



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
DE INTERÉS PARA DIAGNÓSTICO Y
PREVENCIÓN DE CISTICERCOSIS
PORCINA A TRAVÉS DE PROTEÓMICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

YULIET MARCELA DIAZ MASMELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ

COMITÉ TUTOR: Dra. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Dr. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
DE INTERÉS PARA DIAGNÓSTICO Y
PREVENCIÓN DE CISTICERCOSIS
PORCINA A TRAVÉS DE PROTEÓMICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

YULIET MARCELA DIAZ MASMELA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ

COMITÉ TUTOR: Dra. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Dr. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2011



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna, **DÍAZ MASMELA YULIET MARCELA** con número de cuenta **510450658** con la tesis titulada **"Identificación de proteínas de interés en el diagnóstico y prevención de cisticercosis porcina a través de proteómica"**, realizada bajo la dirección del **DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ**.

Presidente: DRA. KAETHE WILLMS MANING
Vocal: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Secretario: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Suplente: DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de octubre de 2011.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos de investigación recibidos por DGAPA (IN228609-3) y CONACYT (61334).

A la beca CONACYT (número de becario 240101).

A mi asesor, el Dr, Raúl José Bobes Ruiz, a quien deseo expresar mi sincero agradecimiento por la paciencia y ayuda brindada.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Gladis del Carmen Fragoso González y el Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández, por su apoyo y asesoría que me brindaron durante mi formación académica.

A la Dra. Kaethe Willms Maning, la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde y el Dr. Guillermo Mendoza Hernández, por haber aceptado mi tesis para su revisión, por sus comentarios, sugerencias y ayuda.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A DIOS por su gracia infinita

Al Dr. Juan Pedro Laclette, por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme las facilidades para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Julio Cesar Carrero, por sus aportaciones que fueron de gran ayuda para el avance de mi proyecto.

A la Dra. Ada Nelly Villalobos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en la recolección de las muestras de suero de cerdos.

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

A la Dra. Bertha Espinoza y su grupo de trabajo por su colaboración en la estandarización de la técnica de 2D-PAGE.

A la Maestra en ciencias Patricia de la Torre, por su colaboración incondicional que me brindó para realizar este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Bárbara Moguel, Adriana Ayón, Milka Luna Nácar, María Meneses, Yanis Toledano, Mariana Pliego, José Navarrete, Oscar Illescas y Hugo Aguilar, quienes me brindaron su apoyo y sobretodo su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres Adolfo Diaz y Graciela Masmela y a mi esposo Guillermo Aquino.

Gracias por qué me fortalecen cada día para seguir adelante, por confiar en mí y apoyarme en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN	10
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPOTESIS	18
6. OBJETIVOS	19
6.1 Objetivo general	19
6.2 Objetivos específicos	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	20
7.1 Obtención de parásitos	20
7.2 Preparación del extracto de proteínas totales de cisticercos de <i>T. solium</i>	20
7.3 Geles de electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE)	20
7.4 Análisis de imágenes	21
7.5 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	21
7.6 Inmunoblots	22
7.7 Análisis de inmunoblots	22
7.8 Identificación de proteínas por espectrometría de masas (LC/ESI-MS/MS)	23
7.9 Análisis de secuencias con la base de datos del genoma de <i>T. solium</i>	24

8. RESULTADOS	26
8.1 Electroforesis en doble dimensión del cisticerco total de <i>T. solium</i>	26
8.2 Identificación de proteínas inmunodominantes a partir de diferentes muestras de suero	27
8.3 Identificación de proteínas inmunodominantes por espectrometría de masas (LC/ESI-MS/MS)	34
8.4 Análisis de las secuencias de las proteínas inmunodominantes con la base de datos del genoma de <i>T. solium</i>	35
9. DISCUSIÓN	38
9.1 Patrón de proteínas que expresa el cisticerco de <i>T. solium</i>	38
9.2 Proteínas Inmunodominantes específicas del cisticerco de <i>T. solium</i> identificadas por inmunoblot	39
9.3 Proteínas Inmunodominantes específicas del cisticerco de <i>T. solium</i> identificadas por espectrometría de masas	41
9.4 Análisis de las proteínas identificadas por espectrometría de masas con la base de datos del genoma de <i>T. solium</i>	48
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS	51
12. BIBLIOGRAFÍA	52
13. APÉNDICES	62
13.1 Proteínas inmunodominantes específicas del cisticerco de <i>T. solium</i>	63
13.2 Alineaciones de las secuencias de proteínas de <i>T. solium</i> con las de otros parásitos	64
13.3 Soluciones para la electroforesis en doble dimensión	69
13.4 Protocolo para transferencia de proteínas	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gel en doble dimensión (2D-PAGE) del extracto total de proteínas de cisticercos de *Taenia solium*. 26
- Figura 2.** Comparación entre geles de electroforesis 2D-PAGE a diferentes intervalos de pH 27
- Figura 3.** Inmunoblot del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra diferentes mezclas de sueros. 28
- Figura 4.** Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos a diferentes diluciones 29
- Figura 5.** Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros control 30
- Figura 6.** Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros de cerdos cisticercosos. 31
- Figura 7.** Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra muestras de suero de cerdos infectados con otras parasitosis 32
- Figura 8.** Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo y mezcla de sueros de cerdos cisticercosos. 33
- Figura 9.** Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros de cerdos cisticercosos, a diferentes intervalos de pH 33
- Figura 10.** Identificación de las manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* que fueron analizadas por espectrometría de masas 34

1. RESUMEN

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria, causada por el estado larvario de *Taenia solium*. En México es un padecimiento de alta endemicidad que afecta tanto la salud humana como la porcicultura rústica. La utilidad del inmunodiagnóstico aún es limitada debido a que, las pruebas no presentan la sensibilidad y especificidad adecuada en particular cuando se aplican en el suero de los pacientes o los cerdos. El objetivo del presente trabajo es identificar antígenos inmunodominantes, (antígenos que son más fácilmente reconocidos por el sistema inmune) específicos del cisticerco de *T. solium* mediante proteómica, para desarrollar un método diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad.

Para este propósito se obtuvieron cisticercos a partir de músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados. A partir de estos se preparó un extracto de proteínas totales, y se separaron las proteínas del mismo utilizando la técnica de electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE). Las proteínas obtenidas, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se realizó la técnica de inmunoblot, utilizando mezclas de sueros de cerdos cisticercosos infectados naturalmente, de cerdos negativos por necropsia seropositivos (falsos positivos), de cerdos negativos por necropsia seronegativos (control negativo) y de cerdos infectados con otras parasitosis (*Ascaris spp.*, y *Cysticercus tenuicollis*). Los resultados obtenidos muestran, que el patrón de proteínas del cisticerco de *T. solium*, presenta en promedio un total de 238 manchas con un punto isoeléctrico (p.I) ente 4 y 8 y peso molecular (PM) entre 12.6-160.3 kDa. De las 238 manchas, solo 37 fueron reconocidas por la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos con p.I entre 3.6-8.0 y PM entre 20.5-150 kDa; de este conjunto sólo 13 fueron reconocidas específicamente con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos (no son reconocidas con los controles) y presentaron p.I entre 4.9-5.7 y PM entre 25-47.8 kDa. Posteriormente, por espectrometría de masas se logró identificar un total de 9 proteínas correspondientes a proteínas de citoesqueleto, involucradas en procesos de señalización, metabolismo y estrés. Estas proteínas fueron

analizadas con la base de datos del genoma de *T. solium* y finalmente mediante alineaciones se pudo conocer el grado de identidad de las proteínas con las reportadas para otros parásitos. Los resultados obtenidos hasta el momento, muestran un total de 7 proteínas inmunodominantes que presentan secuencias de aminoácidos que son específicos de *T. solium* y por lo tanto pueden ser blancos útiles para el desarrollo de un método diagnóstico.

2. ABSTRACT

Cysticercosis is a parasitic disease caused by the larval stage of *Taenia solium*. In Mexico it is a condition of high endemicity that affects both human health and the rustic pig. The immunodiagnostic utility is still limited because current evidences do not show adequate sensitivity and specificity, particularly when applied to sera from patients or pigs. The aim of this study is to identify immunodominant antigens (antigens that are more easily recognized by the immune system) specific for *T. solium* cysticercus using proteomics that may improve the.

For this purpose, cysticerci were obtained from skeletal muscle of naturally infected pigs. From these, an extract of total proteins were separated using two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblots were performed using mixtures of sera from pigs naturally infected with cysticerci, pigs seropositive without cysticerci (false positives), pigs seronegative without cysticerci (negative control) and pigs infected with other parasites (*Ascaris spp.* and *Cysticercus tenuicollis*). The results show that the protein pattern of cysticerci of *T. solium*, has on average approximately a 238 spots with an isoelectric point (Ip) between 4 and 8 and a molecular weight (MW) between 12.6-160.3 kDa. From these 238 spots, only 37 were recognized by the sera of cysticerci pigs with Ip between 3.6-8.0 and MW between 20.5-150 kDa; of this last group only 13 were specifically recognized by the sera of swine cysticercosis (not recognized by control sera) and presented an Ip between 4.9-5.7 and MW between 25-47.8 kDa. Subsequently, using mass spectrometry we identified 9 proteins corresponding to cytoskeletal proteins, cell signaling pathways, metabolism and stress. These proteins were found in the genome database of *T. solium* alignments and its specific cDNA sequence was determined and compared with those reported in other related parasites. The results obtained so far show a total of 7 immunodominant proteins that have amino acid sequences that are specific to *T. solium* and therefore may be useful targets to develop a new more specific and sensible diagnostic method.

3. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el estado larvario de *Taenia solium*, responsable de causar problemas de salud pública y de generar pérdidas económicas, a nivel de la porcicultura rústica en México y en otros países en vía de desarrollo como Latinoamérica, África y Asia, donde el parásito es endémico (Flisser y cols, 2006). Así mismo, la incidencia de la cisticercosis humana en países industrializados se ha incrementado, debido al aumento en la inmigración desde áreas endémicas (White y Atmar, 2002; Sorvillo y cols, 2011).

Estudios realizados por diferentes grupos de investigadores señalan que la Neurocisticercosis (NC) constituye la tercera causa más común de ingresos en el hospital de Neurología en México (Sotelo y Del Bruto, 2000; Fleury y cols, 2010; Sciutto y cols, 2003). Además, se reporta que el parásito (vesicular o calcificado) aún causa síntomas en un importante número de pacientes infectados, resultando en un 2.4% de las consultas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en México (INNN) (Fleury y cols, 2010). Por otro lado, los estudios de prevalencia hospitalaria, realizados en el INNN, muestran que la NC es la novena causa de mortalidad y la quinta causa de morbilidad hospitalaria (Jiménez y Velásquez 2004). También se estima que cerca de 50 000 pacientes mueren cada año a causa de la NC (Das y cols, 2002). En México, las tasas de seroprevalencia de la cisticercosis humana oscilan entre 3.7 hasta 12.2%, y los estudios epidemiológicos basados en la tomografía axial computarizada, realizados en habitantes de comunidades rurales, han encontrado una prevalencia de NC hasta del 10% (Fleury y cols, 2006; Michelet y cols, 2011).

Con respecto a la cisticercosis porcina en México, No se tienen datos oficiales, ya que no se ha realizado un estudio epidemiológico que permita establecer la prevalencia en todo el territorio nacional (Flisser y Correa, 2010). Sin embargo, datos obtenidos por medio de la inspección en lengua de cerdos vivos en diferentes áreas del país, indican que en Morelos la prevalencia en varios pueblos

es de 4 a 10%, habiendo algunos en los que se ha encontrado el 33% (Morales y cols, 2002; Larralde y Aluja, 2006). En los últimos estudios epidemiológicos realizados en las zonas rurales de México se estima un 13.3% de prevalencia (Morales y cols, 2008).

El ciclo de vida de *Taenia solium* involucra al humano como el hospedero definitivo y al cerdo como el hospedero intermediario. El estado adulto de la *T. solium*, se desarrolla exclusivamente en el intestino delgado del ser humano y es un gusano plano con escólex, cuello y una cadena de muchos segmentos denominados proglótidos. Los proglótidos distales son los más maduros o grávidos y pueden contener miles de huevos que son liberados con las heces del hospedero y contaminan al medio ambiente. Cuando un cerdo ingiere heces con huevos o proglótidos, estos eclosionan en el intestino y los embriones (oncosferas) liberados penetran la mucosa intestinal, pasan al sistema circulatorio y se establecen en diferentes tejidos del organismo como, músculo esquelético, lengua, corazón y cerebro, donde se desarrollan en cisticercos. El cisticerco es el estado larval y está formado por una vesícula blanquecina con una pared translúcida y llena de líquido, que mide alrededor de 1-2 cm y a través de la cual se puede observar el escólex invaginado (Flisser y cols, 2006). Los humanos se infectan y desarrollan la teniasis cuando ingieren carne de cerdo mal cocida y contaminada con cisticercos viables.

Por otro lado, el ser humano puede también afectarse de cisticercosis cuando ingiere accidentalmente huevos de *T. solium*; en este caso, el cisticerco puede llegar a localizarse a nivel del sistema nervioso central causando la neurocisticercosis, que es la forma más grave de la enfermedad (García y cols, 2005; Morales y cols, 2008; Santivañez y cols, 2010).

La transmisión del parásito está relacionada con la crianza de cerdos que deambulan libremente en las comunidades en búsqueda de alimento, la inadecuada o ausente inspección y control de calidad de la carne de cerdo, la extrema pobreza que conlleva a bajos niveles de vida y la falta de higiene y mal procesamiento de las heces (Schantz y Sarti, 1989; Flisser y cols, 2006; Morales y

co/s, 2008). Además también se ha reportado una asociación entre la cisticercosis y antecedentes de teniasis dentro del núcleo familiar (Díaz y *co/s*, 1990; Sarti y Rajshekhar, 2003; Flisser y *co/s*, 2004).

Se han desarrollado estrategias de intervención para el control de la teniasis y cisticercosis en áreas endémicas como son; la desparasitación masiva con praziquantel y la educación para la salud. Con estas estrategias se ha observado una reducción importante de la teniasis, pero no, de la contaminación ambiental medida por la frecuencia de cisticercosis porcina y la persistente alta frecuencia de la NC humana registrada recientemente en el INNN (Fleury y *co/s*, 2010; Flisser y Correa, 2010). También se dispone de vacunas efectivas para la prevención de la cisticercosis porcina. Figuran entre ellas, la vacuna polivalente denominada S3Pvac y la vacuna recombinante basada en el antígeno llamado TSOL18 o HP6 (Flisser y *co/s*, 2004; Parkhouse y *co/s*, 2008; Morales y *co/s*, 2011). A la fecha el diagnóstico más certero de la NC se basa en estudios de neuroimagen (resonancia magnética nuclear y tomografía axial computarizada), que presentan un elevado costo, por lo que resultan económicamente difíciles de cubrir por gran parte de los pacientes (Salazar y Lindh, 2011; Atluri y *co/s*, 2011); otra prueba utilizada en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, es la punción lumbar, misma que permite evaluar el grado de inflamación del sistema nervioso central a través del análisis de las células inflamatorias en el líquido cefalorraquídeo, así como la presencia de anticuerpos específicos o bien de antígenos de secreción, sin embargo, esta prueba tiene que ser realizada por expertos. Para el diagnóstico de la cisticercosis en el cerdo se utiliza el método de inspección de la lengua en búsqueda de cisticercos. Sin embargo, este método requiere de la sujeción del animal y de la participación de personal entrenado para este procedimiento y es además de agresivo para el cerdo un método tardado que limita su aplicación extensiva en los millones de cerdos de traspatio que habitan en la república mexicana. Este procedimiento solo permite detectar aproximadamente a la mitad de los cerdos infectados (Sarti, 1992; Morales, 2002; Larralde y Aluja, 2006). Considerando las limitaciones en el diagnóstico descritas anteriormente, las

técnicas de inmunodiagnóstico se utilizan para apoyar el diagnóstico de NC y cisticercosis porcina (Deckers y Dorny, 2010).

Actualmente, existen diferentes ensayos serológicos disponibles para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis. Algunos de estos, se basan en la detección de anticuerpos en suero, en líquido cefalorraquídeo en el caso de NC y en saliva (Malla y cols, 2005). Se han descrito muchas técnicas para detectar anticuerpos contra *T. solium* en humanos y cerdos, tales como, hemaglutinación, fijación del complemento, radioinmunoensayo, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), aglutinación en látex y técnicas de inmunoblot (Dorny y cols, 2003). Los antígenos usados para dichos ensayos pueden ser líquido vesicular, productos de secreción/excreción o extractos crudos de cisticercos de *T. solium* o de parásitos relacionados como *Taenia crassiceps* o *T. saginata* (Arruda y cols, 2005). Estos ensayos se basan en la detección de anticuerpos, y presentan diferente sensibilidad y especificidad, que depende de los pacientes incluidos en el estudio o intensidad de la infección en el caso de la cisticercosis porcina.

