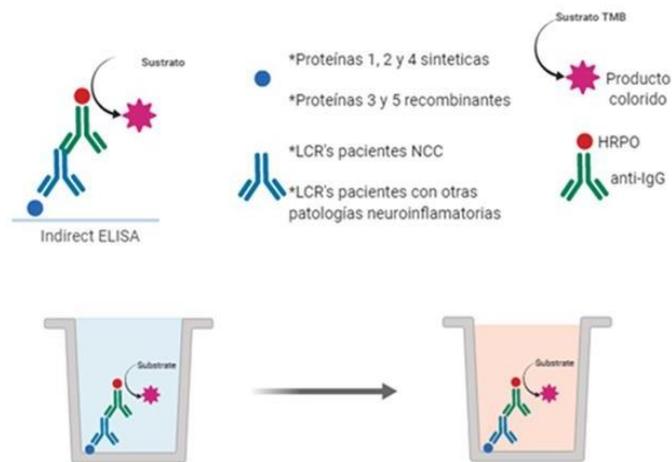


Figura 24. Diseño de la prueba de ELISA indirecta para las proteínas 1, 2, 4 sintéticas y la 3 y 5 recombinantes.

Como podemos observar en los gráficos de dispersión de la Figura 25 encontramos la presencia de falsos positivos en todos los antígenos. Por consiguiente, realizamos el análisis de las tasas de positividad entre nuestros antígenos evaluados. Para ello formamos 4 paneles de LCR que incluyen:

- Panel 1: Contiene 111 LCR's positivos para NC, de las cuales 84 son NC activa y 27 NC inactiva.
- Panel 2: Contiene 13 LCR's positivos para Meningitis.
- Panel 3: Contiene 29 LCR's positivos para Encefalitis.
- Panel 4: Contiene 130 LCR's positivos para otras patologías (Tuberculosis, Neuroinfección, Epilepsia, Cáncer, Tumor no canceroso, Cefalea, Criptococosis, Encefalopatía hepática, Enfermedad vascular, Herpes, Hipertensión intracraneal, Neumonía, Neuritis, Neuropatía, Patología postraumática, Patología psiquiátrica, VIH). Los resultados se pueden observar en la Figura 26.

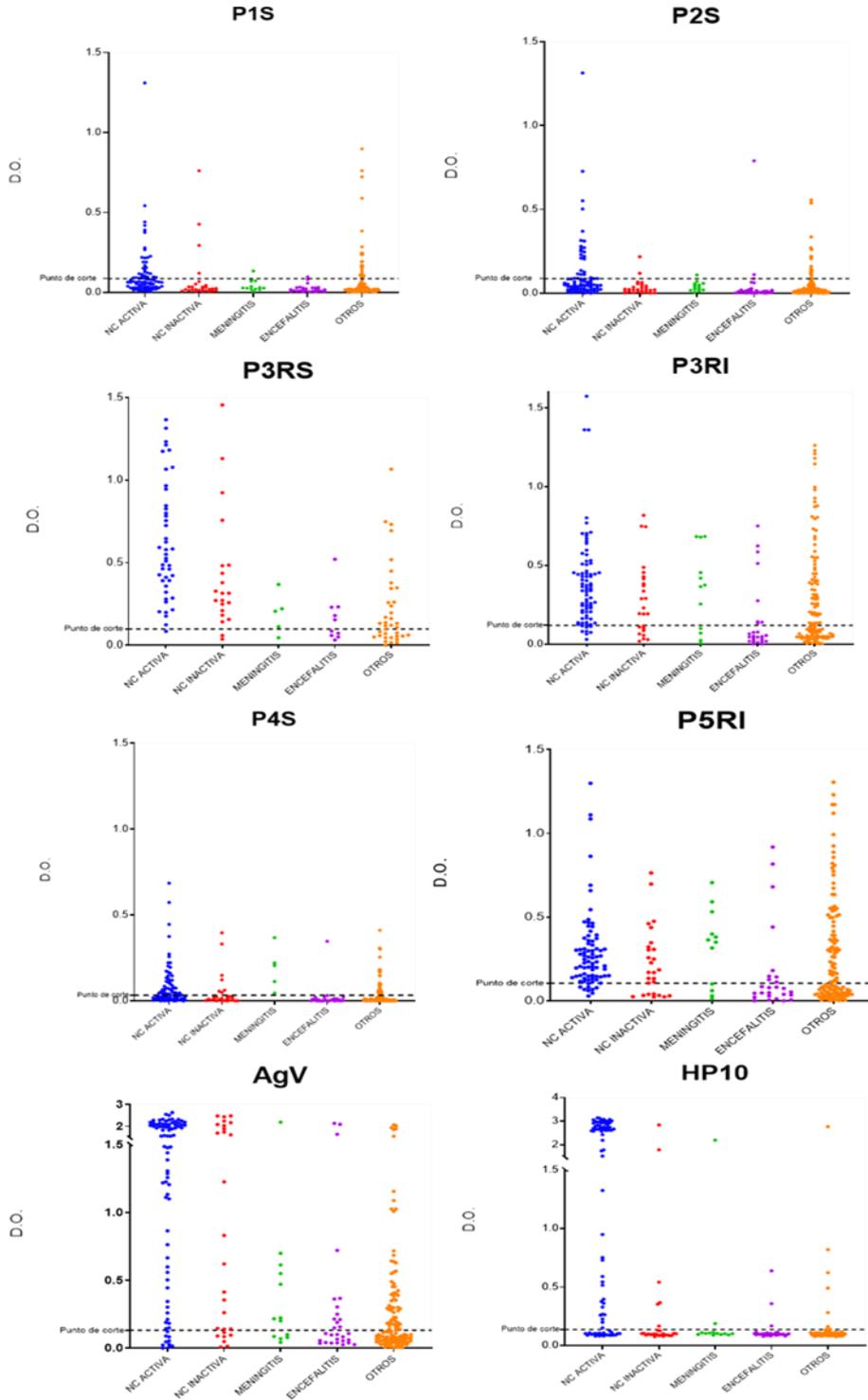


Figura 25. Gráfico de dispersión de los ensayos de Elisa Indirecto de cada uno de los antígenos sintéticos y recombinantes (P1S, P2S, P3RS, P3RI, P4S y P5RI) y del control positivo (AgV) y estándar (HP10), eje Y; valor de D.O. de cada una de las muestras), con respecto de los de los paneles a evaluar (eje X; paneles 1-4).

En el panel 1, referente a LCR proveniente de Neurocisticercosis activa (verdaderos positivos (VP)) con la P1S se presentó un porcentaje de positividad del 41% (33/81), con la P2S del 37% (30/81), la P3RS del 98% (44/45), la P3RI del 98% (78/80), la P4S del 59% (48/81), la P5RI del 94% (74/79), el AgV del 88% (72/82), y el HP10 del 71% (60/84). Por otra parte, para los LCR provenientes de Neurocisticercosis inactiva con la P1S presentaron un porcentaje de positividad del 15% (4/27) la P2S del 7% (2/27), la P3RS del 90% (19/21), la P3RI del 67% (16/24), la P4S del 26% (7/27), la P5RI del 63% (16/24), el AgV del 85% (23/27), y el HP10 del 22% (6/27). En este set de datos esperábamos un porcentaje de positividad muy bajo. Debido a que, representa a un grupo de sujetos que, si bien contrajeron NC, está ya ha sido resuelta. Por lo cual, esperaríamos que nuestros antígenos pudieran distinguirlos como negativos.

Así pues, en los Paneles del 2 al 4 (no reactivos para NC y provenientes de otras patologías neuroinflamatorias), esperaríamos que los porcentajes de positividad sean cercanos a cero, ya que estos set de datos nos permiten evaluar los verdaderos negativos. Sin embargo, como observamos en el Panel 2 LCR proveniente de Meningitis el porcentaje de positividad fue para la P1S de 8% (1/13) la P2S del 8% (1/13), la P3RS del 80% (4/5), la P3RI del 67% (8/12), la P4S del 44% (4/9), la P5RI del 67% (8/12), el AgV del 62% (8/13), y el HP10 del 15% (2/13).

En el Panel 3 de LCR proveniente de Encefalitis el porcentaje de positividad fue para la P1S de 3% (1/29) la P2S del 10% (3/29), la P3RS del 70% (7/10), la P3RI del 23% (6/26), la P4S del 3% (1/29), la P5RI del 27% (7/26), el AgV del 48% (14/29), y el HP10 del 10% (3/29).

Igualmente, en el Panel 4 de LCR proveniente de otras patologías, el porcentaje de positividad fue para la P1S de 3% (1/29) la P2S del 10% (3/29), la P3RS del 70% (7/10), la P3RI del 23% (6/26), la P4S del 3% (1/29), la P5RI del 27% (7/26), el AgV del 48% (14/29), y el HP10 del 10% (3/29).

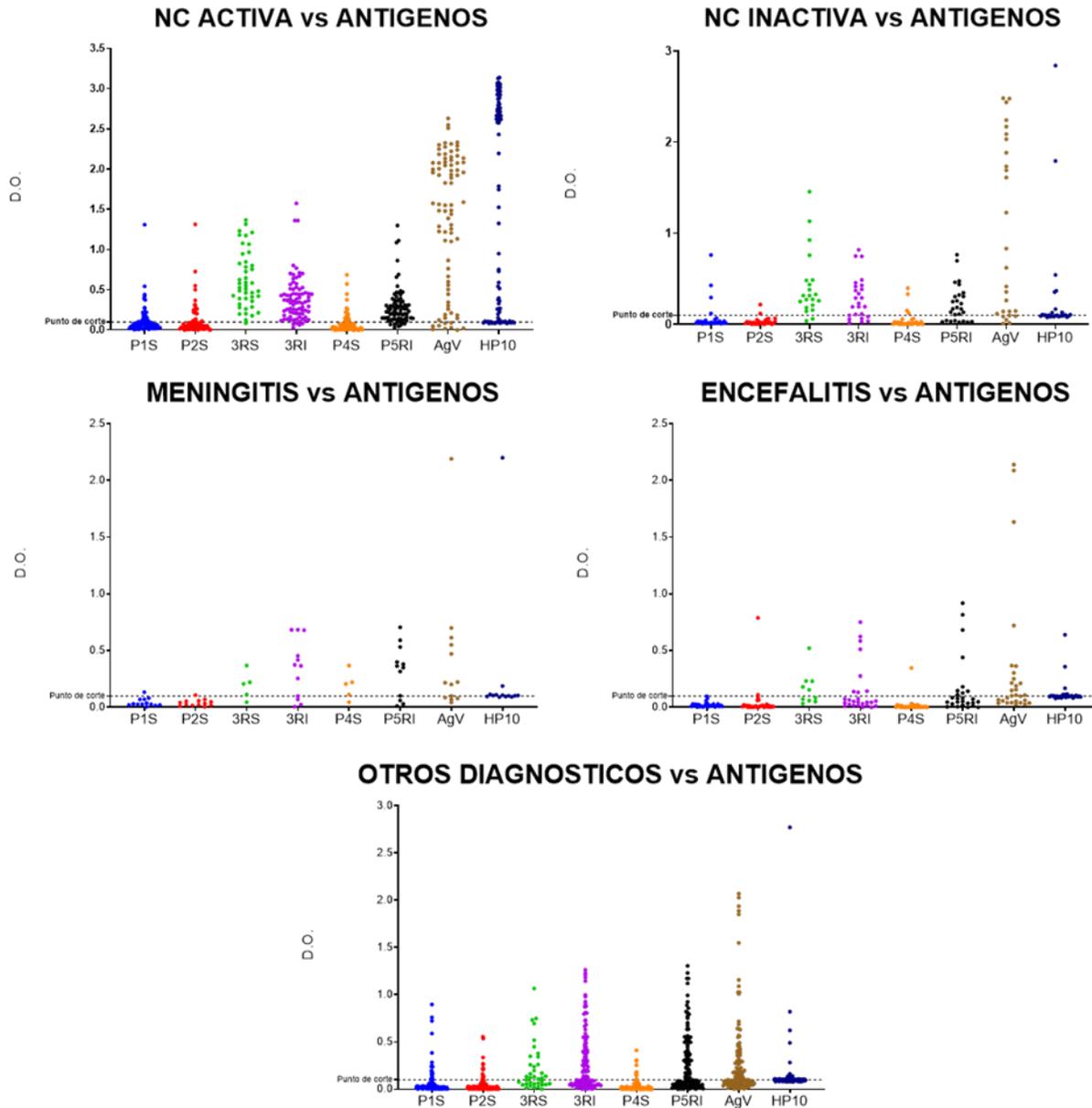


Figura 26. Gráfico de dispersión de los ensayos de Elisa Indirecto de cada uno de los paneles a evaluar (eje X; paneles 1-4) con respecto de los antígenos sintéticos y recombinantes (P1S, P2S P3RS, P3RI, P4S y P5RI) y del control positivo (AgV) Y Gold estándar (HP10), eje Y; valor de D.O de cada una de las muestras).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, realizamos el análisis de nuestras proteínas como antígenos, el control positivo y el estándar a través de curvas ROC, este análisis nos permitió evaluar la sensibilidad (Se), especificidad (Es), área bajo la curva (área bajo la curva; AUC) e inferir el rendimiento de la prueba (índice de Youden). Para este análisis se realizaron dos curvas ROC por cada uno de los antígenos, en la primera grafica (A) utilizamos como grupo de pacientes el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4. Mientras que

para la segunda curva (B) utilizamos como grupo de pacientes solamente al set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

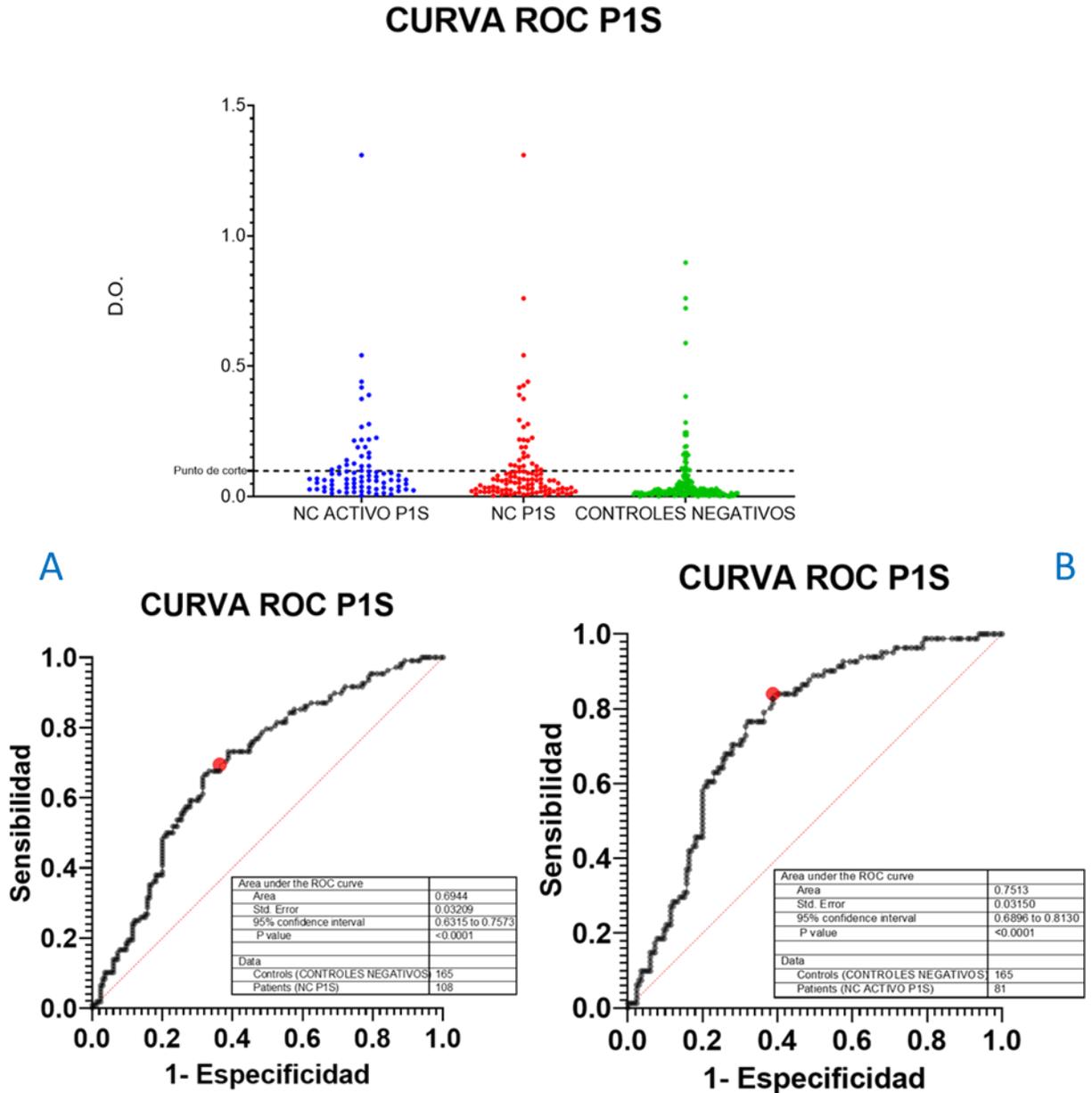


Figura 27. ELISA de la proteína sintética 1 (P1S) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

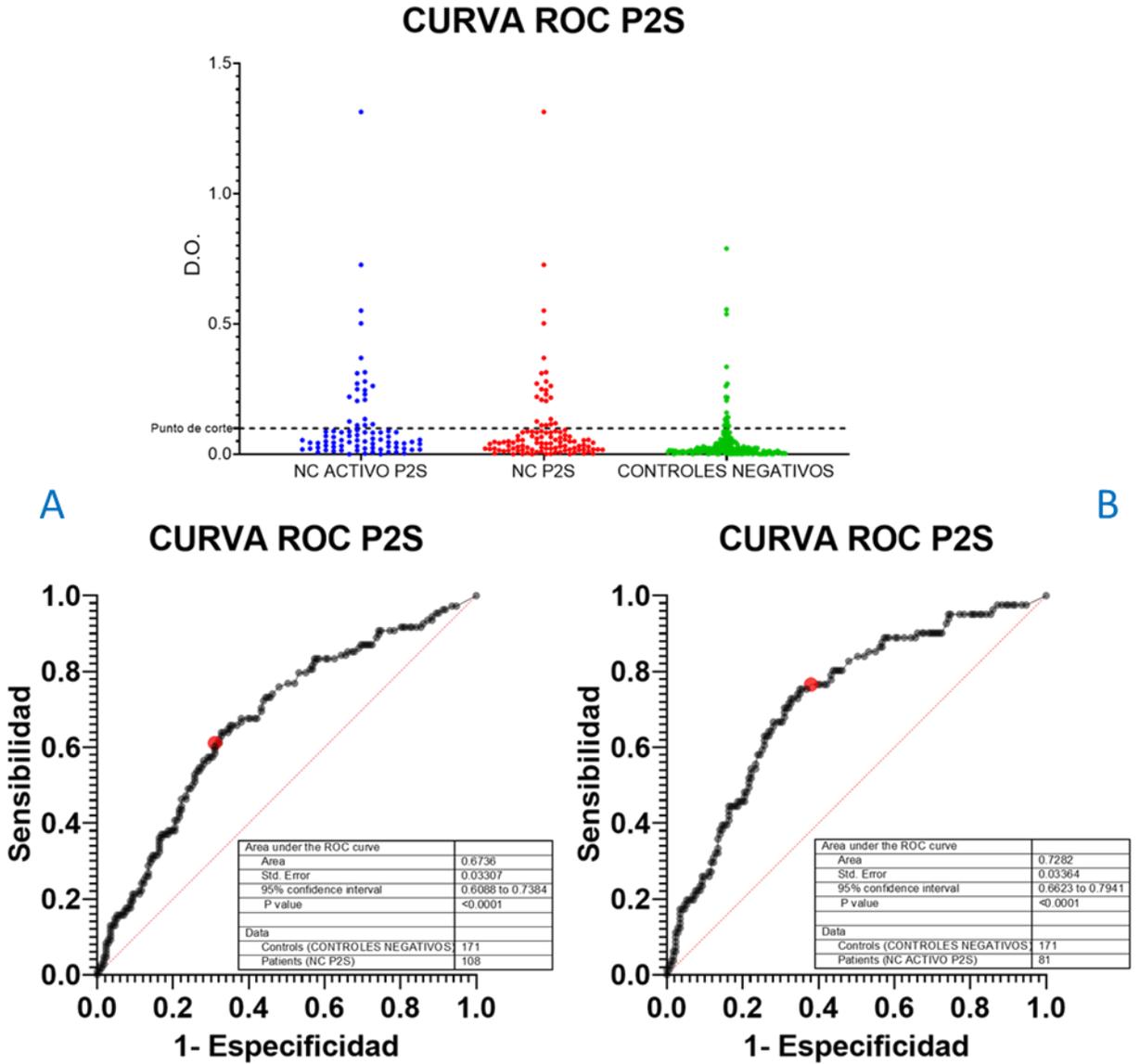


Figura 28. ELISA de la proteína sintética 2 (P2S) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

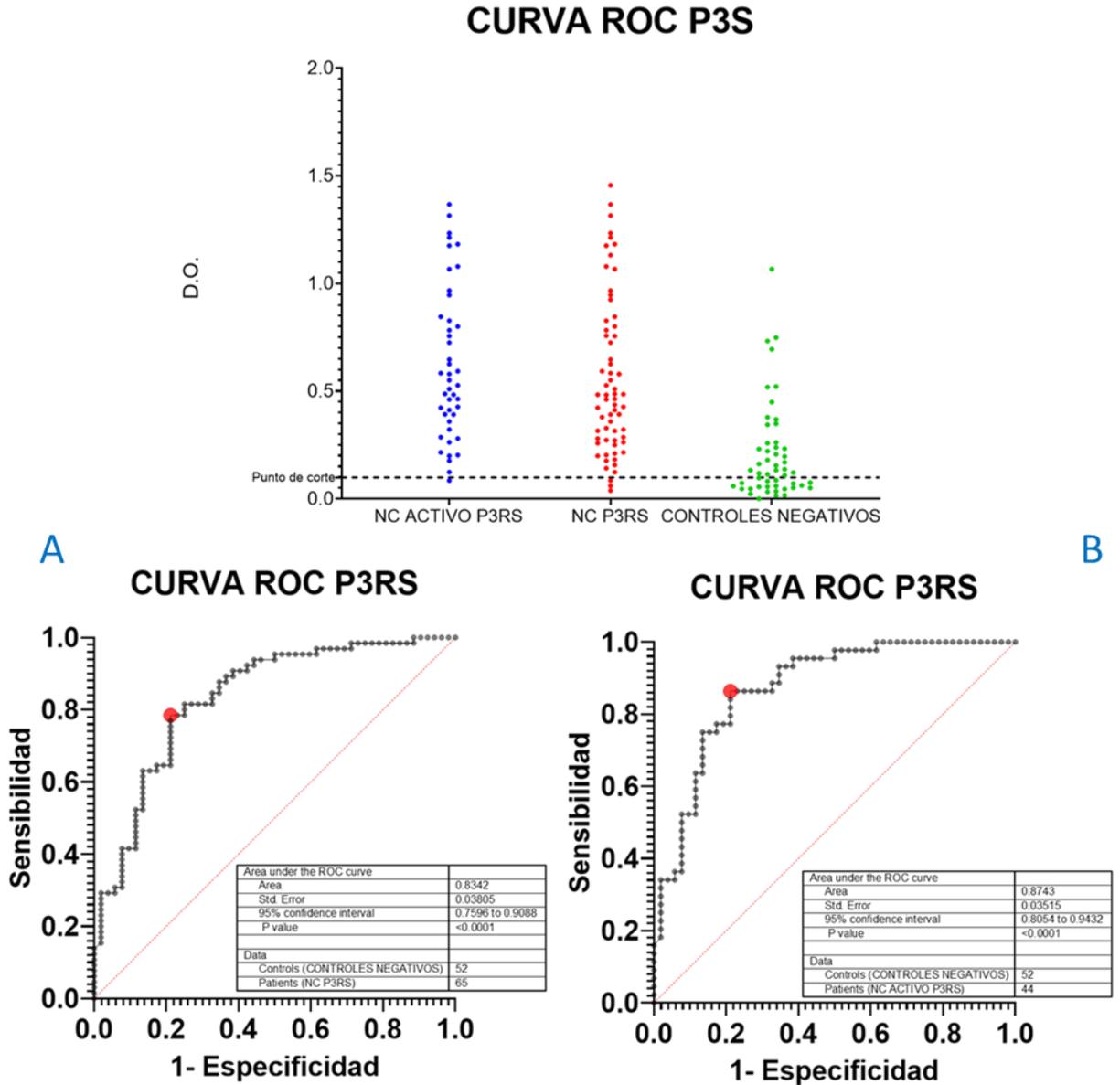


Figura 29. ELISA de la proteína recombinante 3 soluble (P3RS (soluble)) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

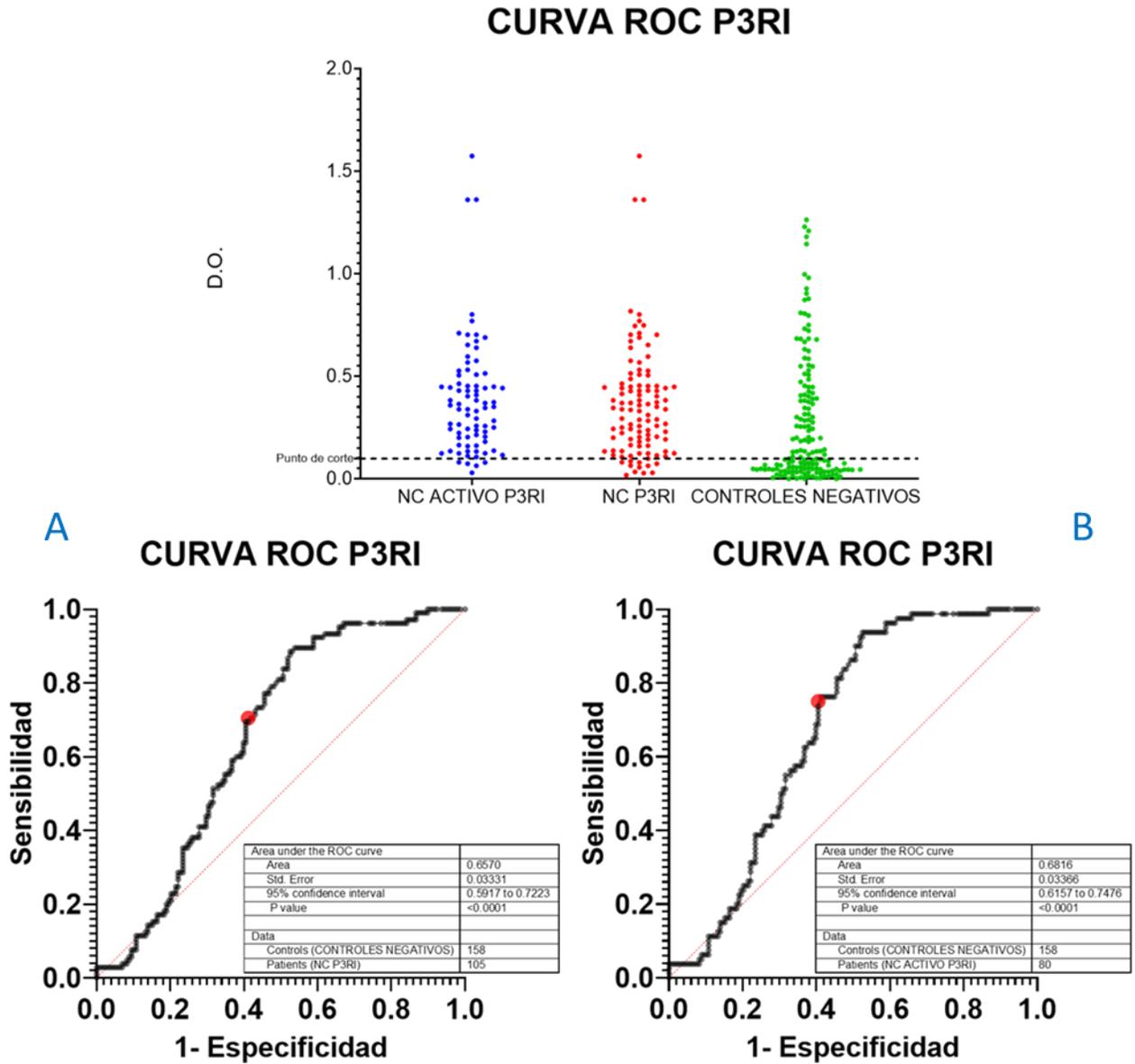


Figura 30. ELISA de la proteína recombinante 3 insoluble (P3RI (insoluble)) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