El estudio de las propiedades antigénicas del líquido vesicular y glicoproteínas del cisticercos así como el mejoramiento de las técnicas de purificación de las proteínas han resultado en el desarrollo de herramientas serológicas más adecuadas para el inmunodiagnóstico (Tsang y cols, 1989; Prabhakaran y cols, 2007; Fang y cols, 2009; Atluri y cols, 2009; 2011). Entre estas técnicas figura la inmunoelectrotransferencia blot (EITB). Este inmunoblot usa una fracción de glicoproteínas obtenidas por purificación de un extracto crudo de cisticercos a través de cromatografía con lectin-lectina. La reacción con cualquiera de las 7 bandas específicas, se considera como diagnóstico de la cisticercosis. La sensibilidad de este ensayo disminuye dramáticamente en los casos con cisticercos individuales en el cerebro (Singh y cols, 1999) así como en el diagnóstico de cisticercosis porcina en cerdos de comunidades rurales (Sciutto y cols, 1995). Además este ensayo implica un procedimiento laborioso, de alto costo y de difícil reproducibilidad que limita su uso extenso en el medio rural. Por el

contrario el ensayo de ELISA es muy utilizado en los países en vía de desarrollo, por su mayor disponibilidad, simplicidad y menor costo, (Deckers y cols, 2010; Handali y cols, 2010).

En el intento de aumentar la capacidad diagnóstica del ensayo de ELISA se han evaluado diferentes antígenos, algunos de estos son las glicoproteínas de líquido vesicular del cisticerco de *T. solium*, las cuales fueron purificadas mediante isoelectroenfoque. Estos antígenos fueron altamente específicos y sensibles al aplicarlos tanto en inmunoblot como en ELISA (Ito y cols, 1998; Atluri y cols, 2011). Por otro lado se han evaluado diferentes proteínas recombinantes como la T24, que es una de las glicoproteínas purificadas con lectin-lectina, que ha sido caracterizada, clonada y expresada, como antígeno para el diagnóstico de cisticercosis. Con este antígeno T24 se observaron buenos resultados en la detección de casos con dos o mas cisticercos viables en el cerebro (sensibilidad de 97% y especificidad de 99.4%) (Hancock y cols, 2006). Otras son proteínas recombinantes de 10, 7-10, y 14 kDa, que pueden ser usados en inmunoblot y ELISA (Chung y cols, 1999; Sako y cols, 2000; Assana y cols, 2007). Si bien la especificidad de estos antígenos es alta, la sensibilidad es generalmente mas baja que la que se presenta cuando se utilizan antígenos nativos.

Independientemente de la técnica utilizada, la detección de anticuerpos específicos contra *T. solium* en suero, sólo indica la exposición al parásito y no necesariamente una infección establecida, dando lugar a una respuesta de anticuerpos transitorios (García y cols, 2001). Además los anticuerpos pueden permanecer por largos periodos de tiempo después de que el parásito ha sido eliminado, por mecanismos inmunológicos o bien, por una terapia antiparasitaria (Deckers y cols, 2010). Por el contrario, la detección de antígenos de secreción refleja la presencia de los parásitos viables; por lo que también es considerada como herramienta para aumentar la especificidad de los ensayos de diagnóstico o el monitoreo serológico de terapias antiparasitarias, evaluando la caída de los niveles de antígeno después de un tratamiento antihelmíntico exitoso (Dorny y cols, 2003; Fleury y cols, 2007). Por otro lado se ha visto que ensayos basados en

anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos del parásito pueden aumentar la especificidad (Correa y cols, 1989). Hasta el momento existen pruebas que han sido validadas y se usan rutinariamente en la detección de antígenos para el diagnóstico de la cisticercosis (Dorny y cols, 2003; Castillo y cols, 2009). Una de ellas se basa en la detección del antígeno HP10; el cual está presente en las secreciones del cisticerco de *Taenia saginata*. La detección del antígeno HP10 puede estar correlacionada con la localización del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC); ya que, estudios demostraron que los niveles de antígeno eran más altos, en casos cuando el cisticerco se encontraba localizado en el espacio subaracnoideo y ventrículos, pero no en casos con cisticercosis parenquimatosa, por lo que sirve como herramienta para reforzar el diagnóstico y seguimiento de la NC (Bobes y cols, 2006). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en una comunidad rural en África, se evaluó la prevalencia de cisticercosis porcina, mediante la palpación en lengua de cerdos vivos, dos ensayos de ELISA que detectan los antígenos del parásito HP10 y B158/B60 y un ensayo de inmunoelectrotransferencia (EITB), que detecta anticuerpos antiparasitarios. Los resultados obtenidos mostraron una sensibilidad y especificidad de 76% y 84%, para el Ag/ELISA B158/B60 y 55% y 83%, para el Ag/ELISA HP10 (Krecek y cols, 2008).

Aunque los métodos de detección de antígenos podrían servir como herramientas para el diagnóstico de la cisticercosis, estos siguen siendo motivo de estudio, ya que existe la posibilidad de que dichos antígenos sean compartidos con los de otros parásitos y por lo tanto dar lugar a falsos positivos especialmente en muestras de suero (Deckers y cols, 2010). Los procedimientos inmunoenzimáticos tienen mejor especificidad en muestras de líquido cefalorraquídeo, sin embargo se requiere de una punción lumbar que además de ser un método agresivo para el paciente, no en todos los pacientes puede practicarse. En vista de los puntos expuestos anteriormente se siguen considerando a las pruebas de oro para el diagnóstico, la resonancia magnética nuclear y la tomografía axial computarizada. La principal desventaja de estos

procedimientos es que resultan económicamente difícil de cubrir por gran parte de los pacientes, debido al elevado costo de las mismas como ya menciono anteriormente (Salazar y Lindh, 2011; Atluri y *cols*, 2011).

En los últimos años se ha venido haciendo uso de las herramientas proteómicas, como la separación de proteínas mediante geles en doble dimensión (2D-PAGE), para la identificación de proteínas inmunoreactivas mediante inmunoblot y la caracterización de dichas proteínas mediante espectrometría de masas (MS). Estas herramientas han sido de gran utilidad para la identificación de antígenos blanco específicos que pudieran ser utilizados para la realización de pruebas de diagnóstico o posibles candidatos a vacunas para la cisticercosis (Fang y *cols*, 2009; Atluri y *cols*, 2010; Salazar y Lindh, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior y las diferentes limitaciones que presentan hasta el momento las técnicas de inmunodiagnóstico, es que, se propone en este proyecto identificar los antígenos inmunodominantes específicos del cisticerco de *T. solium* mediante inmunoproteómica y que podrían ser la base sólida de las pruebas de inmunodiagnóstico.

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos que se han venido realizando para el mejoramiento en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la cisticercosis, esta parasitosis sigue siendo un riesgo tanto para la salud humana como para la porcicultura en México. En México desde el 2009 se ha venido aplicando un programa de control de teniasis cisticercosis. Por consiguiente, para contribuir al control de dicha zoonosis, sería de gran importancia disponer de procedimientos diagnósticos que permitan evaluar con mayor precisión el impacto de intervenciones preventivas. Es por esto que en este trabajo se pretende conocer el patrón de antígenos inmunodominantes expresados específicamente en los cisticercos de *T. solium*, utilizando las herramientas de la inmunoproteómica y seleccionar aquellos que no sean reconocidos por anticuerpos inducidos por parásitos relacionados o que frecuentemente dan reacción cruzada (Erhart y cols, 2002; Atluri y cols, 2011). La identificación de antígenos inmunodominantes permitirá desarrollar mejores herramientas diagnósticas sencillas y de bajo costo que se puedan utilizar en forma extensiva para evaluar la magnitud de la transmisión en el medio endémico.

5. HIPOTESIS

El cisticerco de *T. solium* expresa antígenos inmunodominantes, los cuales pueden ser identificados mediante las técnicas de proteómica (geles en doble dimensión (2D-PAGE), inmunoblot y espectrometría de masas). Estos antígenos no se comparten con otras especies cercanas en el árbol filogenético y pueden ser útiles para diagnóstico y desarrollo de nuevas vacunas.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el patrón de antígenos inmunodominantes específicos del cisticerco de *T. solium*, mediante proteómica que puedan ser útiles en el diagnóstico.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificación de antígenos inmunodominantes específicos del cisticerco de *T. solium*,
2. Análisis de los antígenos inmunodominantes específicos del cisticerco de *T. solium* por espectrometría de masas
3. Análisis de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en la base de datos del genoma de *T. solium*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Obtención de parásitos

Los cisticercos de *Taenia solium* se obtuvieron del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente de zonas endémicas del estado de Morelos, que se trasladaron a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, los cerdos se sacrificaron de acuerdo a la norma.

7.2 Preparación del extracto de proteínas totales de cisticercos de *T. solium*

Los parásitos se lavaron con solución salina amortiguadora (SSA), a continuación se lisaron con solución amortiguadora de lisis (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% y Tris 10 mM, mas los inhibidores de proteasas EDTA 0.5M, PMSF 200mM, Leupeptin 10mM y Pepstatin 1mM) en una relación de 3ml por 1 gramo de peso húmedo de parásitos. Después la suspensión se agitó fuertemente en vortex por 3 min. y se dejó en reposo por 10 min. a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 14000g por 15 min., se recuperó el sobrenadante y el extracto fue almacenado en alícuotas a -70°C hasta su uso. La determinación de la concentración de proteínas se realizó empleando el 2-D Quant kit de Amersham y la integridad de las proteínas se confirmó con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE en condiciones reductoras.

7.3 Geles de electroforesis en doble dimensión 2D-PAGE

Los geles 2D, se realizaron por triplicado utilizando tiras con gradiente de pH inmobilizado (IPG), de 7cm e intervalos de pH de 3-10 y de 3-6. La muestra que contenía 150 µg de proteína se diluyó con 125 µl de solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 0.86 M, 2% de anfólinas y azul de

bromofenol). Con esta solución se re-hidrato la tira por un mínimo de 12 horas. El isoelectroenfoque se realizó en la cámara Protean IEF Cell (Bio-Rad), con el siguiente protocolo: temperatura de 20 °C, corriente de 50 μ A, 250V -30 min, 4000V- 2h y 4000V -10000V/H.

Una vez realizado el isoelectroenfoque, la tira se equilibró en solución de equilibrio (urea 6M, Tris-Cl, pH 8.8 50mM, glicerol 30%, SDS 2% y trazas de azul de bromofenol) en dos periodos de 15 minutos: el primero con DTT (100mg/10ml) y el segundo con iodoacetamida (250mg/10ml). La segunda dimensión se realizó a partir de geles comerciales de poliacrilamida al 12% (Precast-gels de Bio-Rad) a 200V. Los geles posteriormente se tiñeron con nitrato de plata o azul de Comassie, cuando el gel fue usado para análisis por espectrometría de masas. Todas las imágenes se analizaron con el programa PD-Quest (Bio-Rad).

7.4 Análisis de imágenes

Los geles teñidos con nitrato de plata se escanearon y se analizaron con el software PDQuest (Bio-Rad). Para el análisis se adquirieron 3 repeticiones de cada gel, a partir de las cuales se construyó un gel maestro que fue representativo de cada condición.

Los pesos moleculares se asignaron de acuerdo a los marcadores de peso molecular de rango amplio para tinción con plata (SIGMA-ALDRICH) y para calcular los puntos isoeléctricos (p.I) se calculó el Rf (% de corrimiento) que se interpoló en la gráfica de Rf vs p.I correspondiente para tiras con gradiente de pH no lineal 3-10 y para tiras de pH lineal 3-6.

7.5 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Las proteínas separadas por electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 μ (Hybond ECL de Amersham) (Anexo 3). Después de la transferencia, las membranas se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

7.6 Inmunoblot

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con leche descremada al 10% en SSA durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente se incubó la membrana con las muestras de suero diluidas 1/20 y 1/50 en leche descremada al 10% en SSA, durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras de suero que se utilizaron fueron las siguientes:

- suero de cerdos cisticercosos.
- suero de cerdos negativos por necropsia seropositivos (falsos positivos).
- suero de cerdos negativos por necropsia seronegativos (control negativo).
- suero de cerdos con otras parasitosis (*Ascaris spp.* y *Cysticercus tenuicollis*).

Luego de las dos horas de incubación con las muestras de suero, se realizaron tres lavados con SSA-Tween 20 al 0.1% con agitación fuerte, durante 10min.

Posteriormente se incubó la membrana con el segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo acoplado a peroxidasa (Sigma), en una dilución 1/500 en SSA-Tween 20 al 0.1%, durante dos horas a temperatura ambiente y al termino se realizaron de nuevo tres lavados con SSA-Tween 20 al 0.1% con agitación fuerte, durante 10min. Finalmente se reveló utilizando el sustrato 4-cloro-o-naftol. Para esto se preparo un stock de 4-cloro-o-naftol a una concentración de 3mg/ml en metanol. Se tomaron 2ml del stock más 10 ml de SSA y 10µl de peróxido de hidrógeno. La reacción se llevo a cabo a temperatura ambiente con agitación lenta y se detuvo con agua destilada.

7.7 Análisis de inmunoblots

Para la detección de las manchas (del inglés spot) inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium*, se analizaron y compararon todos los ensayos de inmunoelectrotransferencia y se tomaron en cuenta únicamente aquellas manchas que fueron reproducibles, es decir, que aparecieron en por lo menos dos de los tres ensayos de western-blot realizados con las muestras de suero de cerdos

cisticercosos, y que además no se compartieron con ninguna de las manchas que reaccionaron al utilizar los controles falsos positivos, controles negativos y sueros de cerdos con otras parasitosis (*Ascaris spp.* y *Cysticercus tenuicollis*). Para esto se compararon los PM y p.I de cada mancha y se analizaron con el software PD-Quest.

7.8 Identificación de proteínas por LC/ESI-MS/MS

Las manchas que resultaron ser inmunodominantes y específicas para el cisticerco de *T. solium*, fueron recortadas de un gel en doble dimensión (2-D-PAGE) teñido con azul de Coomassie. La digestión de las manchas fue llevada a cabo, siguiendo el procedimiento de Kinter y cols., 2000. Brevemente, las manchas individuales fueron lavadas y desteñidas, en 0.5 ml de una mezcla de metanol 50% / ácido acético 5% toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente fueron deshidratadas con 200 µl de acetonitrilo y secadas completamente mediante centrifugación al vacío. Luego las manchas fueron reducidas con 50 µl de DTT 10mM y alquiladas con 50 µl de iodoacetamida 100mM (cada procedimiento se llevo a cabo durante 30 min a temperatura ambiente). Después las manchas fueron lavadas con bicarbonato de amonio y acetonitrilo y posteriormente secadas por centrifugación al vacío. La digestión se realizó utilizando tripsina porcina modificada y durante toda la noche a 37°C. Los péptidos generados en la digestión fueron recuperados mediante extracciones sucesivas con 50 µl de bicarbonato de amonio 50mM y 50 µl de una mezcla de acetonitrilo 50% / ácido fórmico 5% (2x). Finalmente el extracto total fue concentrado mediante centrifugación al vacío a 20 µl para el análisis.

El análisis de espectrometría de masas fue llevado a cabo, mediante un sistema QTRAP 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada) equipado con una fuente de nanoelectrospray y un sistema LC (cromatografía de líquidos) de nanoflujo (Agilent 1100 Nano Pump, Waldbronn, Germany). El espectro de inspección con sistema híbrido triple cuadrupolo / trampa lineal fue hecho con

[Glu1]- fibrinopéptido B. Las muestras digeridas fueron inyectadas en una columna C18 Zorbax 300SB (3.5 mm, 5060.075 mm², Agilent), equilibrada con acetonitrilo al 2%, ácido fórmico al 0.1% y separadas mediante un gradiente lineal de 2 a 70% de acetonitrilo y ácido fórmico 0.1% durante un periodo de 80 min con flujo de 300 nL/min. El voltaje para el Spray fue de 2.4 kV. Los iones precursores fueron seleccionados en el cuadrupolo Q1 y escaneados en el modo de espectrometría de masas mejorada (del inglés enhanced Spectrometry Mass EMS). El rango de escaneo para EMS se ajustó en m/z 400–1500 y 4000 uma/s. Los iones seleccionados en Q1, fueron sometidos a un escaneo de resolución mejorada con una velocidad baja de 250 uma/s en un estrecho rango de masas (30 amu) y luego a un escaneo mejorado de iones producto (MS/MS). Los iones precursores fueron fragmentados por disociación activada por colisión (DAC) en la celda de colisión del cuadrupolo Q2. Los fragmentos iónicos generados fueron capturados y analizados en el cuadrupolo Q3 trampa lineal de iones (LIT). La búsqueda en la base de datos (NCBIInr) y la identificación de proteínas, se realizaron con el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Los criterios para aceptar la identificación de una proteína como válida fueron: que existiera match de dos o más péptidos trípticos con la secuencia de la proteína y al menos un péptido con $p < 0.05$, así como aquellas proteínas que presentaron un mayor score. Este valor describe la confianza de los resultados y es equivalente al 95% de probabilidad de que el resultado no es un falso positivo. Los resultados reportan que un score mayor de 44 indica identidad o extensa homología ($p < 0.05$).