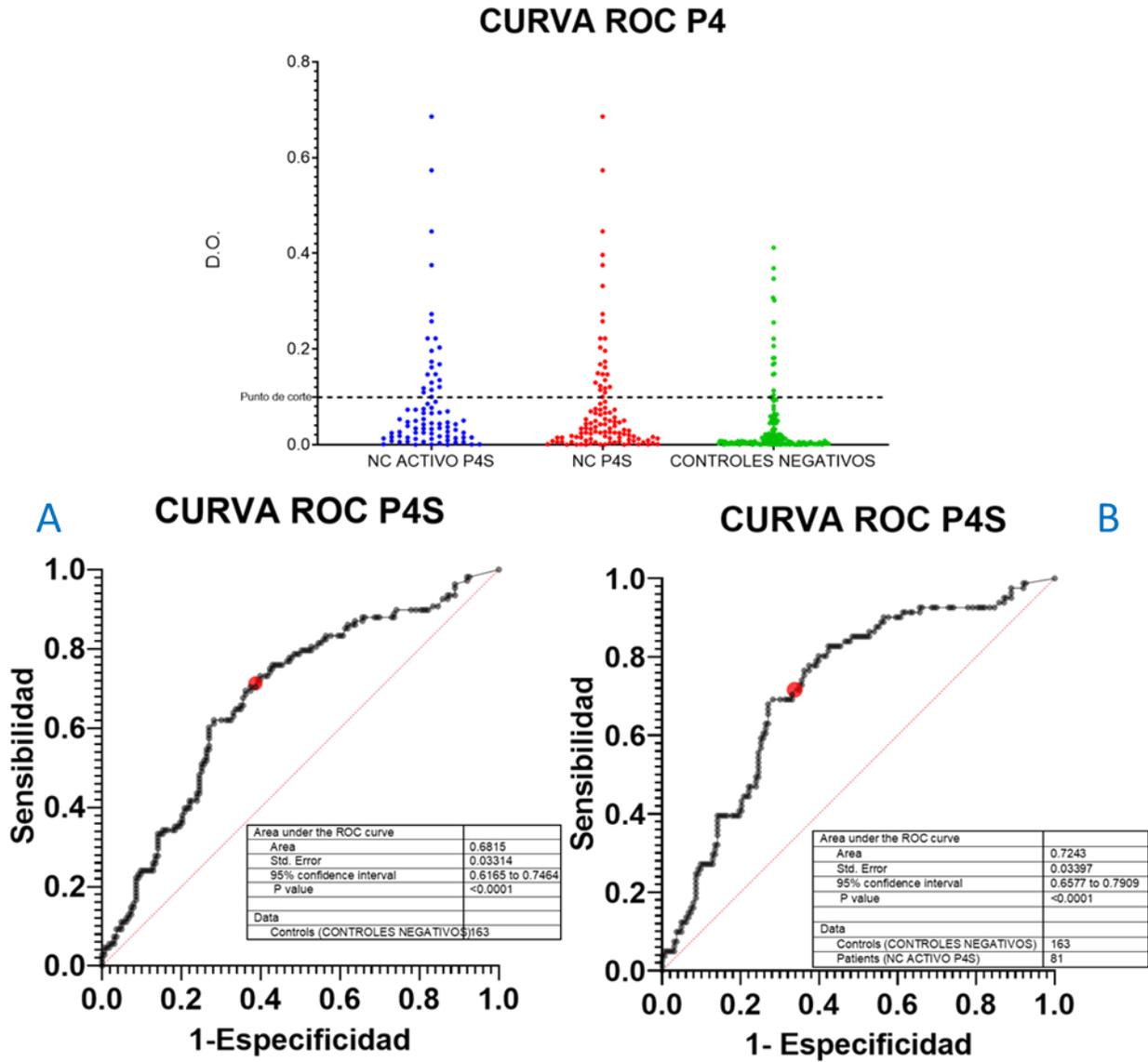


Figura 31. ELISA de la proteína sintética 4 (P4S) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

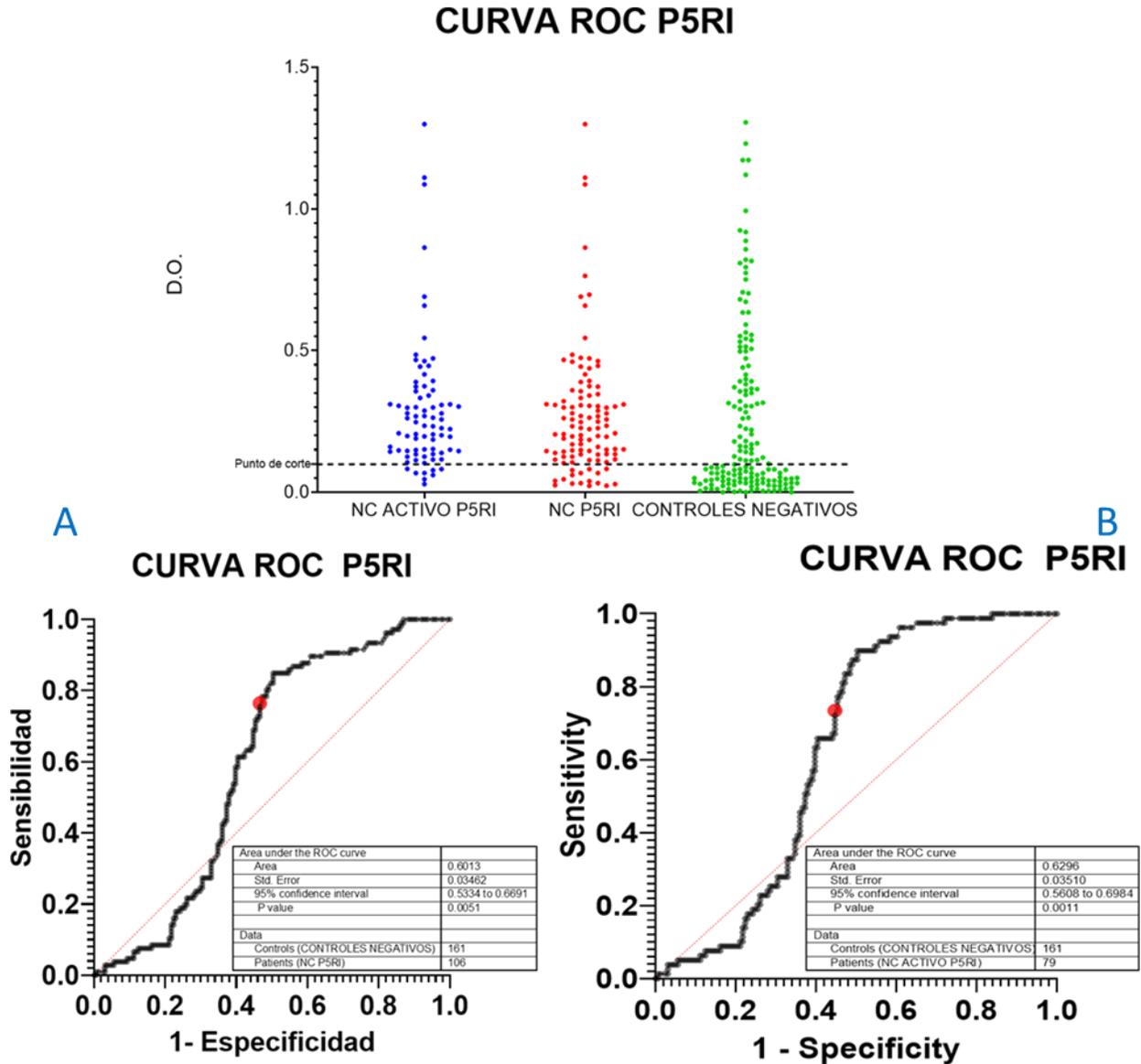


Figura 32. ELISA de la proteína sintética 5 (P5RI (insoluble)) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

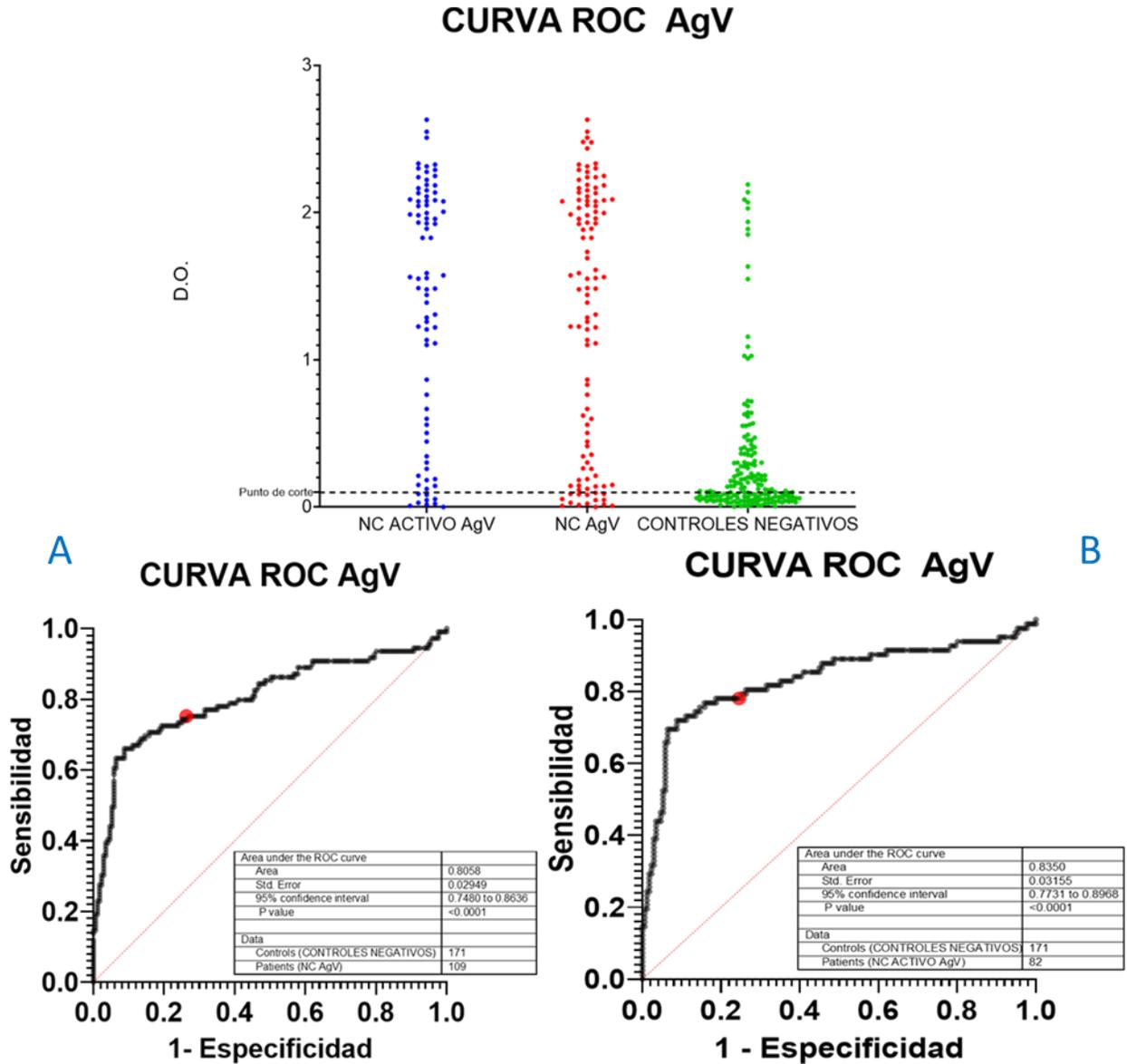


Figura 33. ELISA del antígeno vesicular (AgV) para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

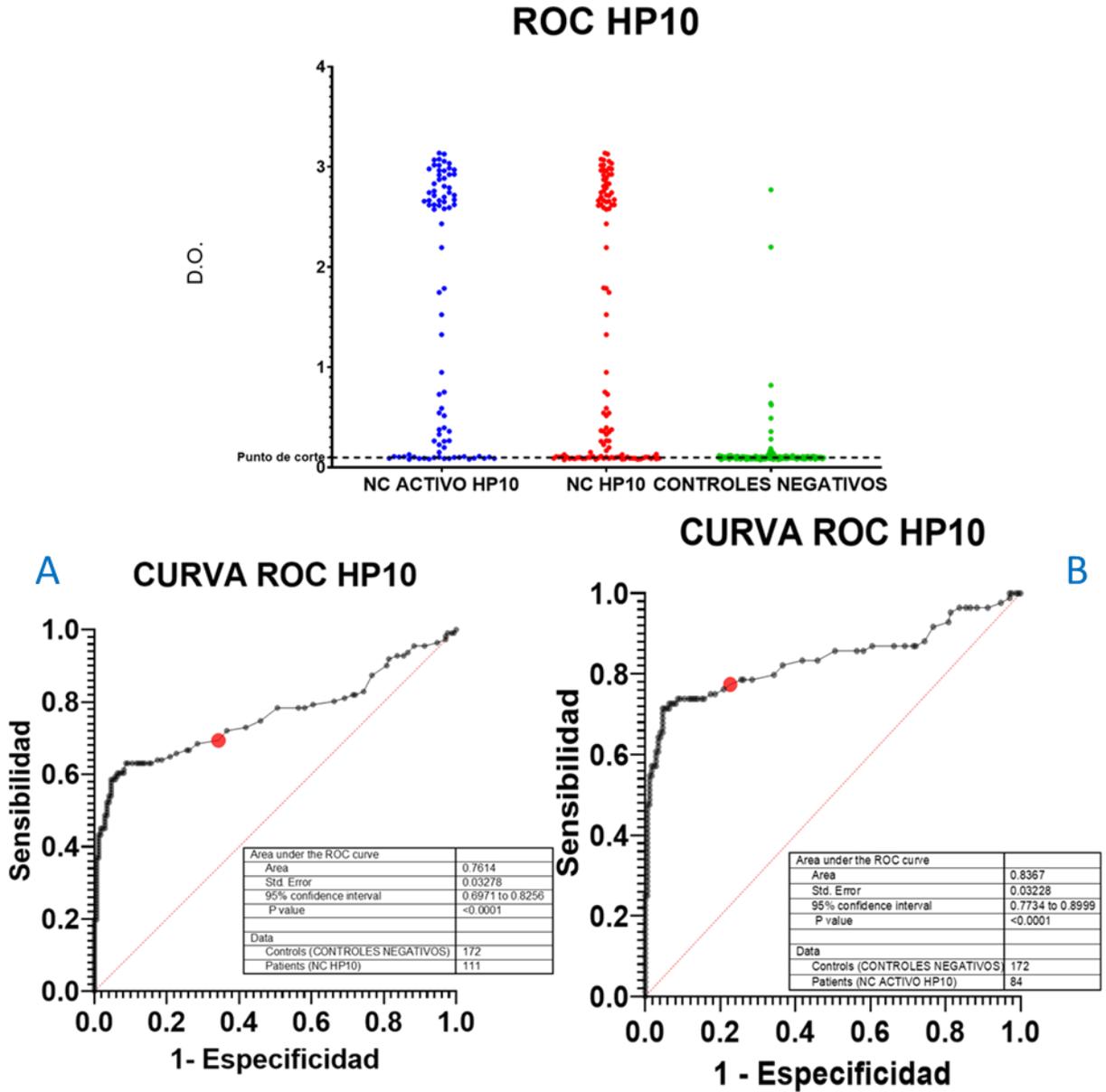


Figura 34. ELISA del antígeno HP10 para la detección de anticuerpos IgG frente a muestras de LCR de pacientes con NC y otras patologías neuroinflamatorias. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), área bajo la curva (área; AUC) e intervalo de confianza al 95% (95%CI). En curva Roc A como pacientes se utilizó el panel 1 (NC activa e inactiva) y como grupo control los paneles 2, 3 y 4, Mientras que para curva ROC B como pacientes se utilizó el set de datos de NC activa y como grupo control los paneles 2, 3 y 4.

El área bajo la curva (AUC) es conocido como el índice de la exactitud global de la prueba. Por lo cual, el AUC de las curvas ROC de cada antígeno evaluado obtenidas comparadas entre ellas. Esto, con el fin de identificar cuál de los antígenos presentaba una mayor capacidad discriminativa en una prueba diagnóstica (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los parámetros obtenidos del análisis de las curvas ROC según cada uno de los antígenos de forma individual, Área bajo la curva (AUC), Sensibilidad (Se), Especificidad (Es).

PARAMETRO	AUC	95% CI	P- VALUE	YOUDEN CUT-POINT		ES	INDICE YOUDEN
				X= 1-ES	Y= SE		
NC vs P1S	0.6944	0.6315 - 0.7573	<0.0001	0.36	0.69	0.61	0.30
NC activa vs P1S	0.7513	0.6896 - 0.8130	<0.0001	0.39	0.83	0.64	0.47
NC vs P2S	0.6736	0.6623 - 0.7941	<0.0001	0.39	0.69	0.61	0.30
NC activa vs P2S	0.7282	0.6088 - 0.7385	<0.0001	0.30	0.61	0.70	0.31
NC vs P3RS	0.8342	0.7596 - 0.9088	<0.0001	0.21	0.78	0.79	0.57
NC activa vs P3RS	0.8743	0.8054 - 0.9432	<0.0001	0.21	0.86	0.79	0.65
NC vs P3RI	0.657	0.5917 - 0.7223	<0.0001	0.41	0.71	0.59	0.30
NC activa vs P3RI	0.6816	0.6157 - 0.7476	<0.0001	0.41	0.75	0.60	0.35
NC vs P4S	0.6815	0.6165 - 0.7464	<0.0001	0.39	0.71	0.61	0.32
NC activa vs P4S	0.7243	0.6577 - 0.7909	<0.0001	0.34	0.72	0.66	0.38
NC vs P5RI	0.6013	0.5334- 0.6691	0.005	0.47	0.76	0.53	0.30
NC activa vs P5RI	0.6296	0.5608 - 0.6984	0.0011	0.45	0.73	0.55	0.28
NC vs AgV	0.8058	0.7480 - 0.8636	<0.0001	0.27	0.75	0.73	0.48
NC activa vs AgV	0.835	0.7731 - 0.8968	<0.0001	0.25	0.78	0.75	0.53
NC vs HP10	0.614	0.6971 - 0.8256	<0.0001	0.34	0.69	0.65	0.34
NC activa vs HP10	0.8367	0.7734 - 0.8999	<0.0001	0.23	0.77	0.77	0.55

Donde pudimos observar que el antígeno con AUC mayor es la proteína 3 recombinante soluble (P3RS; Figura 29), aun por encima del estándar (HP10; Figura 34). Mientras que, el antígeno con menor capacidad discriminativa según el valor de AUC es la proteína 5 recombinante insoluble (P5RI; Figura 32). Para el resto de los antígenos pudimos observar que todas las AUC están por encima de 0.6. lo cual, demuestra que todos los antígenos tienen capacidad discriminativa en menor o mayor forma (Tabla 5).

Por otra parte, el índice de Youden identifica el punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad más alta conjuntamente, es decir informa el rendimiento de una

prueba de diagnóstico en forma dicotómica. Siendo el valor esperado del índice Youden entre 1 y -1, donde encontramos que los datos cercanos a 1 representan una prueba de alto rendimiento sin falsos positivos o negativos, mientras que los valores cercanos a cero indican una prueba inútil que no permite discriminar entre sanos y enfermos. Para lo cual, encontramos que la P3RS es el antígeno que presentaría mayor rendimiento en la prueba diagnóstica, por el contrario de la P5RI la cual presentaría el peor rendimiento.

Finalmente, al evaluar el antígeno P3RS, el cual presento el más alto rendimiento y capacidad discriminativa realizamos la comparación con el estándar (HP10) (Figura 36).

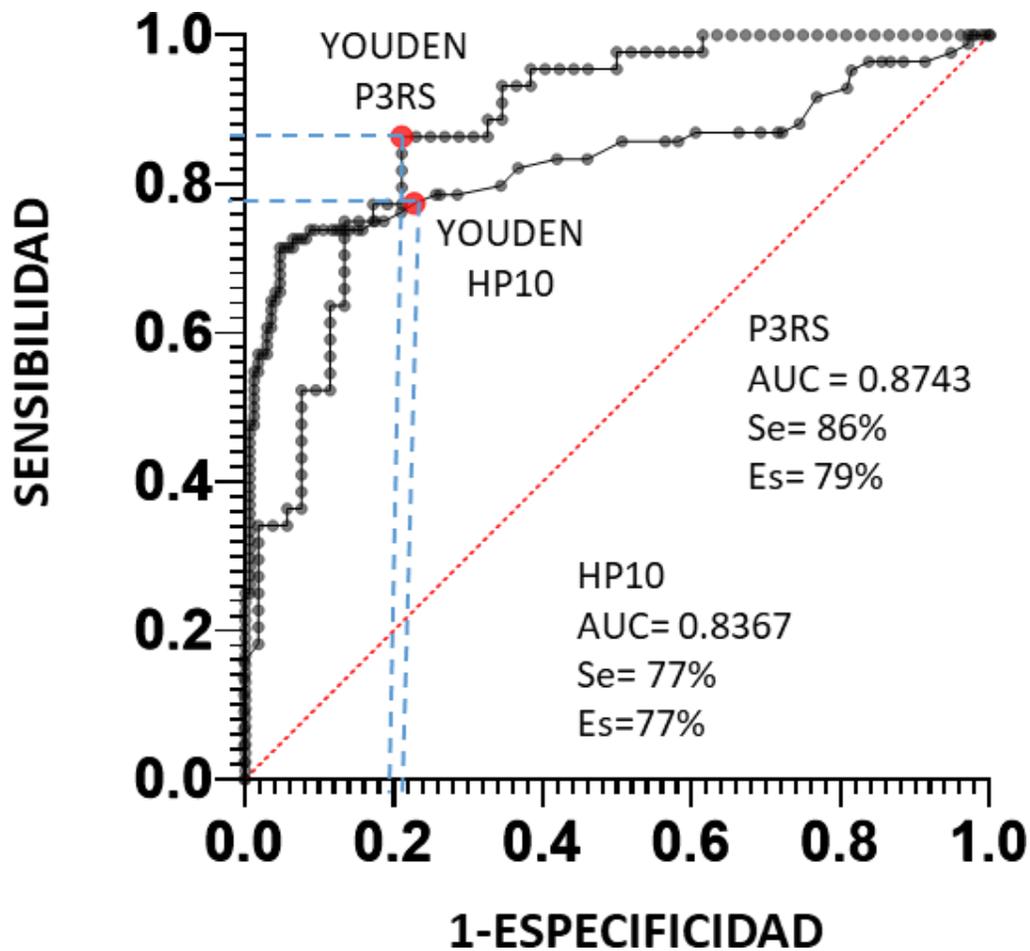


Figura 35. Comparativo de la curva ROC del antígeno P3RS contra la curva ROC del HP10. Donde, observamos la diagonal de referencia o línea de no-discriminación (Línea punteada en rojo), Youden cut-point (spot rojo), el área bajo la curva (área; AUC) de ambas curvas, así como la sensibilidad y especificidad de cada una de ellas (los valores de Sensibilidad (Se) y Especificidad (Es) fueron calculados a través de cálculo matemático).

8 DISCUSIÓN

La neurocisticercosis (NC) es una infección endémica en la mayor parte del mundo, se calcula que el total de personas afectadas es de entre 2,56 y 8,30 millones de personas [32]. Con una distribución de mayor incidencia en países pobres, principalmente en América Latina y el Caribe (LAC). Donde las condiciones de higiene y la salud pública son deficientes [32,40]. La estimación de afectados este alrededor de 14.9 millones de personas con NC en LAC y cerca del 30% de los casos de Epilepsia adquirida son atribuibles a infecciones por *Taenia solium*, lo cual contribuye significativamente a la carga de epilepsia y otras morbilidades neurológicas en todo el mundo [32,40,138,139].

Así mismo, esta situación genera grandes consecuencias en la calidad de vida de la población afectada. Se ha evaluado que los costos del tratamiento y las pérdidas de productividad consumen un 54% del salario mínimo anual durante el primer año de tratamiento, mientras que los síntomas provocan que dos tercios de los asalariados pierdan su empleo [32]. Esto aunado a una enorme carga económica para los sistemas de salud [32]. De ahí la importancia de desplegar esfuerzos para la contención de esta infección, que lamentablemente afecta en mayor proporción a los más desamparados.

Una de las estrategias es el desarrollo de nuevos instrumentos de diagnóstico para la NC mejorados, sencillos y costoeficaces [32]. Sin embargo, el diagnóstico de las diferentes manifestaciones de *Taenia solium* presenta muchos desafíos [139]. Esto aunado a la discordancia existente entre una seroprevalencia extremadamente alta en los focos

endémicos y los relativos pocos casos sintomáticos de la NC en la misma zona [103].

Hasta el momento el diagnóstico de la NC se basa en hallazgos de neuroimagen [138] y aunque este se ha presentado como la herramienta diagnóstica más sensible y específica, en escenarios reales la necesidad de instalaciones adecuadas no está disponible en las comunidades rurales donde la enfermedad es endémica. Lo cual dificulta enormemente la identificación y el tratamiento de los pacientes [32,139].

En consecuencia, nos encontramos ante la necesidad del uso masivo de las pruebas serológicas [139]. Sin embargo, si bien es cierto que en la actualidad se cuenta ya con diversas pruebas serológicas, estas no son lo suficientemente sensibles y/o específicas. Además de no estar disponibles comercialmente, ser costosas, o no han sido debidamente validadas [32].