7.9 Análisis de secuencias con la base de datos del genoma de *T. solium*

Se analizaron las secuencias de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en la base de datos del genoma de *T. solium*. Esto se llevó a cabo, ya que, dichas secuencias presentan similitud con proteínas identificadas previamente en parásitos cercanos a *T. solium*.

Para esto, se llevo a cabo un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas identificadas por espectrometría de masas con la base de datos del genoma de *T. solium*, para encontrar los diferentes contigs que tuvieran homología con dichas secuencias y finalmente poder identificar la secuencia específica para *T. solium*.

Adicionalmente, se realizo BLAST para cada una de las secuencias identificadas para *T. solium*, para conocer el grado de identidad de las proteínas con las reportadas para otros parásitos.

8. RESULTADOS

8.1 Electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE), del cisticerco total de *T. solium*

Al analizar los geles con el software PD-Quest, se observó en promedio un total de 238 manchas, cuyos PM abarcaron desde 12.6 a más de 180 kDa y sus p.I se encontraron entre un intervalo de pH de 4 a 8 (Figura 1).

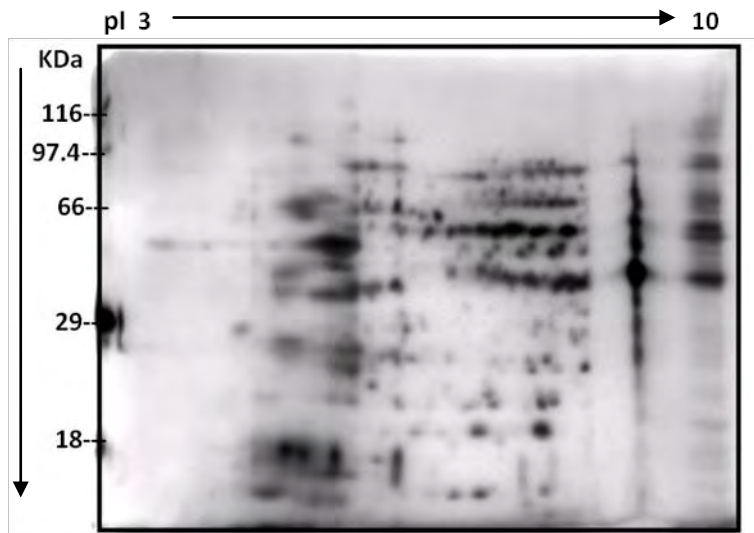


Figura 1. Gel representativo de las tres replicas en doble dimensión (2D-PAGE) del extracto total de proteínas de cisticercos de *Taenia solium*, teñido con plata.

En los geles también se pudo observar que en la zona ácida (entre pH 4.5 a 5.8 y PM entre 66 y 16 kDa), las manchas se resolvieron muy poco. Por esta razón se repitieron los geles utilizando un intervalo de pH de 3-6 y además se limpiaron las muestras utilizando el ReadyPrep 2-D Cleanup kit para tener una mejor resolución de dicha zona. Los resultados mostraron una mejor resolución de las manchas (Figura 2).

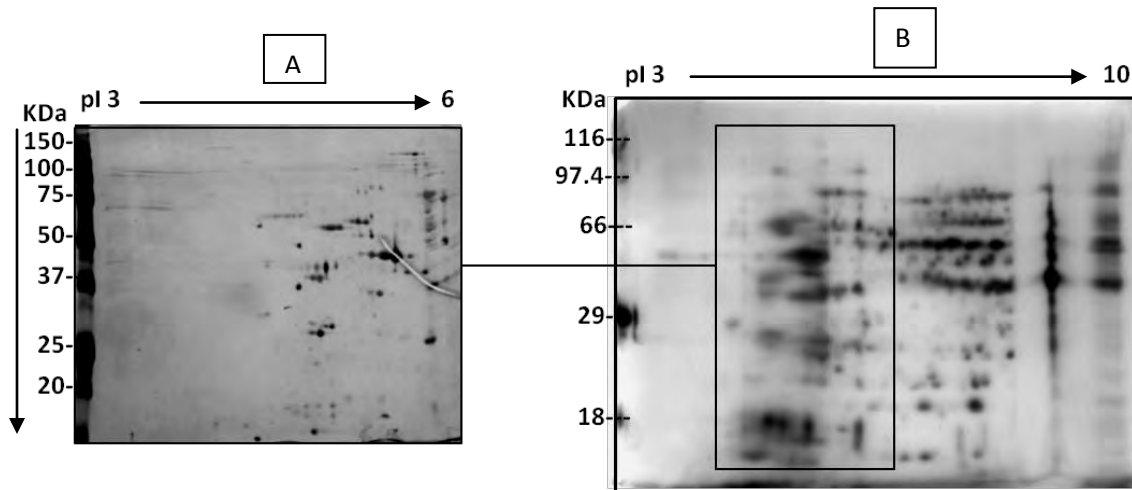


Figura 2. Comparación entre geles de electroforesis 2D-PAGE teñidos con plata y realizados con tiras IPG de 7cm y diferentes rangos de pH: A) pH 3-6 y B) pH 3-10.

8.2 Identificación de proteínas inmunodominantes a partir de diferentes muestras de suero

Para investigar la antigenicidad de las proteínas presentes en el extracto total de cisticerco de *T.solium*, se realizaron ensayos de inmunoblot. El primer ensayo se realizó a partir de un gel de poliacrilamida de una dimensión (SDS-PAGE), que fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó como primer anticuerpo una mezcla de diferentes muestras de suero a una dilución 1/20: mezcla de sueros de cerdos cisticercosos, cerdos no cisticercosos por necropsia, y seropositivos (falsos positivos) y cerdos no cisticercosos por necropsia y seronegativos. En el ensayo se observó, que las bandas de PM entre 37 y 20 kDa, son reconocidas específicamente por la mezcla de muestras de suero de cerdos cisticercosos (Figura 3).

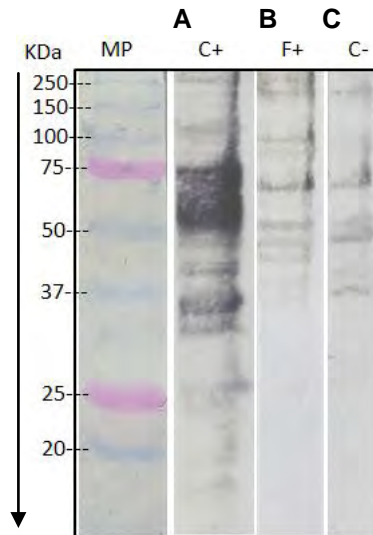


Figura 3. Inmunoblot del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra diferentes mezclas de sueros. A) mezcla de 5 muestras de suero positivas para cisticercosis, B) mezcla de 6 muestras de suero de cerdos no cisticercosos por necropsia y seropositivos y C) mezcla de 5 muestras de sueros de cerdos no cisticercosos por necropsia y seronegativos. MP. Marcadores de peso molecular pre-teñidos (BIO-RAD)

Posteriormente para conocer a cuantas proteínas correspondían las bandas entre 37 y 20 kDa y para corroborar su reacción con la mezcla de suero de cerdos cisticercosos, se realizaron ensayos de inmunoblot a partir de geles en doble dimensión (2D-PAGE) y utilizando las mezclas de sueros mencionadas anteriormente.

Los primeros ensayos, se realizaron por triplicado con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos en una dilución 1/20, los resultados mostraron en promedio un total de 37 manchas, que reaccionaron con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos; los cuales se encontraron en un p.I aproximadamente de 3.6 y 8.0, con PM entre 20.5 y 150 kDa (Figura 4A). Por otro lado también se probaron las diluciones 1/50 y 1/100 de la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos. En la dilución 1/50 se observó un total de 22 manchas y en la dilución 1/100 se observaron 13 manchas (Figura 4B).

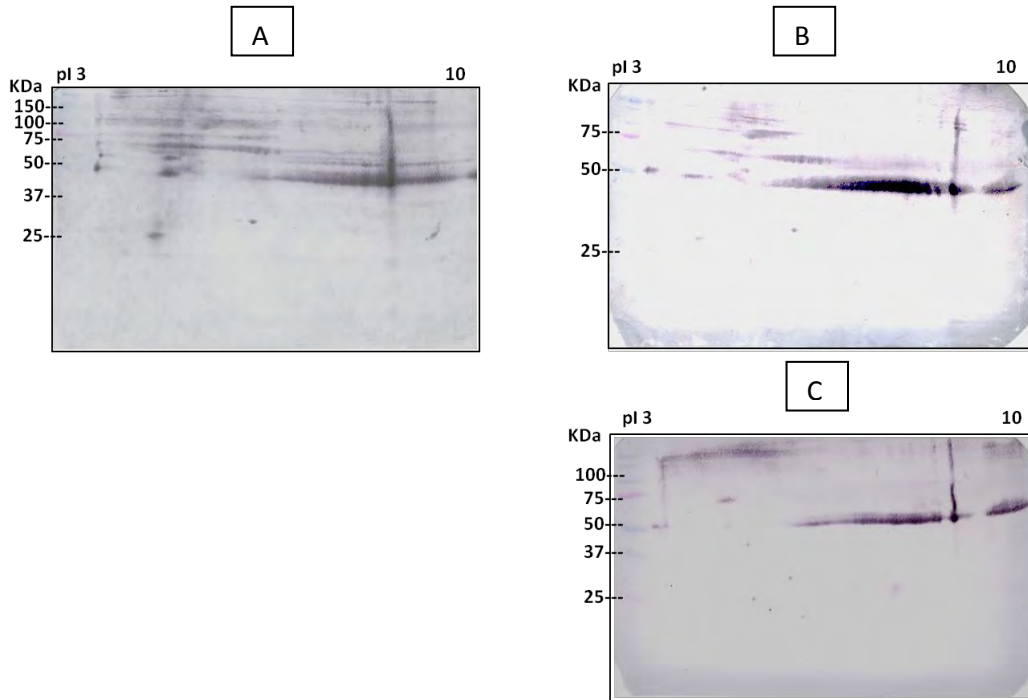


Figura 4. Inmunoblots representativos de tres ensayos, del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos a diferentes diluciones: (A) 1/20, (B) 1/50 y (C) 1/100.

Los siguientes ensayos de inmunoblot se realizaron utilizando la mezcla de sueros de cerdos no cisticercosos por necropsia y seropositivos y la mezcla de sueros de cerdos no cisticercosos por necropsia y seronegativos, en una dilución 1/20 y 1/50. Estos ensayos sirvieron para excluir del estudio, aquellas manchas que también fueron reconocidas con dichos controles y de esta manera poder elegir aquellas específicas del cisticerco de *T. solium* (aquellas que son reconocidas exclusivamente con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos y que aparecieron en los 3 o por lo menos dos de los tres ensayos independientes de inmunoblot).

Los resultados de los ensayos mostraron que la dilución 1/50 de la mezcla de sueros es la más adecuada para la identificación de las manchas inespecíficas. Se observó un total de 9 manchas que fueron reconocidas con la mezcla de sueros de cerdos no cisticercosos por necropsia y seropositivos y que se encuentran en

un p.I entre 3.4 y 8.6 y PM de 50 kDa (Figura 5). Al mismo tiempo los ensayos realizados con la mezcla de sueros de cerdos no cisticercosos por necropsia y seronegativos mostró en promedio un total de 11 manchas que fueron reconocidas con dicha muestra de suero y que además se encontraban en un intervalo de p.I de 3.4-8.3 y PM de 50 kDa (Figura 5).

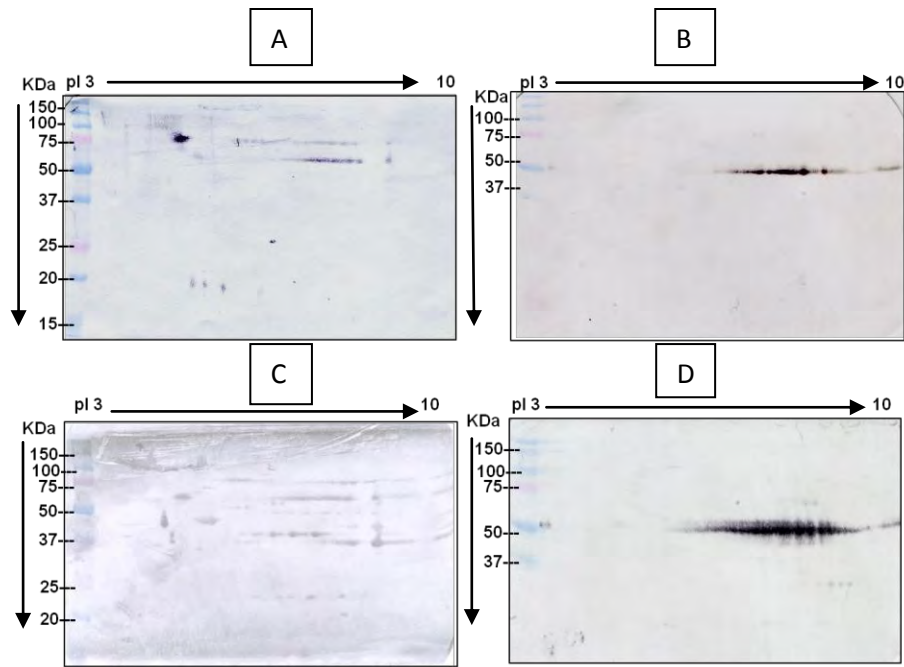


Figura 5. Inmunoblots representativos de tres ensayos, del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros de cerdos no cisticercosos por necropsia y seropositivos a una dilución de 1/20 (A) y 1/50 (B), y de cerdos no cisticercosos por necropsia y seronegativos a una dilución 1/20 (C) y 1/50 (D).

Se analizaron y compararon los p.I y PM de las manchas que se reconocieron en cada uno de los ensayos de Inmunoblot mencionados anteriormente (Figura 4 y 5). Los datos obtenidos mostraron que de las 37 manchas que se evidenciaron con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos (Figura 4) un total de 7 manchas fueron específicas y además reproducibles (Figura 6).

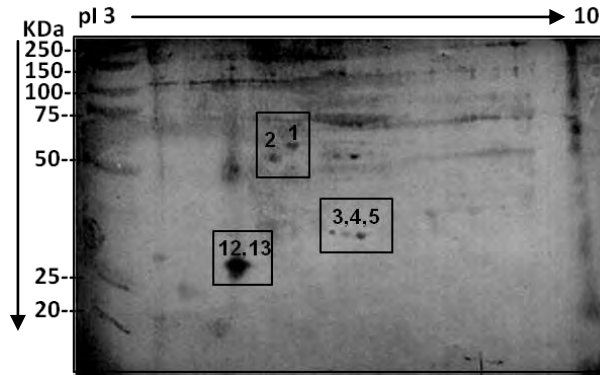


Figura 6. Inmunoblots representativo de tres ensayos, del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros de cerdos cisticercosos. Los números indican las 7 manchas que fueron específicas y reproducibles.

Estas manchas según el análisis presentan un p.I entre 4.9-5.7 y PM de 25 a 47.8 kDa. Por el contrario la mayoría de las manchas que fueron inespecíficas presentan un p.I entre 6-8.7 y PM de 50 kDa. Las manchas restantes de más de 75 kDa fueron excluidas del estudio; ya que, estas también se reconocieron en los inmunoblot con el control falso positivo y negativo cuando se probaron a una dilución 1/20.

Por otro lado, para evaluar si alguna de las 7 manchas inmunodominantes identificadas podrían presentar reacción cruzada con otras parasitosis, se llevó a cabo ensayos de inmunoblot utilizando muestras de suero de cerdos infectados con *Ascaris spp.* y *Cysticercus tenuicollis*, que son parásitos que se presentan comúnmente en los cerdos. La dilución de las muestras de suero de cerdos infectados con estas parasitosis fue de 1/20.

Los resultados mostraron que ninguna de las 7 posibles manchas inmunodominantes se comparte con las de estas parasitosis (Figura 7).

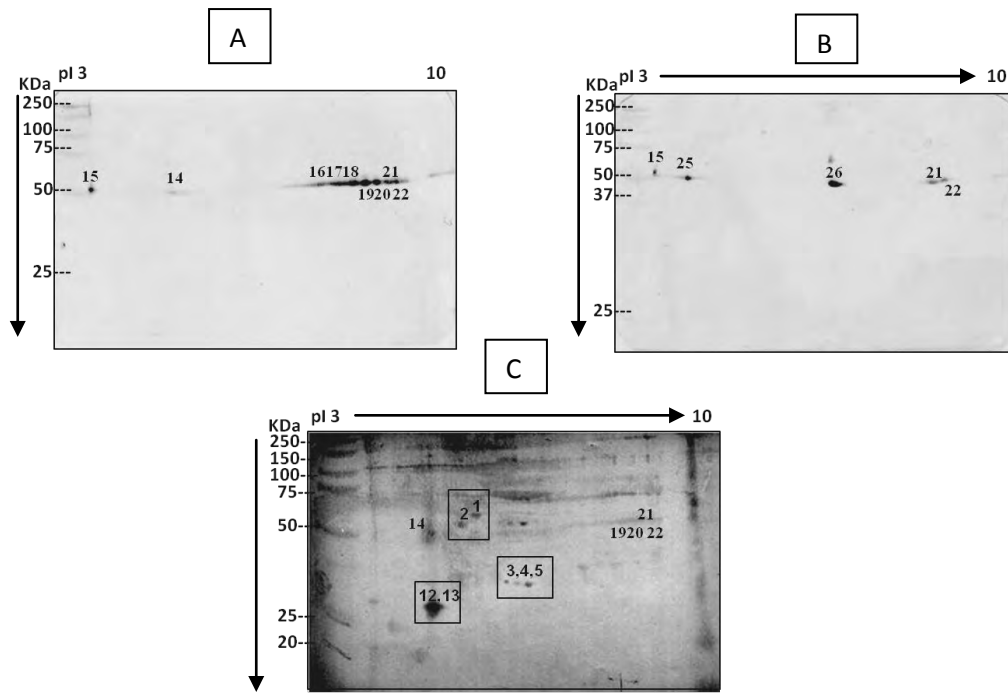


Figura 7. Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra muestras de suero de cerdos infectados con *Cysticercus tenuicollis* (A), con *Ascaris spp.* (B) y con *T. solium* (C). Los números indican las manchas inespecíficas que se comparten en todos los ensayos y los cuadros indican las posibles manchas inmunodominantes que solo se reconocen con la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos. La imagen C, es la misma que se observa en la figura 6.

La reacción de las manchas con p.I entre 3.6-7.6 y PM de 50 kDa, que se observa en todos los ensayos realizados, corresponde a la reacción generada por el segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo (Figura 8).

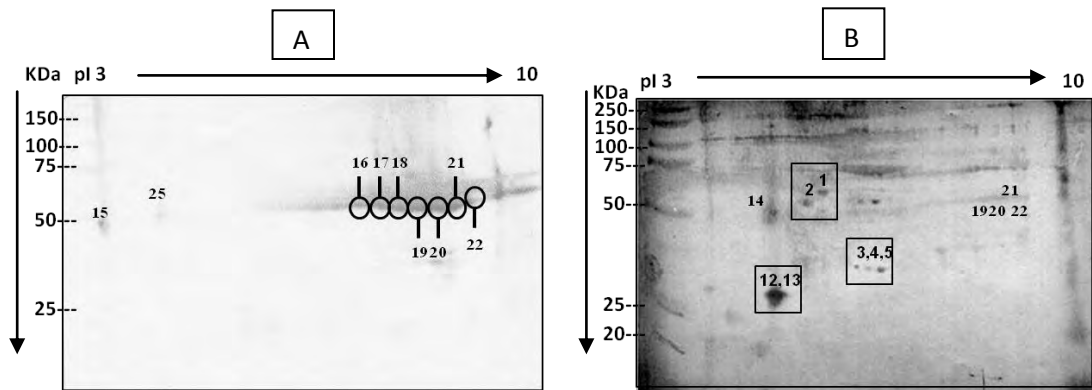


Figura 8. Inmunoblots del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo (A) y mezcla de sueros de cerdos cisticercosos (B). La imagen 8B, es la misma que se observa en la figura 6. En los círculos se señala la reacción causada por el segundo anticuerpo la cual no corresponde a ninguno de las 7 posibles manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* (cuadros).

Debido a que anteriormente se observó que las manchas ácidas se resolvían mejor en un intervalo de pH 3-6, se llevo a cabo un inmunoblot utilizando este intervalo de pH. Los resultados mostraron que las 7 manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* identificadas hasta el momento, se resolvían mejor dando un total de 13 manchas inmunodominantes (Fig. 9).

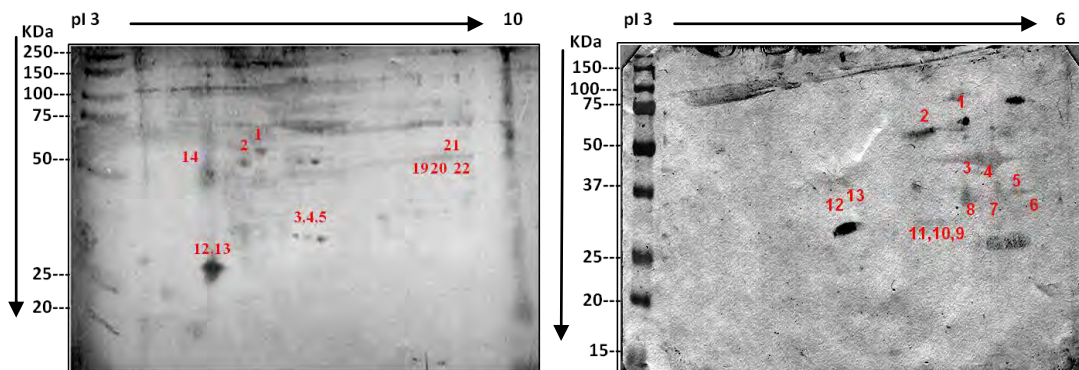


Figura 9. Inmunoblots representativos de tres ensayos, del extracto total de proteínas de cisticercos de *T. solium*, contra mezcla de sueros de cerdos cisticercosos a diferentes intervalos de pH. A) pH 3-10 y B) pH 3-6.

8.3 Identificación de proteínas inmunodominantes por espectrometría de masas (LC/ESI-MS/MS)

Se realizó un gel 2D-PAGE a partir de tiras IPG de 7cm con rango de pH de 3-10, donde se logra observar las 7 manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium*. El gel fue comparado con el inmunoblot correspondiente, para de esta manera poder identificar las manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* en el gel y posteriormente ser analizadas por espectrometría de masas (Figura 9).

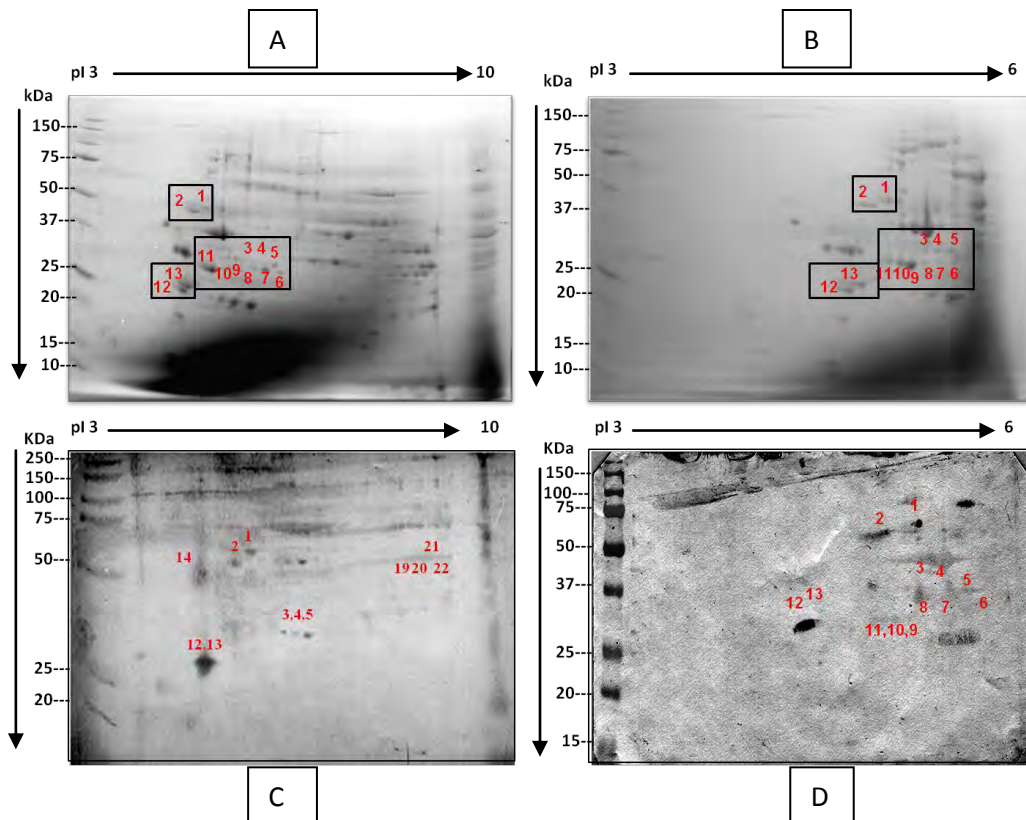


Figura 10. Identificación de las manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* que fueron analizadas por espectrometría de masas. A) Se observa el gel en 2D-PAGE teñido con azul de comassie coloidal y realizado con tiras de pH 3-10, B) Gel en 2D-PAGE realizado con tiras de pH 3-6, C) Inmunoblot con intervalo de pH3-10 y D) Inmunoblot con intervalo de pH 3-6. Los números en rojo dentro de los recuadros de las figuras A y B indican las manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* que fueron recortadas del gel para el análisis por espectrometría de masas, las cuales coinciden con los números de las figuras C y D.

De las 13 manchas digeridas con tripsina y analizadas mediante espectrometría de masas, se logro identificar un total de 9 proteínas (Anexo 1), las cuales presentaron similitud con proteínas conocidas previamente en otros parásitos como *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Echinococcus multilocularis* y *Echinococcus granulosus*.

Según los datos obtenidos (Anexo 1), de las 13 manchas que se analizaron por espectrometría de masas, la mayoría fueron proteínas de parásitos, específicamente helmintos que están relacionados con *T. solium*. De estas un total de 5 corresponden a proteínas involucradas en procesos de señalización (Anexina 1, la proteína 14-3-3 y la quinasa dependiente de Amp cíclico), 4 correspondieron a proteínas del citoesqueleto (α -tubulina 1, β -tubulina 2, una proteína similar a la α -tubulina y la tropomiosina 2), 3 correspondieron a la proteína pequeña de choque térmico (small heat shock protein) involucrada en la protección contra estrés ambiental y finalmente una correspondió a la proteína piruvato deshidrogenasa, involucrada en metabolismo.

8.4 Análisis de secuencias de las proteínas inmunodominantes con la base de datos del genoma de *T. solium*

A partir del análisis de las secuencias de proteínas identificadas por espectrometría de masas, se encontró homología de dichas secuencias con diferentes contigs, pudiéndose identificar la secuencia para *Taenia solium* (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las 9 proteínas inmunodominantes en *T. solium*.

1. Alfa tubulina-1
WEVISDEHGIDPTGTYHGSDQLERINVYNEASGGKYVPRAILVDLEPGTMDSVRAGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVIRKEAESDCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMVTVSVVSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDLCFRTLKLSNPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPQGLNADLRKLA VMVFPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALSVP ELTQQMFDAKNMMAACDPRHGRYLTVA AIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWIPNNVKPPLKMSATFVGNSTAIQELFRRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGE GMDMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEDEGEFDEEE
2. Antígeno cC1
MAYCRSLVHLYAPNGEKYKPTITPTPGFSPTADAEHLKRAMRGLTNERAIIIDILGNRTSAERMAIRDAYPSISSKTLHDA LTSELSGKFRRFALLLIQSPWQVMAEALYDAMKAGATKERVLEI IAGCSKDDI PQLKKA FEEVSGGETLDDAIKGD TSGDYREALLLALAGQADEPQAMQLKNLTPSTLSQVVNPGLAETDAKELYACGEGRPGTAESRFMRPIVNRSLFQLNATNEAYNRAYGHPLIDA IKKETS RDLEDFLITRVRATDRASLFAELLHFAMRGAGTKDSTLQRVLALRADTDLGSIKEKYAELYGETLEAAIKGD TSGDYEALCLKLIGPA
3. Beta tubulina
MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGTYHGSDQLERINVYNEASGGKYVPRAILVDLEPGTMDSVRAGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVIRKEAESDCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMVTVSVVSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDLCFRTLKLSNPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPQGLNADLRKLA VMVFPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALSVP ELTQQMFDAKNMMAACDPRHGRYLTVA AIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWIPNNVKTA VCDIPPRGLKMSATFVGNSTAIQELFRRVSEQFTAMFRRKAFLHWYTGE GMDMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDATAEDEGEFDEEEVEEA
4. Similar a la alfa-tubulina
EVRCGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIVDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLIFHSFGGGTSGSFTSLLMERL SVDYGGKSKLEFSVYPAPQISTAVVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNLIGQIVSSI TASLRFDGALNVDLTFEQTNLVPYPRIHFPPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYM ACCMLYRGD VVPKDVNAAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKVGINYQPPTVVPGD LAKVQRAVCMLSNNTAIAEAWARLDHKFDLMYGRKAFVHWYVGE GMEEGEFSEAREDLAAL EKDYEEV GIDSV EAE GEEGEEY
5. Piruvato deshidrogenasa
MTVREAINSALKEEIERDKNVFILGEEVAQYD GAYKVTKNLWRTFGDDRVIDTPISEMGTGIAVGAAMAGSRPVCEFMTFNFAMQAI DQI INSAAKTHYMSNGRVNVPILFRGGNGAAAGVAAQHSQDYAAWYASCPGLKVVAPYSTEDARGLTKAGIRDDDPVVSLENELMYGVAMDTSD EAMHPDFLIPFGKAKIEREGCDVTLVSYISVGDCEAADQLAKDGINCEVINLRSRPI DDKCIFTSVKKTHHLVTVDRAWPTCGI GAEICARIMEITGADVMPYAGCLEAACTSHAPNIITTVKVLN
6. Quinasa dependiente de Amp cíclico
KKAVDVPAGLREILQDFTVAVLRNRP SNIINFAAEYFEMKKNQOKENEDAESDEEVMAPP IRARRRQGVAAESYDPEKEDKFEKVVHEKTEEQRQLTNATKGILLFRCLDE DQMRDVIDAMFERKVEVGEKVITLGEDGDNFYVIEKGVYDIIVKVDGVEK KVGQYDNGSFGELALMYNTPRAATI QATTPGILWAMTREVFRSIVLKS AFKKRQMYEELLNQVPILQSL SAYERMSIADALHTQIYEEGTKIISQGE GDEMYFVEDGEVRITMKSGSDEETELTRIKKGGYFGELALLTKHPRAASVYAITR TKLAVLDVGSFERLLG PCLDILQRNIDNYENQLKSVFGLSDNVP ELR
7. Tropomiosina 2
MIGSTAESLLETIKKKILASKVTVKT LALELESKQALLKAEKEKREKAEAEVAALQRRIRLLEDDLESTDRLT DATAKLEEASKAADESERFRRALQSRQVTD DTRIEELQQR IQKTAKEAAEAERKYQEATQELATAESALAAA EKRVEDAEGRIHSM EHELRAITTNLKTMESESTASKQKQTYQATLEKLT KQLAEAEKRTALAESETLKRQEELARLET ELDAEKT MNASLREDMENIAAELQNI
8. Proteína 14-3-3
MSSLSKREENVYMAKLCEQCERYDEMVKAMKDVLESAGDLTVEERNLLSVAYKNVVGARRSSWRV I S SIEQKHDGDAKMQIAKKVREEIEKELNATCREILDLLDKTLLPAASNSESKIFFLKMKGDYRYVAEFC TGEERKQASDNSLTAYKAATDVAEADMQTTHPIRLGLALNFSVFYIEIMNNPKRACELARKAFDDAVAELDTLPEESYKDATLIMQLLRDNLTLWNSDTGE
9. Proteína pequeña de choque térmico
MSIFPTRDNRDLSSRRSLIDWEFPQMALVPLDQVFDWAERSRQSLHDDIMNVHRNLF SLEPFTAMDNAFESVMKEMSAIQPREFHPELEYTQPGE LDFLKDAYEVGKDGRLHFVYFNVKNFKAEEITIKADKNKLVVRAQRSVACGDAAMSESVGRSIPLPPSVDRNHIQATITSDDLVIEAPVNEPNYKAIKLNPEKGLAIQPSVQERQLAVTNKEGLEVVTAEDGSKMHL ELKVPDHF AAKDVKVWAKGNKVYVHGVTGKEEKTENASHSEHREFYKAFVTPEVIDASK

Posteriormente se le realizó BLAST a cada una de las proteínas específicas de *T. solium* (Tabla 1), para conocer el grado de identidad que presentan con proteínas reportadas para otros parásitos relacionados. Los alineamientos mostraron que de las 9 proteínas identificadas, un total de 7 presentan secuencias con pequeñas diferencias en algún o algunos aminoácidos, al parecer específicos para *T. solium* (Anexo 2). Los alineamientos se llevaron a cabo con las secuencias de aminoácidos de los parásitos que resultaron del BLAST y que se relacionan con *T. solium*.