Por lo tanto, uno de los retos más grandes a los que nos enfrentamos es a la necesidad de mejores herramientas de diagnóstico serológico que nos permitan reducir la dependencia al diagnóstico por neuroimagen [63,138,140,141]. Así mismo es necesario monitorear el resultado de los esfuerzos de control de la parasitosis desde el interior de las zonas endémicas [142]. Como lo definió la OMS en su reunión sobre la erradicación de *Taenia solium* [32,142].

Bajo ese contexto, en el presente trabajo desarrollamos un método diagnóstico en el cual seleccionamos proteínas candidato que no han sido utilizadas con anterioridad permitiendo la mejorar el diagnóstico para la NC.

En este trabajo fueron identificados 5 antígenos candidato (los antígenos P3RS, P3RI y P5RI y los antígenos P1S, P2S y P4S) a través de una novedosa estrategia Proteómico/bioinformática que derivó en el desarrollo de un nuevo método que permite identificar posibles dianas terapéuticas, vacunales y diagnósticas a través de la identificación de proteínas de secreción (ESP) a la cual hemos nombrado método de secuenciación teórica (TS-LEP).

TS-LEP es altamente interesante, debido a que a través de este método nos fue posible identificar proteínas secretadas (ESP) por los cisticercos de *Taenia solium* independientemente de su expresión relativa, para lo cual hicimos uso del punto isoeléctrico y el peso molecular de cada proteína [137]. Esta estrategia nos permitió analizar a profundidad el proteoma de *Taenia*

solium y descubrir nuevos candidatos que de otra forma no hubieran sido identificados. Ya sea porque son enmascarados por proteínas más grandes o porque simplemente se producen en tan poca cantidad que su secuenciación por espectrometría de masas es imposible [137].

Así en este trabajo se seleccionaron y expresaron proteínas de secreción/excreción del cisticerco de *T. solium*. Donde, se evaluaron 5 proteínas antigénicas por ELISA para la detección de anticuerpos anti-IgG de *Taenia solium* en líquido cefalorraquídeo (LCR), tanto en sujetos con diagnóstico definitivo de neurocisticercosis activa (etapa vesicular, cisticerco vivo) (Panel 1, NC Activa), como en un panel de diagnóstico definitivo de neurocisticercosis inactiva (etapa calcificada, cisticerco muerto) (Panel 1, NC inactiva). Donde pudimos observar que el porcentaje de positividad de la proteína P3 (soluble e insoluble) es mayor (98 %) que la encontrada en las proteínas P1, P2 y P4 (41%, 37%, 59% respectivamente), AgV (88%), y HP10 (71%). Lo cual nos indica que la proteína P3 es la más eficaz para detectar anticuerpos dirigidos a ellas. Este resultado era esperado ya que existen reportes del uso de proteínas de secreción para el diagnóstico de NC (Tabla 1).

El hecho que la proteína tres resultara el candidato más prometedor es interesante, ya que desde su caracterización mostró ser una proteína altamente antigénica. La cual, cuenta con 4 regiones antigénicas, todas ellas validadas a través de 4 algoritmos diferentes que coincidieron entre si (Antigenic Propensity, Bepipred, Cbtope y SVMTrip). Este dato es muy importante teniendo en cuenta su pequeño tamaño de aproximadamente 10.5kDa (288 pb).

Además, en un trabajo previo [114] desarrollamos un método que permitía evaluar el potencial de antigenicidad de una proteína teniendo en cuenta su tamaño y su número de regiones antigénica; este método lo llamamos abundancia de regiones antigénicas (AAR). El valor AAR se utilizó para definir el número de aminoácidos entre las regiones antigénicas por secuencia. Por tanto, valores bajos de AAR significan que la proteína tiene más regiones antigénicas (más densidad de epítomos) [114]. Además, reportamos que las proteínas somáticas tienen un valor promedio de AAR de 42.1, mientras que las proteínas de secreción tienen un valor de AAR de 26.2 (casi el doble de antigénicas que las proteínas somáticas). Interesantemente, la proteína 3 tiene un valor de AAR de 23.8, como podemos observar esta proteína se encuentra que por debajo del promedio de las proteínas ya de por si

antigénicas. Lo cual, nos ratifica su gran potencial antigénico.

Lamentablemente, la producción de la proteína 3 de forma recombinante soluble en un sistema procarionte es una de las grandes limitantes que encontramos. Si bien fue posible su producción, fue todo un reto, ya que la cantidad de proteína producida fue baja, limitando así la posibilidad de realizar más experimentos que nos permitieran evaluar en su totalidad la capacidad antigénica de la misma. Desgraciadamente, no pudimos evaluar su desempeño con la totalidad de los paneles de LCR, de ahí que quizá su sensibilidad y especificidad (86% Se y 79% Es) en los ensayos de ELISA no sea tal como lo esperábamos.

Adicionalmente, sería interesante probar nuestra prueba diagnóstica tanto en LCR como de suero. Ya que actualmente existe una discrepancia entre las publicaciones, donde algunos estudios han informado sobre una mayor sensibilidad en el ELISA utilizando LCR para la detección de anticuerpos en el diagnóstico de NCC [64,94,143,144]. Mientras que otros estudios [8,95,145] han reportado una mayor sensibilidad en el ELISA utilizando suero.

Además, un punto a tomar en cuenta en el diseño de una prueba serológica es la obtención de LCR que es difícil operativamente, más aún en las regiones endémicas de la NC. Por lo cual, todo parece indicar que el uso de suero en la prueba diagnóstica sería lo más beneficioso con el fin de establecer el diagnóstico en los focos endémicos.

Por otra parte, otra limitante que encontramos en este estudio es que al no existir una prueba Gold estándar para la NC, decidimos utilizar al HP10. El cual, evalúa la captura de

antígenos en el LCR, mientras que nuestra prueba diagnóstica está diseñada para la detección de anticuerpos en LCR. Por lo cual, ambos métodos no pueden ser comparados del todo. Sin embargo, nuestros hallazgos nos permiten proponer el diseño de un ELISA que capture a la proteína de secreción 3 como un antígeno en los LCR de pacientes con NC. Para esto se utilizaría a la proteína 3 como un inmunógeno para generar anticuerpos monoclonales con los cuales se podría diseñar un ELISA en sándwich para el diagnóstico de la NC.

Finalmente, como pudimos observar el desempeño de las proteínas candidato que fueron sintetizadas en Apeptide (P1, P2 y P4) fue significativamente más bajo que aquellas proteínas que se pudieron producir de forma recombinante en *E coli* (P3 y P5). Esto podría ser debido a que las proteínas P1, P2 y P4 a Apeptide no incluyen ningún tipo de modificación postraduccional. Ya que como es bien sabido, la diferencia principal entre las proteínas recombinantes y las sintéticas tiene que ver con la presencia de modificaciones postraducionales que los distintos sistemas de expresión permiten. Si bien, los péptidos sintéticos son susceptibles a añadir algunas de las modificaciones postraducionales más comunes, las opciones aún son muy limitadas, sobre todo en el caso de las glicosilaciones. Y particularmente en el caso de *Taenia solium* las glicoproteínas han sido reportadas como altamente antigénicas [73].

Debido a lo cual, una de las perspectivas para este trabajo sería la producción de forma recombinante de las 5 proteínas candidato en un sistema de expresión eucarionte, que como sabemos una de sus grandes ventajas que ofrecen es la inserción de todas las modificaciones postraducionales que contiene de forma natural la proteína de interés.

9 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El uso de la estrategia TS LEP nos permitió identificar proteínas que, debido a su concentración, no es posible conocer su secuencia. Además de su clasificación como proteínas conservadas o diferenciales entre cultivos de cisticerco, también nos permitió predecir su función biológica.
2. Se seleccionaron las proteínas candidatas con una alta antigenicidad para su expresión como

proteínas recombinantes. Las cuales, no presentan homología con ninguna proteína publicada en la base de datos de proteínas no redundantes de NCBI. así como tampoco en los genomas de parásitos evolutivamente cercanos.

3. El método TS LEP permite la identificación y secuenciación teórica de proteínas que por su tamaño o expresión relativa que hasta el momento era imposible caracterizar.
4. La proteína 3 tiene futuro como diagnóstico, solo hay que mejorar la eficiencia de su expresión, quizá a través de su clonación en una cepa eucarionte.
5. En un diseño posterior se producirían anticuerpos anti-P3RS con el fin de buscar el antígeno P3 en LCR de pacientes con NC, una vez que ya se ha confirmado que este es el antígeno que presenta la mayor sensibilidad y especificidad.

10 REFERENCIAS

1. Gomez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Scitutto E, et al. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). *Scientific Reports*. 2015;5: 9683. doi:10.1038/srep09683
2. Levine MZ, Calderón S JC, Wilkins PP, Lane WS, Asara JM, Hancock K, et al. CHARACTERIZATION, CLONING, AND EXPRESSION OF TWO DIAGNOSTIC ANTIGENS FOR TAENIA SOLIUM TAPEWORM INFECTION. *Journal of Parasitology*. 2004;90: 631–638. doi:10.1645/GE-189R
3. Ochoa-Sánchez A, Jiménez L, Landa A. The hamster model for identification of specific antigens of *taenia solium* tapeworms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011;2011: 504959. doi:10.1155/2011/504959
4. Sarti E. [Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*]. *Salud publica de Mexico*. 1997;39: 225–31. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9304227/>
5. del Brutto O, Sotelo J. Neurocysticercosis: an update. *Reviews of infectious diseases*. 1988;10: 1075–1087. doi:10.1093/CLINIDS/10.6.1075
6. Victor B, Kanobana K, Gabri S. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion – secretion proteins. *Proteomics*. 2012;12: 1860–1869. doi:10.1002/pmic.201100496

7. Garcia HH, Nash TE, del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2014. pp. 1202–1215. doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8
8. Ferrer E. Teniasis/Cisticercosis: Avances en diagnóstico inmunológico y molecular. *Bol Mal Salud Amb* v46 n1 Maracay. 2006;v.46 n.1. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482006000100001
9. Larralde C, Aluja AS de. Cisticercosis: Guía para Profesionales de la Salud Editor's Note ... *Journal of Parasitology*. 2007;93: 975–976. doi:10.1645/GE-1379.1
10. Sotelo J, del Brutto O. Review of neurocysticercosis. *Neurosurgical focus*. 2002;12. doi:10.3171/FOC.2002.12.6.2
11. Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes M del R, Duarte-Escalante E, Vega R, de Aluja AS, et al. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2010;168: 130–135. doi:10.1016/J.VETPAR.2009.11.001
12. Fleury A, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. 2005;116: 271–278. doi:10.1016/j.clim.2005.04.008
13. Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopez-Vidal Y, Dominguez-Alpizar J, et al. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *The Journal of parasitology*. 2003;89: 1250–1254. doi:10.1645/GE-2786RN
14. Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, et al. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *International journal for parasitology*. 2003;33: 1479–1485. doi:10.1016/S0020-7519(03)00206-6
15. Willingham A, Engels D. Control of *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. *Advances in parasitology*. 2006;61: 509–566. doi:10.1016/S0065-308X(05)61012-3
16. Atluri SR v, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Neurocysticercosis immunodiagnosis using *Taenia solium* cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children. *Acta tropica*. 2009;110: 22–7. doi:10.1016/j.actatropica.2008.12.004

17. Garcia HH, Nash TE, del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology*. Lancet Publishing Group; 2014. pp. 1202–1215. doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8
18. Schneider MC, Aguilera XP, da Silva Junior JB, Ault SK, Najera P, Martinez J, et al. Elimination of neglected diseases in Latin America and the Caribbean: A mapping of selected diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5. doi:10.1371/journal.pntd.0000964
19. Franco-Paredes C, Jones D, Rodríguez-morales AJ, Santos-Preciado JI. Commentary: improving the health of neglected populations in Latin America. *BMC Public Health*. 2007;7: 11. doi:10.1186/1471-2458-7-11
20. WHO. Thirteenth meeting of the Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases. 15 Sep 2020 [cited 24 Oct 2021] pp. 1–35. Available: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/337502/9789240015098-eng.pdf?sequence>
21. Sciotto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: Protection and injury. *Parasite Immunology*. 2007;29: 621–636. doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00967.x
22. 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. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2007;78: 970–974. doi:10.1136/jnnp.2006.107243
23. Garcia HH, del Brutto OH. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *The Lancet Neurology*. 2005;4: 653–661. doi:10.1016/S1474-4422(05)70194-0
24. Hoberg E. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and infection*. 2002;4: 859–866. doi:10.1016/S1286-4579(02)01606-4
25. Pérez-López C, Isla-Guerrero A, Alvarez F, Budke M, Fernandez-Miranda JC, Paz JF, et al. [Update in neurocysticercosis treatment] . *Rev Neurol* . 2003;36(9):805–11: 1–15. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12717665/>
26. del Brutto OH. [Neurocysticercosis]. *Revista de neurologia*. 1999;29: 456–466. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10584250/>