Estas 7 proteínas podrían ser antígenos útiles para el diagnóstico de la cisticercosis. Algunas de ellas como la tropomiosina y la alfa-tubulina, han sido reportadas en el estado adulto de *T. solium* y en cisticercos (Valverde y cols., 2011); mientras que la proteína 14-3-3 ha sido reportada en las oncosferas y en el cisticerco (Santivañez y cols, 2010) y la proteína pequeña de choque térmico en cisticercos (Ferrer y cols, 2005).

9. DISCUSIÓN

9.1 Patrón de proteínas que expresa el cisticerco de *T. solium*

En el presente estudio, la separación de las proteínas del cisticerco de *T. solium* mediante la electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE) seguida de ensayos de inmunodetección con sueros específicos y de inmunoelectrotransferencia (EITB), permitieron detectar antígenos inmunodominantes específicos de cisticercos de *T. solium*.

La electroforesis bidimensional 2D-PAGE permite separar miles de proteínas en un solo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas. La alta resolución de la técnica se debe a que las dos separaciones se basan en parámetros independientes y una de las aplicaciones que presenta es la de identificación y caracterización de proteínas (Blackstock W, 2001). Por tales motivos, en el presente trabajo se utilizó la proteómica, un método que ha sido de utilidad para la identificación de antígenos relevantes en la cisticercosis y otras parasitosis (Chemale y cols, 2003; Sánchez y cols, 2006; Fang y cols, 2009; Salazar y Lindh, 2011).

En los geles (2D-PAGE) de las proteínas separadas por isoelectroenfoque realizados en tiras IPG de pH 3-10, se obtuvo en promedio un total de 238 manchas. Este número aumentó al efectuar los geles 2D-PAGE con tiras IPG de pH 3-6, lo cual permitió una mejor resolución de las manchas ubicadas en la zona ácida (Figura 2). Con respecto al número de manchas detectadas en el cisticerco (ó estado larval) de otras especies del género *Taenia*, no se tienen datos; ya que, no existe aún un mapa proteómico con el cual se pudieran comparar los resultados obtenidos en este estudio. El antecedente más próximo, es un estudio proteómico en oncosferas activadas de *T. solium* (Santivañez y cols, 2010). En el estudio se efectuó el análisis de los péptidos de oncosferas activadas por espectrometría de masas (LC/MS/MS), el cual dio un total de 88 moléculas

identificadas, de las cuales 20 no presentaron homología con proteínas conocidas y 3 fueron contaminación (por manipulación durante el análisis o la digestión).

Por el contrario, en el presente trabajo donde se utilizó el cisticerco completo se observó un número mayor de manchas, lo cual podría deberse a varias hipótesis: una de ellas es que, es el mejor tipo de técnica, o que en el estudio reportado, al digerir las oncosferas activadas directamente sin una previa separación y purificación de las proteínas, se pudieron perder un porcentaje de las mismas, también probablemente se pierde gran cantidad de proteínas de la oncosfera, al desprenderse de su cubierta a medida que se activa y va migrando hacia los diferentes órganos o tejidos del organismo.

9.2 Proteínas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* identificadas por Inmunoblot

Por otro lado, mediante ensayos de inmunoblot, se pudo identificar cuáles de las 203 manchas que expresa el cisticerco de *T. solium*, eran reconocidas por el sistema inmune y además específicas. En los primeros ensayos se pudo identificar un total de 37 manchas inmunoreactivas con las muestras de suero de cerdos cisticercosos, de las cuales 7 no fueron reconocidas por los controles (falsos positivos y negativos). Así mismo, se observó también un reconocimiento de manchas inmunoreactivas con el control falso positivo en una dilución 1/20 (cerdos no cisticercosos por necropsia y seropositivos. Figura 3), el cual se presentó probablemente porque dichos cerdos pudieron estar en algún momento en contacto con el parásito y pudieron resolver la infección o está no se estableció. También hay que tener en cuenta que los anticuerpos pueden permanecer por largos periodos de tiempo después de que el parásito ha sido eliminado (Deckers y cols, 2010), por lo que en este caso la reacción que se observa indicaría la exposición al parásito, mas no una infección establecida y por tal motivo todas las manchas inmunoreactivas no serian útiles para diagnóstico. Por otro lado el reconocimiento antigénico por parte del control negativo (mezcla de sueros de

cerdos no cisticercosos por necropsia y seronegativos. Figura 3), pudo darse porque probablemente algunas proteínas del cerdo pudieran estar compartiendo epítopes con antígenos presentes en el cisticerco. Sin embargo el que las muestras de suero estén muy concentradas también influye en que se presenten muchas reacciones inespecíficas, razón por la cual se decidió diluir mas la mezcla de sueros control. La dilución que se probó fue 1/50 en donde disminuyo efectivamente el fondo generado por las reacciones inespecíficas observándose únicamente en ambos controles una serie de manchas de 50kDa que correspondía a la reacción dada por el segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo (Figura 5).

Cuando se probó la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos en una dilución 1/20, se observó un promedio de 37 manchas inmunoreactivas; no obstante, al probar una dilución 1/50 ya no se observaron algunas manchas o estas eran muy tenues (total de manchas 22) y en la dilución 1/100 la reacción que permaneció fue la de las manchas de 50 kDa correspondiente a la reacción del segundo anticuerpo anti-IgG de cerdo (Figura 4). A partir de los resultados anteriores, se escogió la dilución 1/20 de la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos y la dilución 1/50 de las mezclas de sueros control, para el análisis e identificación de las manchas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium*.

El análisis se realizó comparando los valores de p.I y PM de las manchas inmunoreactivas en cada uno de los ensayos de inmunoblot. De esta manera se pudo observar cuales de las 37 manchas inmunoreactivas (Figura 4A) no compartían p.I y PM con las manchas que fueron reconocidas por las muestras control y de esta manera proponerlas como inmuno-específicas para las muestras de suero de cerdos cisticercosos.

El cerdo puede ser infectado también por otra especie del género *Taenia*, como es el cisticerco de *Taenia hydatigena* conocido como *Cysticercus tenuicollis*, y con la forma larvaria de *Echinococcus granulosus* conocido como quiste hidatídico. Estos dos parásitos se encuentran relacionados con *T. solium*, y por tal razón son importantes controles para evaluar la especificidad de los antígenos de interés.

Por otro lado existen dos tipos de nematodos que también pueden ser controles importantes; ya que, infectan cerdos de una manera importante en México, como se demostró en un estudio, donde los parásitos del género *Trichuris*, *Ascaris*, *Trichinella* y el orden *Strongylida* resultaron ser unos de los principales parásitos a nivel gastrointestinal en cerdos (Rodríguez y cols, 2001). Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo fue importante evaluar que las manchas inmunoreactivas de interés que habían sido inmuno-específicas hasta el momento para la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos, no se compartieran con las manchas inmunoreactivas con muestras de suero de cerdos infectados con otras parasitosis (*Cysticercus tenuicollis* y *Ascaris spp.*). A partir de estas muestras se realizaron ensayos de inmunoblot utilizando una dilución 1/20 de cada muestra de suero. Los resultados mostraron que ninguna de las manchas inmunoreactivas de interés se comparte con las que fueron reconocidas por los controles (Figura 7), indicando que hasta el momento dichas manchas pudieran ser inmuno-específicas para el cisticerco de *T. solium*. Sin embargo aún faltaría evaluar las muestras de suero con los otros parásitos mencionados anteriormente para asegurar su especificidad.

9.3 Proteínas inmunodominantes específicas del cisticerco de *T. solium* identificadas por espectrometría de masas

Al observar la especificidad obtenida hasta el momento de las 7 manchas inmunodominantes e inmuno-específicas para la mezcla de sueros de cerdos cisticercosos, se decidió caracterizar dichas manchas mediante espectrometría de masas. Para esto se realizaron geles 2D-PAGE utilizando tiras IPG de pH 3-10 y 3-6, ya que, como se había observado antes con los geles e inmunoblots (Figs. 2 y 9) de pH 3-6 se obtiene una mejor resolución de las proteínas ácidas donde se encuentran las manchas de interés. Estos geles fueron teñidos con azul de Coomassie compatible para el análisis por espectrometría de masas y comparados con los inmunoblot correspondientes para cada gel (Figura 10). De

esta manera se identificaron un total de 13 manchas, las cuales fueron digeridas con tripsina para su posterior caracterización por espectrometría de masas (LC/ESI-MS/MS). Los resultados mostraron un total de 9 proteínas identificadas que mostraron similitud con proteínas reportadas en otros parásitos relacionados (Anexo 1).

Hasta el momento han sido reportados una variedad de antígenos de bajo peso molecular como útiles para el diagnóstico de la cisticercosis, sin embargo estos aún no han sido caracterizados (Atluri y cols, 2009; Ev y cols, 1999; Hancock y cols, 2006; Kaur y cols, 1995). Algunos de estos antígenos son las fracciones antigénicas de ≥ 20 -30 kDa y de 10-20 kDa, que han sido reportadas por presentar alta sensibilidad para detectar anticuerpos en suero de pacientes infectados con NC (76% y 53.6 % respectivamente), también se ha reportado que las fracciones de 10-20 kDa presentan menor reacción cruzada con suero de pacientes infectados con otras parasitosis (5.6%), que las de ≥ 20 -30 kDa (29.6%), indicando de esta manera que las fracciones de ≥ 20 -30 kDa pueden ser útiles para detección; mientras que las de 10-20 kDa pueden revelar la especificidad de los resultados (Atluri y cols, 2009).

Las manchas antigénicas de interés caracterizadas en este trabajo pueden corresponder con algunas de las fracciones antigénicas de 20-30 kDa de cisticerco total de *T. solium*, afirmando que estos antígenos de bajo peso molecular son inmunodominantes y algunos de ellos específicos por lo que podrían ser útiles para el diagnóstico de la cisticercosis.

Otro estudio, reportó que fracciones antigénicas de 18, 20, 24, 30 y 65 kDa son altamente inmunoreactivas con suero de pacientes con NC por ensayos de inmunoblot y que de todas estas las fracciones de 18, 20 y 24 kDa son inmunoespecíficas (Kaur y cols, 1995). Además Ev y colaboradores en 1999, identificaron antígenos de escólex de cisticerco de *T. solium*, los cuales fueron purificados por electroforesis en gel de poliacrilamida y electroelución y reconocidos en ensayos de inmunoblot, por anticuerpos presentes en suero de pacientes con NC. Los antígenos de escólex que se observaron como bandas de

13, 17 y 26 kDa resultaron ser específicos para el cisticerco de *T. solium*. Al evaluarlos mediante ensayos de ELISA, observaron una sensibilidad de 100%, 80% y 100% respectivamente y 80%, 100% y 100% de especificidad respectivamente, indicando que el antígeno de 26 kDa es más sensible y específico para la detección de anticuerpos en suero de pacientes con NC por ELISA (Ev y cols, 1999).

En este trabajo también se logró identificar una mancha antigénica de 26 kDa, que pudiera corresponder al reportado en el estudio mencionado anteriormente. Aunque en este trabajo no se utilizaron muestras de suero de pacientes con NC, el que se comparta dicha mancha con el identificado en el presente trabajo indicaría que sería útil para el diagnóstico en humanos y cerdos. Sin embargo, debido a que, en el reporte no se lleva a cabo una caracterización de los antígenos, no se podría asegurar que se esté hablando de la misma mancha.

Más recientemente Atluri y colaboradores en 2011, realizaron un nuevo análisis de las fracciones antigénicas de 10 a 30 kDa reportadas previamente. A diferencia del reporte anterior, en éste las fracciones antigénicas fueron separadas por 2D-PAGE, y ello les permitió observar un mayor número de proteínas antigénicas con p.I entre 3-10 y PM de 10 a 30 kDa. Todas las muestras de suero de pacientes seropositivos para NC fueron reactivas con los antígenos separados en 2D-PAGE mostrando una sensibilidad del 100%; sin embargo, en el grupo control de muestras de suero de pacientes con *T. hydatigena*, dos fueron reactivas con los antígenos de 10-30 KDa, observando así una especificidad del 92%. Los resultados mostraron que las fracciones antigénicas de 10-30 kDa separadas por 2D-PAGE, presentaron una sensibilidad significativamente más alta que la sensibilidad reportada anteriormente y la dada por el ensayo de inmunoelectrotransferencia (EITB) con glicoproteínas separadas por lectin-lectina (el cual es considerado por ser el método serodiagnóstico gold estándar hasta el momento) para pacientes con NC (Atluri y cols, 2011).

De los antígenos inmunodominantes identificados en el presente trabajo, algunos se encuentran entre un p.I entre 5.2 a 5.4 y PM de 28.6 aproximadamente, los

cuales pudieran corresponder a algunas de las fracciones de 10 a 30 kDa identificadas en el estudio anterior.

En el presente trabajo se identificaron 13 antígenos reconocidos por anticuerpos mediante espectrometría de masas; lo que permitió identificar 9 proteínas que pueden ser clasificadas según su función en proteínas de citoesqueleto, proteínas involucradas en procesos de señalización, metabolismo y estrés. Dentro de las que corresponden a las proteínas de citoesqueleto se encuentran la α -tubulina 1, β -tubulina 2 y tropomiosina 2 (Anexo 1).

La tubulina, es el mayor componente de los microtúbulos, y está involucrada en procesos claves como la mitosis, el mantenimiento de la forma de la célula, la movilidad celular y el transporte de organelos en células eucariontes, además es considerada en muchos casos como posible blanco para el tratamiento de infecciones helmínticas (Havens y cols, 2000).

Recientemente, Valverde y cols (2011), reportaron que cisticercos de *T. solium*, expresan de manera importante la tubulina en el tegumento sincicial y en los cilios de las células flama, donde su presencia puede estar asociada en el mantenimiento del tráfico vesicular, necesario para la absorción y secreción de macromoléculas. En relación a esta proteína, se conoce que existen diferentes isoformas, la β tubulina, que participa en el ensamblaje de los flagelos o cilios, necesarios para la motilidad celular, que tiene un motivo de secuencia única (D/NEEGEFDE), necesaria para el ensamblaje de estas estructuras. Por otra parte se han identificado otras β tubulinas, características de organismos que no presentan motilidad y por lo tanto no comparten en su secuencia la región arriba mencionada. (Dutcher., 2001). La β tubulina identificada en el presente trabajo tiene la secuencia (AEDEGEFDE), donde los 6 últimos aminoácidos se comparten con los del motivo de secuencia única mencionado anteriormente, lo que pudiera indicar que la β tubulina identificada en este trabajo pertenezca a la isoforma que esta relacionada con el ensamblaje de flagelos y cilios. En este caso pudiera relacionarse con los cilios de las células flama que conforman el cisticerco. Sin

embargo faltaría investigar si los aminoácidos que no se comparten tienen algún efecto sobre la función de la proteína.

Por otro lado, la tropomiosina, es una proteína asociada a microfilamentos presente en todas las células eucariontes, que se encuentra en múltiples isoformas y es esencial en los procesos de trabajo muscular y funcionalidad básica de los filamentos en el citoesqueleto. Se ha reportado que la tropomiosina de nematodos induce la formación de anticuerpos IgE en infecciones de humanos y animales experimentales (Sereda y cols, 2008). Estas proteínas, ya han sido descritas como candidatos a vacunas y moduladoras de la relación hospedero – parásito en tenidos, schistosomas y otros parásitos helmintos, señalándolas como moléculas preferencialmente vistas por el hospedero durante la infección (Santivañez y cols, 2010).

El cisticerco de *T. solium*, contiene formaciones de calcio conocidas como corpúsculos calcareos (CC), los cuales están formados por material inorgánico principalmente calcio, fosfato de magnesio y carbonato intercalados con una matriz orgánica. Estas estructuras están asociadas con proteínas de unión a calcio que se han reportado como inmunogénicas (Zurabian y cols, 2005). Estas proteínas son componentes importantes del citoesqueleto del cisticerco de *T. solium*, razón por la cual podrían estar jugando un papel importante en el desarrollo y funcionalidad del parásito y al mismo tiempo en la relación hospedero parásito.

Otra proteína que fue identificada en el presente trabajo, fue la proteína pequeña de choque térmico (small heat shock protein), la cual fue caracterizada en un estudio previo, donde se observó que sueros de pacientes infectados con NC reconocieron al menos dos productos de proteínas de choque térmico (66 kDa y 10 kDa) (Vargas y cols, 2001).

Estas proteínas juegan un papel esencial como chaperonas moleculares, ayudando al correcto plegamiento de las proteínas y a evitar su agregación, así mismo las que se localizan intracelularmente tienen función protectora, ya que, permiten a la célula sobrevivir en condiciones letales. Por otro lado las que se

localizan extracelularmente o están unidas a membrana, median funciones inmunológicas provocando una respuesta inmune modulada ya sea por el sistema inmune adaptativo o innato (Schmitt y cols, 2007). Por tal razón estas proteínas juegan un papel importante en la relación hospedero-parásito.

Por otro lado se identificaron proteínas de señalización dentro de las cuales se encuentra la anexina 1. Las anexinas son una familia multigénica de proteínas, caracterizadas por su capacidad de unión reversible a fosfolípidos aniónicos de una manera dependiente de calcio y se ha sugerido que las anexinas pueden estar asociadas con varios fenómenos relacionados con la membrana, dentro de los que se incluyen: la organización de la membrana, tráfico de membrana, fusión y formación de canales iónicos (Gao y cols, 2007). Hasta el momento se ha caracterizado a la anexina B1 en fluido vesicular del cisticerco de *T. solium* y además se observó su localización en células del hospedero que se encontraban adyacentes al parásito, cuando la reacción inflamatoria en el hospedero era activa. Esto indica que la anexina B1 podría tener un papel relacionado con el efecto anti-inflamatorio (Gao y cols, 2007). Adicionalmente en otros organismos también se han descrito a las anexinas como anti-inflamatorias, anti-coagulantes y profibrinolíticas, razón por la cual pudieran ser muy importantes para la sobrevivencia del parásito en su hospedero (Pérez y cols, 2006).

Otra proteína de señalización que también se logró identificar en este trabajo, fue la proteína 14-3-3, que pertenece a una familia de proteínas que han sido identificadas como moléculas regulatorias en vías de señalización intracelular y control del ciclo celular. Estas proteínas han sido encontradas en parásitos como *Schistosoma mansoni*, en el cual tres isoformas han sido descritas y en *Echinococcus granulosus* y *multilocularis*, también con varias isoformas (Nunes y cols, 2004). Hasta el momento, en *T. solium* solo se ha reportado la presencia de dicha proteína en la fase oncosferral, donde se expresó en la superficie y se observó en el gel como una banda específica de peso molecular aproximadamente de 25 KDa (Santivañez y cols, 2010). Según este peso molecular la proteína 14-3-3 identificada en este trabajo pudiera corresponder a la misma isoforma encontrada en las oncosferas de *T. solium*. Sin embargo se ha

reportado que la misma isoforma de la proteína 14-3-3 en diferentes organismos presenta una alta conservación que diferentes isoformas de la proteína en el mismo organismo (Wang y cols, 1996).

En los estudios con *E. multilocularis*, la sobre-expresión de la proteína 14-3-3 fue relacionada con el crecimiento no restringido del estado larval del parásito y más adelante una segunda isoforma fue relacionada funcionalmente con procesos metabólicos en gusanos adultos de *Echinococcus* (Nunes y cols, 2004). Hasta el momento no se conoce la funcionalidad que ejerce esta proteína en el cisticerco de *T. solium*, ni la presencia de isoformas.

También en este trabajo se logró identificar a la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico, que también está involucrada en procesos de señalización participando en los procesos de modulación de la fosforilación de proteínas. Debido a que, en las diferentes etapas de desarrollo del parásito, este requiere de un estricto control de la maquinaria celular, así como de la modulación coordinada de grupos de genes distintos, la fosforilación resulta ser uno de los principales procesos bioquímicos que utilizan las células eucariotas para transmitir señales (Wurtz y cols, 2011).

Por otro lado se identificó a la proteína piruvato deshidrogenasa, la cual corresponde a un complejo enzimático que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA. Es una enzima fundamental para el metabolismo de los carbohidratos, teniendo así un papel importante en la producción de energía y la síntesis de metabolitos (Fleige y cols, 2007). De esta manera esta proteína pudiera estar contribuyendo a la regulación del metabolismo energético del cisticerco.

Recientemente se reportaron algunas proteínas inmunogénicas solubles del cisticerco de *T. solium*, dentro de las que se encuentran la proteína 14-3-3 y la proteína pequeña de choque térmico. Estas proteínas fueron identificadas por electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE) e inmunoblot utilizando muestras de suero de pacientes positivos para NC y junto con otras proteínas (actina, paramiosina, fosfoenolpiruvato carboxicinasa y una proteína nueva denominada

Tsol-p27) son propuestas como proteínas antigénicas con posible potencial diagnóstico (Salazar y Lindh, 2011).

9.4 Análisis de las proteínas inmunodominantes identificadas por espectrometría de masas con el genoma de *T. solium*.

A diferencia de los trabajos reportados hasta el momento para identificación de antígenos inmunogénicos con potencial diagnóstico, en el presente trabajo se analizaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas identificadas por espectrometría de masas con la base de datos del genoma de *T. solium*. Las 9 proteínas fueron identificadas en el genoma, lo que permitió obtener la secuencia específica de dicha proteína para *T. solium* (Tabla 1). Posteriormente se realizaron alineamientos de las 9 proteínas identificadas con secuencias de proteínas reportadas para otros parásitos relacionados, lo que permitió observar que 7 de ellas presentan aminoácidos que son específicos para *T. solium* y que no se comparten con los de otros parásitos relacionados (Apéndice 2), indicando que estos pueden ser posibles blancos para la realización de un método diagnóstico.

El diseño de intervenciones estratégicas para el control de la transmisión de la teniasis-cisticercosis, requiere determinar la magnitud de su transmisión en las áreas a intervenir. La cisticercosis porcina se ha propuesto como un sensor sensible para este propósito. Su diagnóstico implica un contacto reciente con el parásito considerando que más del 80% de la población de cerdos se renuevan cada año (González y cols, 1990; 1994).

La información generada en este trabajo de tesis resulta relevante para desarrollar un ensayo diagnóstico específico y sensible que nos permita conocer la magnitud de la prevalencia de cisticercosis en la implementación y evaluación del impacto de intervenciones para el control de esta parasitosis.

El diseño de un ensayo para diagnóstico de la cisticercosis porcina se apoya en la disponibilidad de sueros de cerdos con diagnóstico establecido con base en un

estudio de necropsia que nos permite disponer de muestras biológicas con un 100% de certeza diagnóstica. Los antígenos identificados en este estudio podrían también ser de relevancia para el diseño de un ensayo para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis humana.

10. CONCLUSIONES

El patrón de proteínas del cisticerco de *T. solium*, presenta en promedio un total de 203 spots, cuyos pesos moleculares (PM) abarcan desde 12.6 a más de 180 kDa y sus puntos isoeléctricos (p.I) desde un pH de 4 a 8.

- Los antígenos inmunodominantes identificados en el presente trabajo se separan mejor en un intervalo de PH de 3-6. Se caracterizan por ser ácidos y de bajo peso molecular, ya que, presentan p.I entre 4.7-5.4 y PM entre 47-21.6 kDa.
- Los diferentes paneles de suero utilizados en el presente trabajo permitieron la identificación de un total de 9 antígenos inmunodominantes, expresados por el cisticerco de *T. solium*, que no presentan reacciones cruzadas con otras parasitosis (*Ascaris* y *Tenuicollis*), ni con los controles falsos positivos y negativos.
- Los antígenos inmunodominantes identificados por espectrometría de masas, correspondieron a proteínas de citoesqueleto, proteínas involucradas en procesos de señalización, estrés y metabolismo.
- Los antígenos inmunodominantes específicos para el cisticerco de *T. solium* fueron identificados en la base de datos del genoma de *T. solium*
- Según la comparación de secuencias, los antígenos tropomiosina, la proteína 14-3-3, quinasa dependiente de AMPc, piruvato deshidrogenasa, proteína pequeña de choque térmico y α – tubulina, presentan aminoácidos específicos de *T. solium* que no se comparten con los de otros parásitos relacionados.

- El uso de la proteómica, en este trabajo permitió llevar a cabo la identificación y caracterización de proteínas antigénicas que pueden ser posibles blancos para el desarrollo de un método diagnóstico.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el potencial diagnóstico de las proteínas que presentaron aminoácidos específicos de *T. solium*.
- Realizar Inmunoblots, con muestras de suero de cerdos infectados con otras parasitosis que no hayan sido probadas.
- Realizar Inmunoblots con muestras de suero y de líquido cefalorraquídeo de pacientes con Neurocisticercosis.
- Expresar los antígenos de interés por DNA recombinante para evaluar su potencial en el inmunodiagnóstico de cisticercosis humana y porcina.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Arruda GC, da Silva AD, Quagliato EM, Maretti MA, Rossi CL. (2005) Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. Trop. Med. Int. Health 10(10): 1005-1012.
- Assana E, Kanobana K, Tume CB, Zoli PA, Nguekam, Geerts S, Berkvens D, Dorny P. (2007) Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis. Res Vet Sci. 82(3):370-6.
- Atluri SR, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. (2009) Evaluation of excretory secretory and 10-30 kDa antigens of *Taenia solium* Cysticerci by EITB assay for the diagnosis of neurocysticercosis. Parasite Immunol. 31(3):151-5.
- Atluri VS, Singhi PD, Khandelwal N, Malla N. (2011) 2D-PAGE analysis of *Taenia solium* metacestode 10-30 kDa antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. Acta Trop. 118(2):165-9.
- Blackstock W, Man M., eds (2001). A trends guide for proteomics. A supplement to trends in biotechnology Vol 19 (10) 71pp.
- Bobes RJ, Hernández M, Márquez C, Fragoso G, García E, Parkhouse RM, Harrison LJ, Sciutto E, Fleury A. (2006) Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. Trop Med Int Health.11(6):943-50.
- Castillo Y, Rodriguez S, García HH, Brandt J, Van Hul A, Silva M, Rodriguez-Hidalgo R, Portocarrero M, Melendez DP, Gonzalez AE, Gilman RH, Dorny P. (2009) Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis. Am J Trop Med Hyg.80(3):379-83.

- Chemale G, van Rossum AJ, Jefferies JR, Barrett J, Brophy PM, Ferreira HB, Zaha A. (2003) Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics*. 3(8):1633-6.
- Chung JY, Bahk YY, Huh S, Kang SY, Kong Y, Cho SY. (1999) A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *J Infect Dis*.180(4):1307-15.
- Correa D, Sandoval MA, Harrison LJ, Parkhouse RM, Plancarte A, Meza-Lucas A, Flisser A. (1989) Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 83(6):814-6.
- Das S, Mahajan RC, Ganguly NK, Sawhney IM, Dhawan V, Malla N. (2002) Detection of antigen B of *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Trop Med Int Health*. 7(1):53-8.
- Deckers N, Dorny P. (2010) Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Trends Parasitol*. 26(3):137-44.
- Diaz Camacho S, Candil Ruiz A, Uribe Beltrán M, Willms K. (1990) Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 84(4):563-6.
- Diaz JF, Verastegui M, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Gallo C, Garcia HH, Torres P, Montenegro T, Miranda E. (1992) Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 46(5):610-5.
- Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. (2003) Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop*.87(1):79-86.

- Dutcher SK. (2001) Motile organelles: the importance of specific tubulin isoforms. *Curr Biol.* 11(11):419-22.
- Erhart A, Dorny P, Van De N, Vien HV, Thach DC, Toan ND, Cong le D, Geerts S, Speybroeck N, Berkvens D, Brandt J. (2002) *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Viet Nam: seroprevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96(3):270-2.
- Ev LV, Maia AA, Pianetti G, Nascimento E. (1999) Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitol Res.* 85(2):98-102.
- Fang W, Bao HE, Xiao LL, Mu R. (2009) Screening, identification and bioinformatic analysis of *Taenia solium* cysticercus. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 27(4):313-7.
- Ferrer E, González LM, Foster-Cuevas M, Cortéz MM, Dávila I, Rodríguez M, Sciutto E, Harrison LJ, Parkhouse RM, Gárate T. *Taenia solium*: characterization of a small heat shock protein (Tsol-sHSP35.6) and its possible relevance to the diagnosis and pathogenesis of neurocysticercosis. *Exp Parasitol.* 110(1):1-11.
- Fleige T, Fischer K, Ferguson DJ, Gross U, Bohne W. (2007) Carbohydrate metabolism in the *Toxoplasma gondii* apicoplast: localization of three glycolytic isoenzymes, the single pyruvate dehydrogenase complex, and a plastid phosphate translocator. *Eukaryot Cell.* 6(6):984-96.
- Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Carrillo Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. (2003) High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology.* 22(2):139-45.
- Fleury A, Hernández M, Avila M, Cárdenas G, Bobes RJ, Huerta M, Fragoso G, Uribe-Campero L, Harrison LJ, Parkhouse RM, Sciutto E. (2007)

Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78(9):970-4.

- Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, Larralde C, Sciutto E. (2010) Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(8):e805.
- Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martinez-Ocaña J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowers MW. (2004) Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun*. 72(9):5292-7.
- Flisser A, Rodríguez-Canul R, Willingham AL. (2006) Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Vet Parasitol*. 139(4):283-92.
- Flisser A, Correa D. (2010) Neurocysticercosis may no longer be a public health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(12):e831.
- Gao YJ, Yan HL, Ding FX, Lu YM, Sun SH. (2007) Annexin B1 at the host-parasite interface of the *Taenia solium* cysticercus: Secreted and associated with inflammatory reaction. *Acta Trop*. 101(3):192-9.
- Garcia HH. et al. (1998) A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 92(4):411-4.
- Garcia HH, Harrison LJ, Parkhouse RM, Montenegro T, Martinez SM, Tsang VC, Gilman RH. (2001) Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions-a major contributor to high seroprevalence. *Am J Trop Med Hyg*. 65(1):31-2.

- Garcia HH, Del Brutto OH, Nash TE, White AC Jr, Tsang VC, Gilman RH. (2005) New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). Am J Trop Med Hyg. 72(1):3-9.
- Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verastegui M, Miranda E, Bazalar H. (1990) Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. Am J Trop Med Hyg. 43(2):194-9.
- Gonzalez AE, Gilman R, Garcia HH, McDonald J, Kacena K, Tsang VC, Pilcher JB, Suarez F, Gavidia C, Miranda E. (1994) Use of sentinel pigs to monitor environmental *Taenia solium* contamination. Am J Trop Med Hyg. 51(6):847-50.
- Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VC. (2006) Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. Mol Biochem Parasitol. 147(1):109-17.
- Handali S, Pattabhi S, Lee YM, Silva-Ibanez M, Kovalenko VA, Levin AE, Gonzalez AE, Roberts JM, Garcia HH, Gilman RH, Hancock K, Tsang VC. (2010) Development and evaluation of porcine cysticercosis QuickELISA in Triturus EIA analyzer. J Immunoassay Immunochem. 31(1):60-70.
- Havens CG, Bryant N, Asher L, Lamoreaux L, Perfetto S, Brendle JJ, Werbovetz KA. (2000) Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. Mol Biochem Parasitol. 110(2):223-36.
- Ito A, Plancarte A, Ma L, Kong Y, Flisser A, Cho SY, Liu YH, Kamhawi S, Lightowers MW, Schantz PM. (1998) Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. Am J Trop Med Hyg. 59(2):291-4.

- Jimenez-Marcial ME, Velasquez-Perez L. (2004) Morbidity at the Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia Manuel Velasco Suarez, 1995-2001. *Gaceta médica de México* 140: 155–162.
- Kaur M, Ganguly NK, Mahajan RC, Malla N. (1995) Identification of antigenic fractions of *Cysticercus cellulosae* by Western blotting in the serodiagnosis of human neurocysticercosis: before and after treatment. *Immunol Infections Dis.* 5; 67-72.
- Kinter,M., Sherman, N. E., in: Desiderio, D.M., Nibbering, N.M. (Eds.), *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, John Wiley-Interscience, Inc., New York 2000, pp. 147–165.
- Krecek RC, Michael LM, Schantz PM, Ntanjana L, Smith MF, Dorny P, Harrison LJ, Grimm F, Praet N, Willingham AL. (2008) Prevalence of *Taenia solium* cysticercosis in swine from a community-based study in 21 villages of the Eastern Cape Province, South Africa. *Vet Parasitol.*154(1-2):38-47.
- Larralde C. y Aluja S.A..de. *Cisticercosis porcina en México. Cisticercosis guía para los profesionales de la salud.* Fondo de Cultura Económica. 2006. 252pp.
- Malla N, Kaur R, Ganguly NK, Sawhney IM, Mahajan RC. (2005) Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis. *Nepal Med. Coll. J.* 7, 1-9.
- Michelet L, Fleury A, Sciutto E, Kendjo E, Fragoso G, Paris L, Bouteille B. (2011) Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 49(1):195-200.
- Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltrán C, Villalobos N, Aluja A, Rodarte LF, Sciutto E, Larralde C. (2002) Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol.* 108(1):41-8.