27. Nash T, Garcia H. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nature reviews Neurology*. 2011;7: 584–594. doi:10.1038/NRNEUROL.2011.135
28. Michelet L, Fleury A, Sciutto E, Kendjo E, Fragoso G, Paris L, et al. Human Neurocysticercosis: Comparison of Different Diagnostic Tests Using Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol*. 2011;49: 195–200. doi:10.1128/JCM.01554-10
29. Fleury A, Morales J, Bobes R, Dumas M, Yáñez O, Piña J, et al. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;100: 551–558. doi:10.1016/J.TRSTMH.2005.08.008
30. Fleury A, Beltran C, Ferrer E, Garate T, Harrison LJ, Parkhouse R, et al. Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis. *Tropical medicine & international health: TM & IH*. 2003;8: 1124–1130. doi:10.1046/J.1360-2276.2003.01132.X
31. Quet F, Preux PM, Huerta M, Ramirez R, Abad T, Fragoso G, et al. Determining the burden of neurological disorders in populations living in tropical areas: who would be questioned? Lessons from a Mexican rural community. *Neuroepidemiology*. 2011;36: 194–203. doi:10.1159/000327496
32. World Health Organization. Teniasis y cisticercosis, notas descriptivas. 23 Mar 2020 [cited 24 Oct 2021]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
33. Jafri HS, Torrico F, Noh JC, Bryan RT, Balderrama F, Pilcher JB, et al. Application of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot to filter paper blood spots to estimate seroprevalence of cysticercosis in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;58: 313–315.
34. Diaz Camacho S, Candil Ruiz A, Uribe Beltrán M, Willms K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1990;84: 563–566. doi:10.1016/0035-9203(90)90041-C
35. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez O I, Aguilera J, et al. Epidemiological investigation of taenia solium taeniasis and cysticercosis in a rural

- village of Michoacan state, Mexico. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1994;88: 49–52. doi:10.1016/0035-9203(94)90493-6
36. Garcia H, Araoz R, Gilman R, Valdez J, Gonzalez A, Gavidia C, et al. Increased prevalence of cysticercosis and taeniasis among professional fried pork vendors and the general population of a village in the Peruvian highlands. Cysticercosis Working Group in Peru. The American journal of tropical medicine and hygiene. 1998;59: 902–905. doi:10.4269/AJTMH.1998.59.902
 37. Garcia-Noval J, Allan JC, Fletes C, Moreno E, de Mata F, Torres-Alvarez R, et al. Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1996;55: 282–289.
 38. Allan JA, Velasquez-Tohom M, Garcia-Noval J, Torres-Alvarez R, Yurrita P, Fletes C, et al. Epidemiology of intestinal taeniasis in four, rural, Guatemalan communities. Annals of tropical medicine and parasitology. 1996;90: 157–165. doi:10.1080/00034983.1996.11813039
 39. Sánchez A, Gomez O, Allebeck P, Cosenza H, Ljungström L. Epidemiological study of *Taenia solium* infections in a rural village in Honduras. Annals of tropical medicine and parasitology. 1997;91: 163–171. doi:10.1080/00034983.1997.11813126
 40. Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih E, Praet N, Benitez W, Dorny P. *Taenia solium* Human Cysticercosis: A Systematic Review of Sero-epidemiological Data from Endemic Zones around the World. PLoS neglected tropical diseases. 2015;9. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0003919
 41. Carpio A, Romo M. State of the art in neurocysticercosis: Imaging and epidemiology. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2016;9: 821–822. doi:10.1016/J.APJTM.2016.06.010
 42. WHO. Derecho de Autor. [cited 26 Oct 2021]. Available: <https://www.who.int/es/about/policies/copyright>
 43. Noya O, Patarroyo M, Guzman F, de Noya B. Immunodiagnosis of Parasitic Diseases with Synthetic Peptides. Current Protein & Peptide Science. 2003;4: 299–308. doi:10.2174/1389203033487153
 44. Sahu PS, Parija SC, Narayan SK, Kumar D. Evaluation of an IgG-ELISA strategy using

- Taenia solium* metacestode somatic and excretory-secretory antigens for diagnosis of neurocysticercosis revealing biological stage of the larvae. *Acta Tropica*. 2009;110: 38–45. doi:10.1016/j.actatropica.2009.01.002
45. Leon N, Padilla C, Pajuelo M, Sheen P, Zimic M. [Cathepsin L cysteine protease from *Taenia solium*: its biological role in the infection and potential use for the immunodiagnosis of neurocysticercosis]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2013;30: 446–454. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100821>
46. Gutierrez-Loli R, Orrego MA, Sevillano-Quispe OG, Herrera-Arrasco L, Guerra-Giraldez C. MicroRNAs in *Taenia solium* Neurocysticercosis: Insights as Promising Agents in Host-Parasite Interaction and Their Potential as Biomarkers. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8: 1905. doi:10.3389/fmicb.2017.01905
47. San-Juan Orta D, Rodríguez Zubia E, Janeth Gómez González G, Vázquez Gregorio R, Miguel Tabera Tarello P, Fleury A. Neurocysticercosis y epilepsia. *Anales médicos*. 2014;59: 212–218. Available: www.medigraphic.org.mx
48. WHO. Teniasis y cisticercosis. [cited 26 Oct 2021]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
49. Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G, Sciotto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology*. 2005;116: 271–278. doi:10.1016/j.clim.2005.04.008
50. Sáenz B, Fleury A, Chavarría A, Hernández M, Crispin JC, Vargas-Rojas MI, et al. Neurocysticercosis: Local and systemic immune-inflammatory features related to severity. *Medical Microbiology and Immunology*. 2012;201: 73–80. doi:10.1007/s00430-011-0207-0
51. Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciotto E. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. pp. 147–157. doi:10.1111/pim.12299
52. Sciotto E, Cárdenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Larralde C, Fleury A. Human neurocysticercosis: Immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes and Infection*. 2013. pp. 524–530. doi:10.1016/j.micinf.2013.03.007

53. Adalid-Peralta L, Fleury A, García-Ibarra T, Hernández M, Parkhouse M, Crispín J, et al. Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *The Journal of parasitology*. 2012;98: 142–148. doi:10.1645/GE-2839.1
54. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infection and Immunity*. 2001;69: 4554–4560. doi:10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001
55. Escobar A. The pathology of neurocysticercosis. : Palacios E, Rodriguez-Carbajal J, Taveras JM, eds *Cysticercosis of the central nervous system* Springfield: Charles CThomas. 1983; 27–54. Available: [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2530874](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2530874)
56. Madrazo I, García-Rentería J, Sandoval M, López Vega F. Intraventricular cysticercosis. *Neurosurgery*. 1983;12: 148–152. doi:10.1227/00006123-198302000-00003
57. Schantz P. Parasitic zoonoses in perspective. *International journal for parasitology*. 1991;21: 161–170. doi:10.1016/0020-7519(91)90006-S
58. Schantz P, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales J, Roberts J, et al. Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1994;18: 879–885. doi:10.1093/CLINIDS/18.6.879
59. Carpio A, Fleury A, Kelvin EA, Romo ML, Abraham R, Tellez-Zenteno J. New guidelines for the diagnosis and treatment of neurocysticercosis: a difficult proposal for patients in endemic countries. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2018;18: 743–747. doi:10.1080/14737175.2018.1518133
60. del Brutto O. Cysticercosis and cerebrovascular disease: a review. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1992;55: 252–254. doi:10.1136/JNNP.55.4.252
61. del Brutto O, Nash T, White A, Rajshekhar V, Wilkins P, Singh G, et al. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Journal of the neurological sciences*. 2017;372: 202–210. doi:10.1016/J.JNS.2016.11.045

62. Garcia HH. Neurocysticercosis. *Neurologic Clinics*. 2018;36: 851–864.
63. Carpio A, Fleury A, Romo M, Abraham R. Neurocysticercosis: the good, the bad, and the missing. *Expert review of neurotherapeutics*. 2018;18: 289–301. doi:10.1080/14737175.2018.1451328
64. Nascimento E, Tavares C, Lopes J. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. *Journal of clinical microbiology*. 1987;25: 1181–1185. doi:10.1128/JCM.25.7.1181-1185.1987
65. Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clinical and Experimental Immunology*. 1980;39: 27. Available: </pmc/articles/PMC1537930/?report=abstract>
66. Flisser A, Espinoza B, Tovar A, Plancarte A, Correa D. Host--parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Veterinary parasitology*. 1986;20: 95–102. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3705428>
67. Diwan AR, Coker-Vann M, Brown P, Subianto DB, Yolken R, Desowitz R, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1982;31: 364–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7072900>
68. Larralde C, Laclette J, Owen C, Madrazo I, Sandoval M, Bojalil R, et al. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1986;35: 965–973. doi:10.4269/AJTMH.1986.35.965
69. Harrison L, Joshua G, Wright S, Parkhouse R. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite immunology*. 1989;11: 351–370. doi:10.1111/J.1365-3024.1989.TB00673.X
70. Diaz JF, Verastegui M, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Gallo C, et al. Immunodiagnosis of Human Cysticercosis (*Taenia solium*): a Field Comparison of an Antibody-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), an Antigen-ELISA, and an Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) Assay in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;46: 610–615. doi:10.4269/AJTMH.1992.46.610

71. Garcia E, Ordoñez G, Sotelo J. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33: 3324–5. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586728>
72. Greene RM, Hancock K, Wilkins PP, Tsang VC. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *The Journal of parasitology*. 2000;86: 1001–7. doi:10.1645/0022-3395(2000)086[1001:TSMCAS]2.0.CO;2
73. Tsang V, Brand J, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*) - PubMed. *J Infect Dis*. 1989;159: 50–59. doi:10.1093/infdis/159.1.50
74. Ferreira A, Vaz A, Nakamura P, Sasaki A, Ferreira A, Livramento J. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1997;39: 29–33. doi:10.1590/S0036-46651997000100006
75. Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY, et al. Novel antigens for neurocysticercosis: Simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59. doi:10.4269/ajtmh.1998.59.291
76. Ev L v., Maia AAM, Pianetti G, Nascimento E. Immunological evaluation of a 2g-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitology Research*. 1999;85. doi:10.1007/s004360050516
77. Chung J, Bahk YY, Huh S, Kang S, Kong Y, Cho S. A Recombinant 10-kDa Protein of *Taenia solium* Metacestodes Specific to Active Neurocysticercosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999;180: 1307–1315. doi:10.1086/315020
78. Singh G, Kaushal V, Ram S, Kaushal RK, Dhanuka AK, Khurana S. Cysticercus immunoblot assay in patients with single, small enhancing lesions and multilesional neurocysticercosis. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 1999;47: 476–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778553>
79. Pardini AX, Vaz AJ, dos Ramos Machado L, Livramento JA. Cysticercus antigens in

- cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39. doi:10.1128/JCM.39.9.3368-3372.2001
80. Das S, Mahajan RC, Ganguly NK, Sawhney IMS, Dhawan V, Malla N. Detection of antigen B of *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Tropical Medicine & International Health*. 2002;7: 53–58. doi:10.1046/J.1365-3156.2002.00810.X
81. Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, et al. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41: 2577–2586. doi:10.1128/JCM.41.6.2577-2586.2003
82. Parija M, Biswas R, Harish B, Parija S. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta tropica*. 2004;92: 253–260. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2004.08.007
83. 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99: 568–576. doi:10.1016/j.trstmh.2005.02.003
84. Arruda GC, da Silva ADT, Quagliato EMAB, Maretti MA, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2005;10: 1005–12. doi:10.1111/j.1365-3156.2005.01480.x
85. Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2006;147: 109–117. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.02.004
86. Oliveira H, Machado G, Cabral D, Costa-Cruz J. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitology research*. 2007;101: 1007–1013. doi:10.1007/S00436-007-0578-8
87. Atluri SR v, 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 immunology*. 2009;31: 151–5. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01085.x
88. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, et al. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2011;180. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.08.003
89. Mwape KE, Phiri IK, Praet N, Muma JB, Zulu G, van den Bossche P, et al. *Taenia solium* Infections in a Rural Area of Eastern Zambia-A Community Based Study. Jex AR, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6: e1594. doi:10.1371/journal.pntd.0001594
90. 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. *Experimental parasitology*. 2012;130: 78–85. doi:10.1016/J.EXPPARA.2011.10.010
91. Salazar AM, Mendlovic F, Cruz-Rivera M, Chávez-Talavera O, Sordo M, Avila G, et al. Genotoxicity induced by *Taenia solium* and its reduction by immunization with calreticulin in a hamster model of taeniosis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2013;54: 347–353. doi:10.1002/em.21782
92. Nunes Dda S, Gonzaga H, Ribeiro Vda S, da Cunha J, Costa-Cruz J. *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. doi:10.1016/J.DIAGMICROBIO.2013.01.020
93. 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. *Clinical Infectious Diseases*. 2013;57: e154–e159. doi:10.1093/cid/cit422
94. Sahu P, Parija S, Kumar D, Jayachandran S, Narayan SN. Comparative profile of circulating antigenic peptides in CSF, serum & urine from patients with neurocysticercosis diagnosed by immunoblotting. *Parasite immunology*. 2014;36: 509–

521. doi:10.1111/PIM.12124
95. Sako Y, Takayanagui O, Odashima N, 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. *Tropical medicine and health*. 2015;43: 171–176. doi:10.2149/TMH.2015-04
 96. Hernández-González A, Noh J, Perteguer MJ, Gárate T, Handali S. Comparison of T24H-his, GST-T24H and GST-Ts8B2 recombinant antigens in western blot, ELISA and multiplex bead-based assay for diagnosis of neurocysticercosis. *Parasites & vectors*. 2017;10: 237. doi:10.1186/s13071-017-2160-2
 97. Flores M, Gonzalez L, Hurtado C, Motta Y, Domínguez-Hidalgo C, Merino F, et al. HDP2: a ribosomal DNA (NTS-ETS) sequence as a target for species-specific molecular diagnosis of intestinal taeniasis in humans. *Parasites & vectors*. 2018;11. doi:10.1186/S13071-018-2646-6
 98. Ribeiro V da S, Gonzaga HT, Nunes D da S, Goulart LR, Costa-Cruz JM. Neurocysticercosis serodiagnosis: mimotope-based synthetic peptide as potential biomarker. *Parasitology Research*. 2019 [cited 24 Mar 2019]. doi:10.1007/s00436-019-06288-9
 99. Ahn CS, Kim JG, Huh S, Kang I, Kong Y. Advances in serological diagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis in Korea. *Genomics and Informatics*. Korea Genome Organization; 2019. doi:10.5808/GI.2019.17.1.e7
 100. Hernández M, Astudillo O, Diego G, de-la-Rosa-Arana J, Meza-Lucas A, García-Rodea R, et al. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: comparative performance of serum diagnostic tests in Mexico. *Parasitology research*. 2019;118: 2891–2899. doi:10.1007/S00436-019-06425-4
 101. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. Characterization by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Humoral Immune Response in Patients with Neurocysticercosis and Its Application in Immunodiagnosis. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 1986.
 102. Plancarte A, Espinoza B, Flisser A. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Child's nervous system : ChNS : official journal of*