- Morales J, Martínez JJ, Rosetti M, Fleury A, Maza V, Hernandez M, Villalobos N, Fragoso G, de Aluja AS, Larralde C, Sciutto E. (2008) Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2(9):e284.
- Morales J, de Aluja AS, Martínez JJ, Hernández M, Rosas G, Villalobos N, Hernández B, Blancas A, Manoutcharian K, Gevorkian G, Cervantes J, Díaz A, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E. (2011) Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: Simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. Vet Parasitol. 176(1):53-8.
- Nunes CP, Zaha A, Gottstein B, Müller N, Siles-Lucas Mdel M. (2004) 14-3-3 gene characterization and description of a second 14-3-3 isoform in both *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. Parasitol Res. 93(5):403-9.
- Parkhouse RM, Harrison LJ. (1987) Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia sp.* Metacestodes. Parasite Immunol. 9(2):263-8.
- Parkhouse RM, Bonay P, González LM, Ferrer E, Gárate T, Aguilar CM, Cortez A MM, Harrison LJ. (2008) TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. Parasitol Res. 102(5):921-6.
- Pérez-Sánchez R, Ramajo-Hernández A, Ramajo-Martín V, Oleaga A. (2006) Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. Proteomics. 6 Suppl 1:S226-36.
- Prabhakaran V, Rajshekhar V, Murrell KD, Oommen A. (2007) Conformation-sensitive immunoassays improve the serodiagnosis of solitary cysticercus granuloma in Indian patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 101(6):570-7.

- Rodríguez V, Ortega P, Machain W, Santos R. (2001) Gastrointestinal parasites in swine kept in two production systems (indoor and outdoor) in the Mexican tropics. *Livestock Research for Rural Development* (13) 5:1-9.
- Salazar-Anton F, Lindh J. (2011) *Taenia solium*: A two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol.* 128(4):371-6.
- Pérez-Sánchez R, Ramajo-Hernández A, Ramajo-Martín V, Oleaga A. (2006) Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics.* 6: 226-236.
- Santivañez SJ, Hernández-González A, Chile N, Oleaga A, Arana Y, Palma S, Verastegui M, Gonzalez AE, Gilman R, Garcia HH, Siles-Lucas M. (2010) Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Mol Biochem Parasitol.* 171(1):32-9.
- Sarti Gutierrez E, Schantz PM, Aguilera J, Lopez A. (1992) Epidemiologic observations on porcine cysticercosis in a rural community of Michoacan State, Mexico. *Vet Parasitol.* 41(3-4):195-201.
- Sarti E, Rajshekhar V. (2003) Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Trop.* 87(1):137-43.
- Schantz PM, Sarti-Gutierrez E. (1989) Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden.* 57(2):153-63.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 81(1):15-27.
- Sciutto E, Martínez JJ, Huerta M, Avila R, Fragoso G, Villalobos N, de Aluja A, Larralde C. (2003) Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in

the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet Parasitol.* 116(3):223-9.

- Sciutto E, Rosas G, Hernández M, Morales J, Cruz-Revilla C, Toledo A, Manoutcharian K, Gevorkian G, Blancas A, Acero G, Hernández B, Cervantes J, Bobes RJ, Goldbaum FA, Huerta M, Diaz-Orea A, Fleury A, de Aluja AS, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L, Fragoso G, Larralde C. (2007) Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine.* 25(8):1368-78.
- Sereda MJ, Hartmann S, Lucius R. (2008) Helminths and allergy: the example of tropomyosin. *Trends Parasitol.* 24(6):272-8.
- Singh G, Kaushal V, Ram S, Kaushal RK, Dhanuka AK, Khurana S. (1999) Cysticercus immunoblot assay in patients with single, small enhancing lesions and multilesional neurocysticercosis. *J Assoc Physicians India.* 47(5):476-9.
- Sorvillo F, Wilkins P, Shafir S, Eberhard M. (2011) Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. *Emerg Infect Dis.* 17(1):1-6.
- Sotelo J, Del Brutto OH. (2000) Brain cysticercosis. *Arch Med Res.* 31(1):3-14.
- Tsang V.C, Brand J.A, Boyer A.E. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 159: 50-59.
- Valdés Y, Hernández A. (2001) Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 17(2): 98-107.

- Van Regenmortel Marc H.V. What is a B-cell epitope. *Methods Mol Biol.* 2009;524:10-13.
- Vargas-Parada L, Solís CF, Laclette JP. (2001) Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology.* 122(Pt 5):583-8.
- Wang W, Shakes DC. (1996) Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol.* 43(4):384-98.
- White Jr AC, Atmar RL., 2002. Infections in Hispanic immigrants. *Clin Infect Dis.* 34(12):1627-32.
- Wurtz N, Chapus C, Desplans J, Parzy D. (2001) cAMP-dependent protein kinase from *Plasmodium falciparum*: an update. *Parasitology.* 138(1):1-25.
- Zurabian R, Carrero JC, Rodríguez-Contreras D, Willms K, Laclette JP. (2005) Antigenic proteins associated with calcareous corpuscles of *Taenia solium*: partial characterization of a calcium-binding protein. *Arch Med Res.* 36(1):4-9.

13. APENDICES

13.1 Proteínas inmunodominantes del cisticerco de *T. solium* identificadas por LC/ESI-MS/MS

Spot no.	Protein	Species	Accession no (NCBI)	MW (kDa) exp/theo	p.I exp/theo	No of matched peptides	Sequence coverage %	MASCOT score
Ts1_1	alpha-1 tubulin	<i>Hirudo medicinalis</i>	gi 1527170	47.2/50.7	5.1/4.94	19	41	749
	alpha-6 tubulin	<i>Taenia saginata</i>	gi 124783598	47.1/28.7	4.9/6.09	9	44	337
Ts1_2	Beta-tubulin 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 29337144	46.3/50.2	4.7/4.75	37	62	1064
Ts1_3	small heat-shock protein	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.22/5.56	18	55	535
Ts1_4	small heat-shock protein	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.21/5.56	17	50	492
Ts1_5	small heat-shock protein	<i>Taenia solium</i>	gi 21665905	32.2/35.6	5.41/5.56	24	57	539
Ts1_6	antigen cC1	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	28.6/38.1	5.44/5.71	21	58	1101
Ts1_7	antigen cC2	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	28.6/38.1	5.34/5.71	21	73	957
Ts1_8	similar to alpha-tubulin	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	gi 115736220	28.6/42.5	5.2/5.06	5	17	200
	pyruvate dehydrogenase E1	<i>Pediculus humanus corporis</i>	gi 242004249	28.6/34.7	5.2/5.62	3	5	166
Ts2_9	antigen cC1	<i>Taenia solium</i>	gi 4960053	26.7/38.1	5.4/5.71	4	14	168
Ts1_10	camp-dependent protein kinase	<i>Schistosoma mansoni</i>	gi 256052513	28.6/43	5.0/5.12	3	8	70
Ts1_11	tropomyosin 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 220897456	28.6/28.3	4.93/4.93	5	18	103
Ts1_12	putative 14-3-3 protein	<i>Echinococcus granulosus</i>	gi 62178030	23.3/28.2	4.8/4.91	22	51	448
Ts1_13	Full=14-3-3 protein homolog 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	gi 29336772	21.6/27.9	4.75/4.8	37	79	1093


```

FASH QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL LISKIREEYP DRIMNTFSVV PSPKVS DTVV EPYNATLSVH QLVENTDETY CIDNEALYDI CFRTLKLTNP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL RKLAVNMVFP
SCHJ QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL LISKIREEYP DRIMNTFSVV PSPKVS DTVV EPYNATLSVH QLVENTDETY CIDNEALYDI CFRTLKLTNP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL RKLAVNMVFP

261
TSOLG PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALSVPPELT QQMFDKNNMM AACDPRHGRY LTVAAI FRGR MSMKEVDEQM LNVQNKSSY FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG LKMSATFVGN STAIQELFRR VSEQFTAMFR
ECHM PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALSVPPELT QQMFDKNNMM AACDPRHGRY LTVAAI FRGR MSMKEVDEQM LNVQNKSSY FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG LKMSATFVGN STAIQELFRR VSEQFTAMFR
FASH PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALTVPELT QQMFDKNNMM AACDPRHGRY LTVAAMFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKSSY FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG LKMSATFVGN STAIQELFRR VSEQFTAMFR
SCHJ PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRSLTVPELT QQMFDKNNMM AACDPRHGRY LTVAAI FRGR MSMKEVDEQM LNVQNKSSY FVEWIPNNVK TAVCDIPPRG LKMSVTFIGN STAIQELFRR VSEQFTAMFR

391
TSOLG RKAFHLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA EDEGEFDEEE EVEEA 445
ECHM RKAFHLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA EDEGEFDEDE EVEEA
FASH RKAFHLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA EEEGEFDEEA EEA
SCHJ RKAFHLHWYTG EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA DDEGEFEEDA EDV

```

Proteína similar ala alpha-tubulina

```

1
TSOLG MRECISVHVG QAGVQMGNA WELYCLEHGI QPDGQMP S DK SIGGGDDSFN TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVVDEVRT EVR G TYRQLFHPE QLITGKEDAA NNYARGHYTI GKEIVDLVLD RIRKLADQCT 130
FASC MRECISVHVG QAGVQMGNA WELYCLEHGI QPDGQMP S DK SIGGGDDSFN TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVVDEVRT G TYRQLFHPE QLITGKEDAA NNYARGHYTI GKEIVDLVLD RIRKLADQCT
SCHJ MRECISIHVG QAGVQIGNAC WELYCLEHGI QPDGQMP S DK TIGGGDDSFN TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVVDEVRT G TYRQLFHPE QLITGKEDAA NNYARGHYTI GKEIVDLVLD RIRKLADQCT
SCHM MGNAC WELYCLEHGI QPDGQMP S DK TIGGGDDSFN TFFSETGAGK HVPRAVFVDL EPTVVDEVRT G TYRQLFHPE QLITGKEDAA NNYARGHYTI GKEIVDLVLD RIRKLADQCT

131
TSOLG GLQGFLIFHS FGGGTGSGFT SLLMERLSVD YGKKSLEF V YPAPQIATA VVEPYN SILT THTTLEHSDC AFMVDNEAIY DICRRNL DIE RPTYTNLNR L IGQIVSSITA SLRFDGALNV DLTEFQTNLV
FASC GLQGFLIFHS FGGGTGSGFT SLLMERLSVD YGKKSLEFA VYPAPQIATA VVEPYN SILT THTTLEHSDC AFMVDNEAIY DICRRNL DIE RPTYTNLNR L IGQIVSSITA SLRFDGALNV DLTEFQTNLV
SCHJ GLQGFLIFHS FGGGTGSGFT SLLMERLSVD YGKKSLEFA IYPAPQIATA VVEPYN SILT THTTLEHSDC AFMVDNEAIY DICRRNL DIE RPTYTNLNR L IGQIVSSITA SLRFDGALNV DLTEFQTNLV
SCHM GLQGFLIFHS FGGGTGSGFT SLLMERLSVD YGKKSLEFA VYPAPQIATA VVEPYN SILT THTTLEHSDC AFMVDNEAIY DICRRNL DIE RPTYTNLNR L IGQIVSSITA SLRFDGALNV DLTEFQTNLV

261
TSOLG PYPRIHFPLA TYAPVISAEK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN QMVKCDPRHG KYMACCMLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRT IQFVDWCPTG FKVGINYQPP TVVPGDLAK VQRAVCMLSN TTATAEAWAR 390
FASC PYPRIHFPLA TYSPVISAEK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN QMVKCDPRHG KYMACCMLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRT IQFVDWCPTG FKVGINYQPP TVVPGDLAK VQRAVCMLSN TTATAEAWAR
SCHJ PYPRIHFPLA TYAPVISAEK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN QMVKCDPRHG KYMACCMLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRT IQFVDWCPTG FKVGINYQPP TVVPGDLAK VQRAVCMLSN TTATAEAWAR
SCHM PYPRIHFPLA TYAPVISAEK AYHEQLSVAE ITNACFEPAN QMVKCDPRHG KYMACCMLYR GDVVPKDVNA AIATIKTKRT IQFVDWCPTG FKVGINYQPP TVVPGDLAK VQRAVCMLSN TTATAEAWAR

391
TSOLG LDHKFDLMY KRA FVHWYVG EGMEEGEFSE AREDLAALEK DYEEVGIDSV EAEGE E-GE EY 452
FASC LDHKFDLMYA KRA FVHWYVG EGMEEGEFSE AREDLAALEK DYEEVGIDSV EGEGE E-GE EY
SCHJ LDHKFDLMYA KRA FVHWYVG EGMEEGEFSE AREDLAALEK DYEEVGIDSV DAEGENE EGE EY
SCHM LDHKFDLMYA KRA FVHWYVG EGMEEGEFSE AREDLAALEK DYEEVGIDSV DGEGE E-GE EY

```

Piruvato deshidrogenasa componente E1

```

1
TSOLG                               130
SCHJ MSFSQRLFSF TKNFR-PQLC SRSIKTTSSV YTAKMTVRDA LNSAMREELE RDKDVFIILGE EVAQYDGAYK VTKNLWRTFG DDRVIDTPI S EMGFTGIAVG AAMAGLRPVC EFMTFNFMAMQ AIDQIINSAA
SCHM MSVSQRLFLF AKSFR-PQLC SRSCLKTSSA FGTKMTVRDA LNSAMREELE RDKDVIILGE EVAQYDGAYK VTKGLWKMFQ DTRVIDTPI S EMGFAGVAUG AAMAGLKPIC EFMTFNFMAMQ AIDQIINSAA
ASCS MALSKTNALF RLLIQANST QHFRRCCLVTA SSPTLTVREA LNQAIDEELR RDEKVFLLGE EVAQYDGAYK VSKGLWKKYG EDRIVDTPIT EMGFAGIAVG AAMAGLRPIC EFMTFNFMAMQ AIDHIINSAA

131
TSOLG KTFYMSAGLV NVPIFRGPN GAAAGVAAQH SQDYLAAYAS CPGLKVAPY SEDARGLLK ARIRDDDPVV SLENELMYGV AMDSDEAMH DFLIPGKA KIAREGQDVT LVSYSLSVGL CLEAAQLAK
SCHJ KSAYMSAGLV SVPIVFRGPN GCSAGVAAQH SQDYGAWFAS CPGLKVMAPY SCEDARGLLK SAVRDPDPVV YLESELLYGQ SFDVSDEALS SDFLIPVQQA KIAREGKDV LVSYSLSVGT CLAAAEELSK
ASCS KTFYMSAGQL NVPVFRGPN GAASGVAAQH SQDYSAWYAH CPALKVLSPY SSEDAGLLK AAIRDDNPVI VLENELLYGQ SFPVTPEVLS ENFVIPIGKA KIERQGGHAT VVSYSKGVQL ALEAATELAA

261
TSOLG LGITAEVINL RSLRPMDEET IFQSVKKTTH LVTVDRAWP CGIGAEICAR IME-----ITGA DVPMPYAGQL EACTSHAPN IITTVKIVLN
SCHJ LGISAEVINL RSLRPMDEET IFKSVKKTTH LVTVENGWPV CGIGAEICAR VMETDTFHYL DAPVLRVTGA DVPMPYALNL ERASYPDTHN IVTTVKMVRN IQ
SCHM LGITAEVINL RSLRPMDEET IFQSVKKTTH LVTVENGWPV CGIGAEICAR VMETDTFNYL DAPVLRVTGA DIPMPYALNL ERASYPDTHN IVTTVKMVRN IQ
ASCS QKIEIEVINL RTRLPDMQT VKDSLKKTTH LITVEMGWPI CGIGAEISAQ IVESEAFDYL DAPILRVTVG DVPMPYSQKL ETAALPTSAD VIRQVKRSLN ME
362

```

Cinasa dependiente de AMP cíclico

```

1
TSOLG KRAVE VPGGLRELLQ DRTVIVLRNR PSNINFAAE YPEMKK---- --NQQENE DESEDEVMA PPRAARRRIG VAAESYDPEK ED--KEKVV HKTEEQRR LTNATKILL FRCLDEDQMK
SCHJ MTMKNEIV VPPGLRELLQ ELTVSILRER PDNLIQFAID FLMMKKAASE NRPNKANESD EDEDEEPMPI PPQRVSRRAG VAAESYDPEK DDSSSAVKVV HPKTEEQRR LTQATKDILL FRCLDDQMK
SCHM MTMTMKDEVV VPPGLRELLQ ELTVSILRER PDNLIQFAID FLMMKKAASE NRPNKANESD EDEDEEPMPI PPQRATRRAG VAAESYDPEK DDTSNVEKVV HPKTEEQRR LAQATKDILL FRCLDDQMK

131
TSOLG DVIDAMFERH VVGEKVITL GEDGDNFYVI EKGVDIIVK VGVGEKIVGQ YDNKGSFGEL ALMYNTPRAA TILAKTEGVL WAMTREVFRS IVLKAFAEKR RMYEELLNQV PILQSL SAYE RMSIADALRT
SCHJ DVIDAMFERH VSPGKVIITL GEDGDNFYVI EKGVDIIVK VGDDEKVVGK YDNKGSFGEL ALMYNTPRAA TILAKTEGVL WAMTREVFRS IVLKAFAEKR RLYEELLNQV PILESLSAYE RMSIADALRT
SCHM DVIDAMYERH VSPGKVIITL GEDGDNFYVI ESGIYDIIVK VGNEEKTVGK YDNKGSFGEL ALMYNTPRAA TILAKTEGVV WMTREVFRS IVLKAFAEKR RLYEELLNQV PILESLSAYE RMSIADALRT

261
TSOLG QIYEGTKII RQGGDEMY FVEDGVRIR MKRSGSTEEK ELTRIKGGY FGELALLTSH PRAASAYADC RTKLAVLDVG SFERLLGPCL DILRRNIDNY ENGLKIVFGS LDKVPELRR
SCHJ KIFEANEQII RQGGDPDEM FVEEGKVSIR MKRSGSTEEK EVAVIEKGGY FGELALLTSH PRAASAYADC RTKLAVLDVG SFERLLGPCL DILRRNIDY EAKLKDIFGS LDKVPELRR
SCHM KIFKDNQII RQGGDPDEM FVEEGKVRIR MKRSGSTEEK EVAVIEKGGY FGELALLTSH PRAASAYADG QTKLAVLDVG SFERLLGPCL DILRRNIDY EARLKNIFGS LDKVPELRR
379