- the International Society for Pediatric Neurosurgery. 1987;3: 203–205.
doi:10.1007/BF00274045
103. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Palacios LG, Jimenez I, Rodriguez S, et al. SHORT REPORT: TRANSIENT ANTIBODY RESPONSE IN TAENIA SOLIUM INFECTION IN FIELD CONDITIONS-A MAJOR CONTRIBUTOR TO HIGH SEROPREVALENCE. *Am J Trop Med Hyg.* 2001.
 104. Cortez MM, Rojas GC, Parkhouse RME. The HP10 *Taenia* monoclonal antibody-based ELISA detects a similar protein in the vesicular fluid of *Taenia hydatigena*. *Tropical Animal Health and Production.* 2018;50: 697–700. doi:10.1007/s11250-017-1473-7
 105. Sciutto E, Hernández M, García G, de Aluja AS, Villalobos ANM, Rodarte LF, et al. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Veterinary Parasitology.* 1998;78: 185–194. doi:10.1016/S0304-4017(98)00129-0
 106. Zimic MJ, Infantes J, López C, Velásquez J, Farfán M, Pajuelo M, et al. COMPARISON OF THE PEPTIDASE ACTIVITY IN THE ONCOSPHERE EXCRETORY/SECRETORY PRODUCTS OF TAENIA SOLIUM AND TAENIA SAGINATA. *Journal of Parasitology.* 2007;93: 727–734. doi:10.1645/GE-959R.1
 107. Garcia H, del Brutto O. *Taenia solium* cysticercosis. *Infectious disease clinics of North America.* 2000;14: 97–119. doi:10.1016/S0891-5520(05)70220-8
 108. Rosas N, Sotelo J, Nieto D. ELISA in the Diagnosis of Neurocysticercosis. *Archives of Neurology.* 1986;43: 353–356. doi:10.1001/ARCHNEUR.1986.00520040039016
 109. Ramos Kuri M, Sotelo J, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, et al. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Disappointing Performance of Serology (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) in an Unbiased Sample of Neurological Patients. *Archives of Neurology.* 1992;49. doi:10.1001/archneur.1992.00530300069012
 110. Corona T, Pascoe D, Gonzalez-Barranco D, Abad P, Landa L, Estanol B. Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. *Neurosurgery, and Psychiatry.* 1986.
 111. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. Subarachnoid basal neurocysticercosis: A focus on the most severe form of the disease. *Expert Review of*

- Anti-Infective Therapy. 2011. pp. 123–133. doi:10.1586/eri.10.150
112. Bobes RJ, Hernández M, Márquez C, Fragoso G, García E, Parkhouse RME, et al. Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: Application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. *Tropical Medicine and International Health*. 2006;11. doi:10.1111/j.1365-3156.2006.01642.x
113. Cuesta-Astroz Y, Oliveira FS de, Nahum LA, Oliveira G. Helminth secretomes reflect different lifestyles and parasitized hosts. *International Journal for Parasitology*. 2017;47: 529–544. doi:10.1016/j.ijpara.2017.01.007
114. Gomez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Sciutto E, et al. Genome analysis of excretory/secretory proteins in taenia solium reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). *Scientific Reports*. 2015;5. doi:10.1038/srep09683
115. Harnett W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2014;195: 130–136. doi:10.1016/J.MOLBIOPARA.2014.03.007
116. Rabouille C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd; 2017. pp. 230–240. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.007
117. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. The Compartmentalization of Cells. 2002 [cited 28 Oct 2021]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26907/>
118. Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *Journal of Cell Biology*. 2010;188. doi:10.1083/jcb.200911154
119. Viney M. The genomic basis of nematode parasitism. *Briefings in Functional Genomics*. 2018;17: 8–14. doi:10.1093/bfpg/elx010
120. Kim SH, Bae YA, Yang HJ, Shin JH, Diaz-Camacho SP, Nawa Y, et al. Structural and Binding Properties of Two Paralogous Fatty Acid Binding Proteins of Taenia solium Metacestode. Dalton JP, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6: e1868. doi:10.1371/journal.pntd.0001868
121. Burgos-Portugal JA, Kaakoush NO, Raftery MJ, Mitchell HM. Pathogenic Potential of

- Campylobacter ureolyticus. Infection and Immunity. 2012;80: 883–890. doi:10.1128/IAI.06031-11
122. Bhattacharjee S, Stahelin R v., Haldar K. Host targeting of virulence determinants and phosphoinositides in blood stage malaria parasites. Trends in Parasitology. 2012;28: 555–562. doi:10.1016/j.pt.2012.09.004
 123. Soblik H, Younis AE, Mitreva M, Renard BY, Kirchner M, Geisinger F, et al. Life Cycle Stage-resolved Proteomic Analysis of the Excretome/Secretome from *Strongyloides ratti*— Identification of Stage-specific Proteases. Molecular & Cellular Proteomics. 2011;10: M111.010157. doi:10.1074/mcp.M111.010157
 124. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature. 2013;496: 57–63. doi:10.1038/nature12031
 125. Bendtsen J, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of molecular biology. 2004;340: 783–795. doi:10.1016/J.JMB.2004.05.028
 126. Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Engineering, Design and Selection. 2004;17: 349–356. doi:10.1093/protein/gzh037
 127. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. Journal of Molecular Biology. 2000;300. doi:10.1006/jmbi.2000.3903
 128. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. Journal of Molecular Biology. 2001;305: 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
 129. Conesa A, Götz S. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. International Journal of Plant Genomics. 2008;2008: 1–12. doi:10.1155/2008/619832
 130. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS Letters. 1990;276: 172–174. doi:10.1016/0014-5793(90)80535-Q

131. Almagro Armenteros JJ, Tsigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*. 2019;37: 420–423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z
132. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*. 2017;45: W24–W29. doi:10.1093/nar/gkx346
133. Ansari H, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Research*. 2010;6: 6. doi:10.1186/1745-7580-6-6
134. Yao B, Zhang L, Liang S, Zhang C. SVMTriP: a method to predict antigenic epitopes using support vector machine to integrate tri-peptide similarity and propensity. Porollo A, editor. *PloS one*. 2012;7: e45152. doi:10.1371/journal.pone.0045152
135. Hanley JA, McNeil BJ. A Method of Comparing the Areas under Receiver Operating Characteristic Curves Derived from the Same Cases’.
136. Berrar D, Flach P. Caveats and pitfalls of ROC analysis in clinical microarray research (and how to avoid them). *Briefings in Bioinformatics*. 2012;13. doi:10.1093/bib/bbr008
137. Gomez-Fuentes S, Hernández-de la Fuente S, Morales-Ruiz V, López-Recinos D, Guevara-Salinas A, Parada-Colin M, et al. A novel, sequencing-free strategy for the functional characterization of *Taenia solium* proteomic fingerprint. *PLoS neglected tropical diseases*. 2021;15: 1–16. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0009104
138. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020;33.
139. Donadeu M, Fahrion A, Olliario P, Abela-Ridder B. Target product profiles for the diagnosis of *Taenia solium* taeniasis, neurocysticercosis and porcine cysticercosis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0005875
140. Lightowers M, Garcia H, Gauci C, Donadeu M, Abela-Ridder B. Monitoring the outcomes of interventions against *Taenia solium*: options and suggestions. *Parasite immunology*. 2016;38: 158–169. doi:10.1111/PIM.12291
141. Donadeu M, Fahrion AS, Olliario PL, Abela-Ridder B. Target product profiles for the diagnosis of *Taenia solium* taeniasis, neurocysticercosis and porcine cysticercosis. *PLoS*

- Neglected Tropical Diseases. 2017;11. doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0005875
142. Donadeu M, Fahrion AS, Olliario PL, Abela-Ridder B. Target product profiles for the diagnosis of *Taenia solium* taeniasis, neurocysticercosis and porcine cysticercosis. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2017;11. doi:10.1371/journal.pntd.0005875
143. Bueno EC, Vaz AJ, dos Ramos Machado L, Livramento JA, Mielle SR. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38: 146–151.
144. Barcelos I, Mineo J, de Oliveira Silva D, Ferreira M, de Moura L, Biondi G, et al. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. Tropical medicine & international health : TM & IH. 2001;6: 219–226. doi:10.1046/J.1365-3156.2001.00701.X
145. Sahu P, Parija S, Jayachandran S. Antibody specific to 43kDa excretory-secretory antigenic peptide of *Taenia solium* metacestode as a potential diagnostic marker in human neurocysticercosis. Acta tropica. 2010;115: 257–261. doi:10.1016/J.ACTATROPICA.2010.04.006

11 ANEXOS

Tabla A 1. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 1 (C1) que hacen match con el secretoma de *Taenia solium*.

Secretome name	IP secretome	MW secretome
TsM_000978800	3.3	7.0
TsM_000437200	3.9	7.6
TsM_000769500	4.3	8.0
TsM_000097200	4.7	8.4
TsM_001239700	5.2	8.1
TsM_000489900	5.5	8.3
TsM_000502600	5.6	22.3
TsM_000794200	5.6	26.1

TsM_000343700	5.7	8.1
TsM_000451800	5.7	16.4
TsM_000706600	5.7	27.8
TsM_000563900	5.7	31.8
TsM_000369000	5.8	6.7
TsM_000990000	5.9	20.0
TsM_000685400	5.9	30.9
TsM_000223900	6.0	18
TsM_000921800	6.1	9.0
TsM_000323600	6.1	14
TsM_000938900	6.1	30.6
TsM_000281800	6.2	26
TsM_000566600	6.3	19.3
TsM_000179800	6.3	21
TsM_000393100	6.3	77
TsM_000253700	6.4	6.2
TsM_000403600	6.4	18.1
TsM_001180100	6.4	32.7
TsM_001016300	6.5	8.0
TsM_000742400	6.5	13.7
TsM_000235300	6.5	16.2
TsM_000264000	6.5	20.6
TsM_000695900	6.5	22.3
TsM_000151800	6.5	24.6
TsM_000771600	6.5	33.0
TsM_000002200	6.5	65.3
TsM_000610500	6.6	21.3
TsM_001066400	6.7	34.5

TsM_000270700	6.8	20.6
TsM_000621600	6.9	8.9
TsM_000132800	6.9	46
TsM_001174200	7.0	31.9
TsM_000163700	7.1	17.1
TsM_000996700	7.1	34.7
TsM_000227000	7.1	77.8
TsM_001007200	7.2	10.7
TsM_000586100	7.2	14.2
TsM_000987700	7.2	273.2
TsM_001046700	7.3	21.3
TsM_001002700	7.3	25.3
TsM_000767500	7.3	27.5
TsM_000254500	7.4	7.8
TsM_000221200	7.4	26.1
TsM_000601600	7.4	67.3
TsM_000344300	7.5	6.7
TsM_000412300	7.5	8.0
TsM_000255700	7.5	9.0
TsM_000342600	7.5	14.2
TsM_000762900	7.5	19.6
TsM_001200300	7.5	25.2
TsM_000985400	7.5	37.9
TsM_000163800	7.5	50.5
TsM_001109200	7.6	13.8
TsM_000790500	7.7	20.7
TsM_001130500	7.8	11.5
TsM_000069900	7.8	44.7

TsM_000991300	7.9	10.1
TsM_000738200	7.9	15.3
TsM_000515400	7.9	19.1
TsM_000938700	8.0	28.8
TsM_000361900	8.0	159.5
TsM_000611600	8.1	40.5
TsM_000902200	8.1	60.1
TsM_000331000	8.2	14.9
TsM_000324100	8.2	15.9
TsM_000001700	8.2	74.9
TsM_000820200	8.3	23.2
TsM_000562700	8.3	51.9
TsM_000428500	8.3	221.8
TsM_001143600	8.4	25.2
TsM_000211600	8.4	206.6
TsM_000951200	8.5	9.0
TsM_001245300	8.5	14.1
TsM_000370900	8.5	24.8
TsM_000109200	8.6	14.4
TsM_000148200	8.6	19.7
TsM_001092400	8.8	10.9
TsM_000729900	8.8	16.1
TsM_000528000	8.9	8.8
TsM_001119700	8.9	12.1
TsM_000079300	8.9	23.4
TsM_000118200	8.9	68.5
TsM_000502100	9.0	17.8
TsM_001067600	9.0	22.0

TsM_000840100	9.1	29.1
TsM_000442400	9.1	61.1
TsM_000233500	9.2	50.1
TsM_001216700	9.3	9.0
TsM_000593700	9.3	19.1
TsM_000416300	9.5	24.9
TsM_000381000	9.5	74.9
TsM_001107700	9.5	232.3
TsM_000804500	9.6	26.4
TsM_000750700	9.7	8.0
TsM_001209200	9.7	51.7
TsM_000193400	9.8	55.0
TsM_000656700	9.9	30.9
TsM_001008100	10.0	7.9
TsM_000954300	10.1	49.9
TsM_000628500	9.1	41.3

Tabla A 2. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 2 (C2) que hacen match con el secretoma de *Taenia solium*.

Secretome name	IP secretome	MW secretome
TsM_000978800	3.3	7
TsM_000629500	3.7	19.3
TsM_000027300	3.8	11.8
TsM_000733700	4.2	13.7
TsM_000413600	4.3	11.3
TsM_000023200	4.4	18.6
TsM_000905900	4.5	18.6
TsM_000370000	4.6	13.7
TsM_000813500	4.7	18

TsM_000430400	5	91.6
TsM_000243100	5	20
TsM_001009400	5.1	138.8
TsM_001100600	5.2	100.5
TsM_000643000	5.3	13.9
TsM_001099800	5.4	98.2
TsM_000095600	5.4	49.6
TsM_000038000	5.4	25.2
TsM_001135300	5.6	112.3
TsM_000627700	5.6	24.2
TsM_001173700	5.6	15.9
TsM_000314700	5.7	31.2
TsM_000057400	6	101.5
TsM_000170000	6	58.3
TsM_000223900	6	17.7
TsM_000590600	6.1	88.4
TsM_000938900	6.1	30.6
TsM_000323600	6.1	14.2
TsM_001133500	6.1	9.7
TsM_000526600	6.2	36.2
TsM_000132000	6.3	195
TsM_000393100	6.3	76.6
TsM_000350600	6.3	43.4
TsM_000982000	6.3	21.8
TsM_001180100	6.4	32.7
TsM_000002200	6.5	65.3
TsM_000771600	6.5	33
TsM_000151800	6.5	24.6

TsM_000695900	6.5	22.3
TsM_000894000	6.5	18.4
TsM_000070800	6.6	118.7
TsM_001111900	6.6	11.2
TsM_000494400	6.7	39.7
TsM_000268600	6.7	38.5
TsM_001066400	6.7	34.5
TsM_000132800	6.9	45.8
TsM_000621600	6.9	8.9
TsM_000236600	7	58.9
TsM_001174200	7	31.9
TsM_000145300	7.1	74.2
TsM_000996700	7.1	34.7
TsM_000163700	7.1	17.1
TsM_000586100	7.2	14.2
TsM_001074900	7.3	14.8
TsM_000238300	7.4	54.1
TsM_000959400	7.4	9.8
TsM_001151600	7.4	9.4
TsM_000163800	7.5	50.5
TsM_000985400	7.5	37.9
TsM_001200300	7.5	25.2
TsM_000762900	7.5	19.6
TsM_001109200	7.6	13.8
TsM_000790500	7.7	20.7
TsM_001130500	7.8	11.5
TsM_000515400	7.9	19.1
TsM_000991300	7.9	10.1

TsM_000361900	8	159.5
TsM_000548600	8	21.4
TsM_000313800	8.1	33
TsM_000001700	8.2	74.9
TsM_000365600	8.3	11.4
TsM_000188800	8.4	19
TsM_000801700	8.5	10.8
TsM_000963100	8.6	83.3
TsM_000439000	8.6	42.5
TsM_000148200	8.6	19.7
TsM_000363800	8.6	14
TsM_000306600	8.6	9.9
TsM_000493400	8.8	75.8
TsM_000066600	8.8	8.8
TsM_000222000	8.9	60.6
TsM_000978300	9	36
TsM_000523800	9	34.4
TsM_000996900	9	25.6
TsM_001067600	9	22
TsM_000502100	9	17.8
TsM_000286100	9	10.3
TsM_001176000	9.1	16.2
TsM_000642200	9.2	23
TsM_000052300	9.2	19.7
TsM_000364700	9.4	22.1
TsM_000925200	9.5	176.3
TsM_000442100	9.5	45.9
TsM_000290900	9.6	116.9

TsM_000741900	9.6	31.1
TsM_001217100	9.7	25.2
TsM_000221800	9.7	8.8
TsM_000547800	9.8	23
TsM_000568600	9.9	40.9
TsM_001227800	6.0	259.3

Tabla A 3. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 3 (C3) que hacen match con el secretoma de *Taenia solium*.

Secretome name	IP secretome	MW secretome
TsM_000676500	4.0	6.6
TsM_000835500	4.5	65.5
TsM_000290400	4.5	4.6
TsM_000792400	4.8	60.9
TsM_000364200	4.8	5.7
TsM_000804700	5.1	62.9
TsM_001231700	5.3	82.1
TsM_000585900	5.3	26.9
TsM_000297800	5.3	6.7
TsM_000478100	5.4	64.3
TsM_000060100	5.6	65.3
TsM_000395600	5.6	6.3
TsM_001226600	5.7	82.4
TsM_000309000	5.8	26.2
TsM_000369000	5.8	6.7
TsM_001220100	5.9	65.5
TsM_000395200	6.0	47
TsM_000439300	6.1	41.2
TsM_000938900	6.1	30.6

TsM_000187700	6.1	24.8
TsM_000765700	6.2	45.5
TsM_000281800	6.2	26.0
TsM_000393100	6.3	77
TsM_000350600	6.3	43
TsM_001246200	6.3	50
TsM_000780800	6.3	29.3
TsM_000430200	6.4	27
TsM_000253700	6.4	6.2
TsM_000002200	6.5	65
TsM_000541900	6.5	28.5
TsM_000151800	6.5	25
TsM_001016300	6.5	8.0
TsM_000464000	6.5	5.2
TsM_001177100	6.6	134
TsM_000494400	6.7	40
TsM_001066400	6.7	35
TsM_000149400	6.7	6.8
TsM_000132800	6.9	45.8
TsM_000328100	6.9	39
TsM_001060800	6.9	13
TsM_000621600	6.9	8.9
TsM_001174200	7.0	31.9
TsM_000179700	7.0	25.9
TsM_000996700	7.1	34.7
TsM_000987700	7.2	273.2
TsM_000767500	7.3	27.5
TsM_001002700	7.3	25.3

TsM_001046700	7.3	21.3
TsM_001154200	7.3	12.8
TsM_000601600	7.4	67.3
TsM_000985400	7.5	37.9
TsM_001200300	7.5	25.2
TsM_000762900	7.5	19.6
TsM_000255700	7.5	9.0
TsM_000344300	7.5	7
TsM_000583000	7.6	8
TsM_000991300	7.9	10.1
TsM_000379500	8.0	42.6
TsM_000902200	8.1	60.1
TsM_000428500	8.3	221.8
TsM_000390400	8.3	167.7
TsM_000674900	8.3	56.5
TsM_000562700	8.3	51.9
TsM_000365600	8.3	11.4
TsM_000350000	8.4	6.5
TsM_000816600	8.5	60.7
TsM_000730500	8.5	51.0
TsM_000389300	8.5	36.9
TsM_000951200	8.5	9.0
TsM_000649300	8.6	165.7
TsM_000963100	8.6	83.3
TsM_000139800	8.7	8.9
TsM_000068200	8.8	59.7
TsM_000376300	8.8	24.6
TsM_000157800	8.9	51.7

TsM_000891900	9.1	64.5
TsM_000098900	9.1	24.8
TsM_000326200	9.2	138.5
TsM_000699700	9.3	11.6
TsM_000852700	9.3	35.0
TsM_000930800	9.3	31.2
TsM_000693700	9.4	29.0
TsM_001107700	9.5	232.3
TsM_000925200	9.5	176.3
TsM_000442100	9.5	45.9
TsM_000384300	9.5	35.1
TsM_000416300	9.5	24.9
TsM_000363000	9.5	4.4
TsM_000193400	9.8	55.0
TsM_000530500	9.8	5.7

Tabla A 4. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 4 (C4) que hacen match con el secretoma de *Taenia solium*.

Secretome name	IP secretome	MW secretome
TsM_000192800	3.3	13.1
TsM_000978800	3.3	7.0
TsM_000629500	3.7	19.3
TsM_000027300	3.8	11.8
TsM_000720300	3.8	7.8
TsM_001185400	4.2	29.9
TsM_001016800	4.2	7.2
TsM_000166100	4.3	45.9
TsM_000029100	4.3	25.2
TsM_001041100	4.3	10.4

TsM_000769500	4.3	8.0
TsM_001234300	4.4	10.0
TsM_000824000	4.5	46.5
TsM_000504000	4.5	29.4
TsM_000580400	4.7	79.3
TsM_000924300	4.7	52.6
TsM_000094700	4.7	48.1
TsM_000380000	4.7	30.6
TsM_001129500	4.7	28.4
TsM_001204400	4.7	26.3
TsM_000484300	4.7	14.6
TsM_000870700	4.9	55.1
TsM_000093800	4.9	34.4
TsM_000794100	4.9	24.9
TsM_001009400	5.1	138.8
TsM_000804700	5.1	62.9
TsM_001097400	5.1	29.2
TsM_000800700	5.2	56.8
TsM_000999900	5.2	49.5
TsM_000671000	5.2	30.7
TsM_001239700	5.2	8.1
TsM_001231700	5.3	82.1
TsM_000807400	5.4	126.8
TsM_000478100	5.4	64.3
TsM_000794200	5.6	26.1
TsM_000983800	5.6	13.8
TsM_000667100	5.7	47.9
TsM_000563900	5.7	31.8

TsM_000314700	5.7	31.2
TsM_000738000	5.7	11.5
TsM_000343700	5.7	8.1
TsM_000351300	5.8	9.6
TsM_000398400	5.9	143.2
TsM_000208300	5.9	40.1
TsM_000057400	6.0	102
TsM_000483700	6.0	55
TsM_000395200	6.0	47
TsM_000439300	6.1	41
TsM_000386100	6.1	8
TsM_000281800	6.2	26
TsM_000132000	6.3	195
TsM_000350600	6.3	43
TsM_000430200	6.4	27
TsM_000756500	6.4	15
TsM_000002200	6.5	65
TsM_001016300	6.5	8
TsM_001111900	6.6	11
TsM_000132800	6.9	46
TsM_001060800	6.9	13
TsM_000621600	6.9	9
TsM_000987700	7.2	273.2
TsM_000586100	7.2	14.2
TsM_001154200	7.3	12.8
TsM_000770200	7.3	8.8
TsM_000601600	7.4	67.3
TsM_000342600	7.5	14.2

TsM_000255700	7.5	9.0
TsM_001161200	7.6	136.6
TsM_000738200	7.9	15.3
TsM_000361900	8.0	159.5
TsM_000902200	8.1	60.1
TsM_000001700	8.2	74.9
TsM_000437600	8.4	8.6
TsM_000370900	8.5	24.8
TsM_000828500	8.6	27.9
TsM_000375000	8.6	12.9
TsM_000225200	9.1	14.2
TsM_001137700	9.1	9.0
TsM_000537100	9.2	10.0
TsM_001216700	9.3	9.0
TsM_000453400	9.4	8.0
TsM_000381000	9.5	74.9
TsM_000740800	9.5	40.3
TsM_000741900	9.6	31.1

Tabla A 5. Total de spots 2D-PAGE en el cultivo 5 (C5) que hacen match con el secretoma de *Taenia solium*.

Secretome name	IP secretome	MW secretome
TsM_000978800	3.3	7.0
TsM_000278800	3.9	7.5
TsM_001016800	4.2	7.2
TsM_000835500	4.5	65.5
TsM_000357000	4.5	7.4
TsM_000502000	4.7	60.2
TsM_000810100	4.8	6.9

TsM_000336600	5.1	72.0
TsM_000297800	5.3	6.7
TsM_000478100	5.4	64.3
TsM_000255000	5.5	61.3
TsM_000060100	5.6	65.3
TsM_000763600	5.6	61.7
TsM_000687200	5.7	50.5
TsM_000374300	5.8	30.2
TsM_000309000	5.8	26.2
TsM_000369000	5.8	6.7
TsM_000826600	5.9	69.7
TsM_000002100	6.0	82
TsM_001133500	6.1	10
TsM_000281800	6.2	26
TsM_000393100	6.3	77
TsM_000740300	6.3	59
TsM_001246200	6.3	50
TsM_000350600	6.3	43
TsM_000151800	6.5	25
TsM_000149400	6.7	7
TsM_000132800	6.9	46
TsM_001174200	7.0	31.9
TsM_000179700	7.0	25.9
TsM_000145300	7.1	74.2
TsM_000996700	7.1	34.7
TsM_000987700	7.2	273.2
TsM_001007200	7.2	10.7
TsM_000885600	7.2	7.9

TsM_000238300	7.4	54.1
TsM_000254500	7.4	7.8
TsM_000163800	7.5	50.5
TsM_000985400	7.5	37.9
TsM_001200300	7.5	25.2
TsM_000219600	7.5	9.4
TsM_000344300	7.5	6.7
TsM_001161200	7.6	136.6
TsM_000069900	7.8	44.7
TsM_000991300	7.9	10.1
TsM_000902200	8.1	60.1
TsM_000428500	8.3	221.8
TsM_000390400	8.3	167.7
TsM_000224800	8.3	70.3
TsM_000562700	8.3	51.9
TsM_000879800	8.4	126.5
TsM_000649300	8.6	165.7
TsM_001070900	8.7	120.3
TsM_000644500	8.7	20.0
TsM_000118200	8.9	68.5
TsM_000157800	8.9	51.7
TsM_000079300	8.9	23.4
TsM_000528000	8.9	8.8
TsM_000978300	9.0	36.3
TsM_000370700	9.0	7.8
TsM_000326200	9.2	138.5
TsM_000233500	9.2	50.1
TsM_000160500	9.2	30.7

TsM_000159300	9.4	58.6
TsM_001107700	9.5	232.3
TsM_000381000	9.5	74.9
TsM_000348600	9.5	72.3
TsM_001209200	9.7	51.7
TsM_000193400	9.8	55.0
TsM_000530500	9.8	5.7
TsM_000568600	9.9	40.9
TsM_000661800	10.0	35.6
TsM_000310900	10.0	7.6
TsM_001227800	6.0	259