```

Tropomiosina 2

```

1
TSOLG M[REDACTED]G[REDACTED]S[REDACTED]A[REDACTED]E[REDACTED]SL[REDACTED]L[REDACTED] E[REDACTED]IKKKILAS K[REDACTED]V[REDACTED]V[REDACTED]K[REDACTED]T[REDACTED]L[REDACTED]E[REDACTED] LESKQALLK[REDACTED] E[REDACTED]EKREKAEAEVAALQRRIR LLEDDLESTD TRLTDATAKL EEASKAADES ERFRRALQSR QVTDDTRIEE LQQRIQKTAK EAAEAERKYQ
ECHM MSGSSADSL EAVKKKILAS KVN[REDACTED]V[REDACTED]K[REDACTED]T[REDACTED]L[REDACTED]T[REDACTED]LE[REDACTED] LESKHDL[REDACTED]L[REDACTED]K[REDACTED]T[REDACTED] EHEKREKAEAEVAALQRRIR LLEDDLESTD TRLTDATAKL EEASKAADES ERFRRALQSR QVTDDTRIEE LQQRIQKTAK EAAEAERKYQ
SCHJ M[REDACTED]SSPVI GAVKSKMQGM KLQIDQLKQE VSSKQAVLRK EEENKTKAEAEV[REDACTED]ASLQKRIR QLEDELESTE TRLQ[REDACTED]EATLKL EEASKAADES DRARRVLEAR QTAEDERILQ LESMVQETAK SVKDAETKYE
SCHM M[REDACTED]SSPVI GAVKSKMQGM KLQIDQLKQE LSSKQAILRK EEENKIKAEAEV[REDACTED]ASLQKRIR QLEDELESTE TRLQ[REDACTED]EATVKL EEASKAADES DRARRVLEAR QTAEDERILH LESV[REDACTED]VQETAK SVRDAETKYE

131
TSOLG EATQELATAE [REDACTED]ALAAA[REDACTED]EKRV ED[REDACTED]AE[REDACTED]RIHSM EHELRAITTN LKTMELSEST ASKQKQTYQA TLEKLTKQLA E[REDACTED]E[REDACTED]RTALAE SE[REDACTED]L[REDACTED]LKRQEEL ARLE[REDACTED]E[REDACTED]ELDAE KT[REDACTED]N[REDACTED]NASLRED ME[REDACTED]IAAELQN I
ECHM EATQELATAE DALAAA[REDACTED]EKRV ED[REDACTED]AE[REDACTED]ERI[REDACTED]HSM EHELRAITTN LKTMELSEST ASKQKQTYQA TLEKLTKQLA EAENRTALAE SE[REDACTED]AL[REDACTED]KRQEEL ARLE[REDACTED]AE[REDACTED]LDAE KTLNASLRED MEDIAAELQS I
SCHJ EATRKLAVAE VALSHAEDRI EAAESRLKEL QSIIHGTMGQ LKSLEHQESQ LSKQ[REDACTED]RSLHQ[REDACTED]S QLASLSKQLI EAERRVKEAS HQEEMKQ[REDACTED]MEL CKLEDTLEAE QLNHTNL[REDACTED]RRE METM[REDACTED]FTEVEN L
SCHM EAARKLAITE VELERAESRL EAAESKITE[REDACTED]L EEELRIVGN[REDACTED]N VKSLEISEQE LNKQ[REDACTED]RSLHQ[REDACTED]S QLASLSKQLI EAERRVKEAS HQEEMKQ[REDACTED]IEL CKLEETLEAE QLNHTNL[REDACTED]RRE METM[REDACTED]FTEVEN I
251

```

Proteína 14-3-3

```

1
TSOLG MSSLSKREEN VYMAKLCEQC ERYDEMVKAM KDVLESGADL TVEERNLLSV AYKNVVGARR SSWRVISSIE QKHGDGAKMQ -IAKKVREEI EKEL[REDACTED]ATC[REDACTED]E ILDLLDKTLL PAAS[REDACTED]SESKI FFLKMKGDYY
ECHG MSSLSKREEN VYMAKLCEQC ERYDEMVKAM KDVLESGADL SVEERNLLSV AYKNVVGARR SSWRVISSIE QKHGDGAKMQ -IAKKVREEI ERELSATCKE ILDLLDKTLL PAASSSESKI FFLKMKGDYY
TRIS MTEKEDI VQRAKLAEQA ERYDDMAAAM KKV[REDACTED]TETGAE[REDACTED]L TNEERNLLSV AYKNVVGARR SSWRVISSIE QKTEGSEKKQ QMAREYREKV EKELRDICHD VLGLLDKYLI PKAATPESKV FYLKMKGDDY
ASCS MPESRESL VQLAKLAEQA ERYDDMAQSM KKV[REDACTED]TESGAE[REDACTED]L SNEERNLLSV AYKNVVGARR SSWRVLSSAE QKIDAEAKKQ -MAKQYRERI EKELKDICQN VLDLLDKHLI PKASTPEAKV FFLKMKGDYY

131
TSOLG RYVAE[REDACTED]FCTGE ERKQASDNSL [REDACTED]AYK[REDACTED]ATDVA E[REDACTED]DMQ[REDACTED]TTHPI RLGLALNFVS FYYEIMNPK RACELARKAF DDAVAELDTL PEESYKD[REDACTED]ATL IMQLLRDNL[REDACTED]T LWNSD[REDACTED]G[REDACTED]G
ECHG RYVAE[REDACTED]FCTGD ERKQASDNSL MAYKSATEVA E[REDACTED]DMQ[REDACTED]TTHPI RLGLALNFVS FYYEIMNPK RACELARKAF DDAVAELDTL PEESYKD[REDACTED]ATL IMQLLRDNL[REDACTED]T LWNSDAGD[REDACTED]TD AAEPPKAD
TRIS RYLAEVATGD DR[REDACTED]TNIVENSQ NAYQEALDVA KSKMQP[REDACTED]THPI RLGLALNFVS FYYEILN[REDACTED]SPD RACQLAKQAF DDAIAELDTL NEDSYKD[REDACTED]STL IMQLLRDNL[REDACTED]T LWT[REDACTED]TDAGGDE GEGGGQD[REDACTED]TA AGQ
ASCS RYLAEVASGD AKNPVIEK[REDACTED]SQ QAYQGA[REDACTED]FDVA KDKMQP[REDACTED]THPI RLGLALNFVS FYYEILN[REDACTED]APD KACQLAKQAF DDAIAELDTL NEDSYKD[REDACTED]STL IMQLLRDNL[REDACTED]T LWTSDAGT[REDACTED]DE QEGGEQQ[REDACTED]GEQ GGN
251

```

Anexina 1

```

1
TSOLG AYC RSLVHLYAPN GEKYKPTITP TPGFSPTADA EHLKRAMRGL GTNERAIIDI LGNRTSAERM AIRDAYPSIS SKTLHDALTS ELSGKFR[REDACTED]RFA LLLIQSPWQV MAEALYDAMK GAGTKERVLN
TSOLB MAYC RSLVHLYAPN GEKYKPTITP TPGFSPTADA EHLKRAMRGL GTNERAIIDI LGNRTSAERM AIRDAYPSIS SKTLHDALTS ELSGKFR[REDACTED]RFA LLLIQSPWQV MAEALYDAMK GAGTKERVLN
SCHJ MARVSGFGIT RSLIHAFDPH GKQYKPTIKP TTGFSASADA ERLHRAMKGP GTDETTIINI LARRTNYERQ EIRH[REDACTED]SYKSMY KRDLKDDLKS DTSGDFR[REDACTED]KVL CQLVVDTPYM LAKS[REDACTED]LYYAMK GLGTNDRVLI
SCHM MANISGFGIT RSLIHAFDPH GKHYRPTIKP TTGFSASADA ERLHRAMKGP GTNELAIINI LARRTNYERQ EICQ[REDACTED]SYKSLY QQDLKDDLKS DTSGDFR[REDACTED]KVL CQLVVDTPYM LAKS[REDACTED]LYYAMK GLGTNDRVLI
SCHB MANVSEFGIT RSLIHAFDPH GKHYTPTIKP TTGFSASADA ERLHRAMKGP GTDETAIINI LARRTNYERQ EL[REDACTED]CR[REDACTED]SYKSLY KHD[REDACTED]LKDDLKS ETSGDFR[REDACTED]KVL CQLVVDTPYM LAKS[REDACTED]LYYAMK GLGTNDRVLI

131
TSOLG EIIAGCSKDD IPQLKKA[REDACTED]FEE VSGGETLDDA -----IKG DTSGDYREAL LLALAGQADE PQAMQLKNLT PSTLSQV[REDACTED]VNP GLAETDAKEL YACGEGRP[REDACTED]GT AESRFMRP[REDACTED]IV NRSFLQLNAT NEAYNRAYGH
TSOLB EIIAGCSKDD IPQLKKA[REDACTED]FEE VSGGETLDDA -----IKG DTSGDYREAL LLALAGQADE PQAMQLKNLT PSTLSQV[REDACTED]VNP GLAETDAKEL YACGEGRP[REDACTED]GT AESRFMRP[REDACTED]IV NRSFLQLNAT NEAYNRAYGH
SCHJ EILTTLW[REDACTED]NDE MRAVANAYKE VLKDKGIEDS NRS[REDACTED]LVTDMKK ETCGDY[REDACTED]EYAL LSLVQ[REDACTED]AERDD IQLLQLKAIP EKG[REDACTED]VNSVINH ELAEADA[REDACTED]KDL YASGAGCLGT REKRITR[REDACTED]VIC N[REDACTED]RTPYQLYLT SEIY[REDACTED]LKLYGK
260

```


SCHM EIFTTLWNDE MKAVADAYKQ VLKDKGSEES ERSLVDMKK ETCGDYEEYAL LSLVQAERDD IPILQLKAIP DKGVNSIINH ELAEADAKDL YASGAGRVGT SERRITRVIC NRTPYQLYLT SEIYFKMYGK
 SCHB EIFTTLWNDE TRAVADAYKQ VLKDKGIEES ERSLVDMKK EISGDYEEYAL LCLVQADRDE IPVQLKAIP EKGINSIINH ELAEADAKDL YASGVGRVGT SEKRIITRVIC NRTPYQLYLT SEIYFKMYGK

261 365

TSOLG PLIDAIKKET SRDLEDFLIT RVRYATDRAS LFAELLHFAM RGAGTKDSTL QRVLALRADT DLGSIKEKYA ELYGETLEAA IKGDTSGDYE ALCLKLIGPA
 TSOLB PLIDAIKKET SRDLEDFLIT RVRYATDRAS LFAELLHFAM RGAGTKDSTL QRVLALRADT DLGSIKEKYA ELYGETLEAA IKGDTSGDYE ALCLKLIGPA
 SCHJ SLLEHIESET SGDYRKLIVS VLRYAIDRAN LIAEWLHDSM VGLGTDYAL MRLITRSEI DLQDIMKAYE VIYGKSLNA VKDDTSGDYR QTLCVLLGE
 SCHM TLEHIESET SGDYRKLIVA VLRYAIDRPS LIAEWLHDSM AGLGTDYAL MRLITRSEI DLQDIMDAYE SIYGKSLNA VKDDTSGDYR RTLCVLMGEI YNQQQ
 SCHB TLEHIESET SGDYRKLIVA ILRYAIDRPG LIAEWLHDSM AGLGTDYAL MRLITRSEI DLQDIMNPYE SIYGKSLNA VIDDTSGDYR RTLCVLLGE

Proteína pequeña de choque térmico

1 130

TSOLG MSIFPTRDNR DLSSRRRSI DWEFPQMALV PLDQVFDWAE RSRQSLHDDI MNVHRNLFSL EPFTAMDNAF ESMKEMSAI QPREFHPELE YTQPGELDFL KDAYEVBKDG RLHFVYFNV KNFKAEETI
 TSOLB MSIFPTRDNR DLSSRRRSI DWEFPQMALV PLDQVFDWAE RSRQSLHDDI MNVHRNLFSL EPFTAMDNAF ESMKEMSAI QPREFHPELE YTQPGELDFL KDAYEVBKDG RLHFVYFNV KNFKAEETI
 TSAG MSIFPTRDSR DLSSRRRTEF DWEFPQMALV PLDQVFDWAE RSRQSLHDDI VNMHRNLFSL EPFTAMDNAF ESMKEMSAI QPREFHPELE YTQPGELDFL KDAYEVBKDG RLHFVYFNV KNFKAEETI
 ECHM MLIFPVRDDR DLWSRRRSL DWEFPQMALM PFDQVFNWVE RSRQSLHDDV TNMHRNLLSL EPFSAMDNAF NSVMQELSAI QPREFHPELE YTQPGELDFL KDAYEVBKDG KLHFVYFNA KNFKPEETI

131 260

TSOLG KADKNKLIVR AQRSVACGDA AMSESVGRSI PLPPSVDRNH IQATITSDDV LVIEAPVNEP NYKAIKL TPE KGLAIQPSEV QERQLAVTNK EGLEVVTAED GSKMHLELK VDPHFAKDV KVVAKGNKVY
 TSOLB KADKNKLIVR AQRSVACGDA AMSESVGRSI PLPPSVDRNH IQATITSDDV LVIEAPVNEP NYKAIKL TPE KGLAIQPSEV QERQLAVTNK EGLEVVTAED GSKMHLELK VDPHFAKDV KVVAKGNKVY
 TSAG KADKNKLIVR AQRSVACGDA AMSESVGRSI PLPPSVDRNH IQATITSDDV LVIEAPVNEP NYKAIKL TPE KGLAIQPSEV QERQLAVTNK EGLEIVTAED GSKIHLELK VDPHFAPKDV KVVAKGNKVY
 ECHM KTDKNKLIVR AQRSVTRGDA SMSESVGRSI PLPPSVDRNH IQATITSDDV LMVEAPVDAP NYKAIKL TPE KGLAIQPTA QERQLAVTNK EGLEIVTADD GSKMHLELK VDPHFAPKDV KVVAKGNKVY

261 314

TSOLG VHGVTKKEEK TENASHSEHR EFKAFVTPE VIDASK
 TSOLB VHGVTKKEEK TENASHSEHR EFKAFVTPE VIDASKTQAE IVDGLMVVEA PLFK
 TSAG VHGVTKKEEK TENASHSEHR EFKAFVTPE VVDASKTQAE IVDGLMVVEA PLFK
 ECHM VHGVTKKEEK TEKASHSEHR EFKAFVTPE VVDASKTQAE MVNGHMVVEA PLFK

13.3 Soluciones para la electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE)

Solución de lisis: para 1ml

Urea 7 M	0.4207 g/ml
Tiourea 2 M	0.1522 g/ml
CHAPS 4%	0.04 g/ml
Tris 10 mM	0.0012 g/ml
EDTA 0.5 M	24 μ l
PMSF 200 mM	5 μ l
Leupeptin 10 mM	10 μ l
Pepstatin 1 mM	1 μ l

Solución de rehidratación: para 1ml

Urea 7 M	0.4207 g/ml
Tiourea 2 M	0.1522 g/ml
CHAPS 4%	0.04 g/ml

Solución de equilibrio: para 100ml

Urea 6 M	36.035 g/ml
Tris-HCl, pH 8.8 50 mM	3.35 ml
Glicerol 30%	34.5 ml
SDS	2 g

13.4 Protocolo para transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

- En un recipiente con buffer de transferencia a 4°C (tris base 3.03g/L, glicina 14.4 g/L y metanol 200mL), se realizó el sandwich teniendo en cuenta el siguiente orden:
 1. Extremo blanco del soporte de la cámara de electrotransferencia
 2. Esponja
 3. Papel filtro
 4. Membrana
 5. Gel 2D-PAGE
 6. Papel filtro
 7. Esponja
 8. Extremo negro del soporte de la cámara de electrotransferencia

Posteriormente el sandwich se colocó dentro de la cámara de electrotransferencia, con los polos positivo y negativo correctamente orientados. Las proteínas se transfirieron usando una corriente de 100V por un periodo de 80 min en frío a 4°C.