



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**INMUNOPROTEÓMICA DE ANTÍGENOS DE LÍQUIDO VESICULAR DE  
*TAENIA SOLIUM* Y *TAENIA CRASSICEPS*: ANÁLISIS DE LA  
VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR  
ANTICUERPOS EN LAS PARASITOSIS *TAENIA CRASSICEPS*/RATÓN Y  
*TAENIA SOLIUM*/CERDO MEDIANTE EL ANÁLISIS IMAGENOLÓGICO  
Y ESTADÍSTICO DE INMUNOBLOTS BIDIMENSIONALES.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA**

**IBT.MARCELA ESQUIVEL VELÁZQUEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR.PEDRO U.OSTOA SALOMA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR.CARLOS LARRALDE**

**DR.ARMANDO GÓMEZ PUYOU**



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.

La presente tesis doctoral se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo la dirección del Dr. Pedro Ostoia Saloma.

Esta tesis está dedicada a mis padres, porque nunca dejaron de creer en mí ni de alentarme y apoyarme para lograr mis objetivos; por su amor, su gran ejemplo de fortaleza, de superación y de búsqueda de conocimiento que me han impulsado hasta donde estoy ahora, y que me impulsan e impulsarán siempre a seguir adelante.

Pretendemos comprender la vida a través de sus coherencias e identidades, cuando ciertamente estas se explican por sí solas y no nos aportan nada. Deberíamos buscar la comprensión a partir de sus contradicciones pues estas sí nos aportan información de la vida y la realidad.

*-José Saramago-*

La unidad es la variedad, y la variedad en la unidad es la ley suprema del universo.

*-Isaac Newton-*

**Quiero agradecer:**

A mi jurado de grado por su tiempo y dedicación para evaluar la presente tesis:

Dra. Aline Schunemann de Aluja, FMVZ, UNAM

Dra. Ingeborg Dorothea Becker, FM, UNAM

Dr. Eduardo García, IIB, UNAM

Dr. Abraham Landa Piedra, FM, UNAM

Dr. Pedro U. Ostoa Saloma, IIB, UNAM

***Académicamente***

Al Dr. Pedro Ostoa, por su paciencia, su confianza y su invaluable guía a través de la realización de este trabajo. Gracias Doc!

Al Dr. Carlos Larralde, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su confianza, por sus historias, sus consejos y sus chistes.

Al Dr. Armando Gómez Puyou, por su apoyo y guía en la realización de este trabajo.

***Personales***

A mis papás: Yolanda Velázquez y Miguel Ángel Esquivel, por nunca dejar de confiar en mí, por su constante apoyo, por sus enseñanzas y por su infinito amor. ¡Este logro es de ustedes también! ¡Los amo!

A mis hermanas Karla y Andrea, por su amor y su apoyo. ¡Las quiero!

A mis abuelos Vicente e Isauro, y abuelas Chelo y Guille, por ser los pilares de la familia, por su ejemplo de constante lucha y superación, por su amor y su apoyo. De igual manera a mis tíos, tías, primos y primas les agradezco su apoyo y su cariño. Hace tanto que me fui, pero siempre los llevo presentes. ¡Gracias!

A mis amigas biotecnólogas Azucena y Laura, gracias por su amistad, por su apoyo, por sus consejos y por recorrer conmigo este camino iniciado hace ya casi 10 años. ¡Las quiero chicas!

A mis amigos Sabina, Daniela, Rebeca, Elba, Poncho, Josué, etc, por compartir conmigo los sueños, anhelos y la vida; y por las excelentes personas que son.

A mis compañeros Mariana, María, Memo, Hugo, Evelyn, César, Israel, etc., por compartir conmigo la pasión por la investigación, sus conocimientos y su amistad.

A Pedro, por su amistad, su amor, su apoyo y su confianza; y por compartir conmigo los sueños y la vida. Te quiero amor!



A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por abrirme las puertas al conocimiento y a la apasionante búsqueda del mismo.

Al CONACyT, por brindarme los medios económicos para poder realizar mi trabajo doctoral.

Al PAPIIT (Proyecto no. 204311-3) por proporcionar los medios económicos que permitieron la conclusión de este estudio.

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>3</b>
El parásito: <i>Taenia solium</i> .....	3
Cisticercosis porcina .....	5
El modelo para el estudio de la cisticercosis por <i>T. solium</i> : <i>Taenia crassiceps</i> .....	7
<b>Planteamiento del Problema</b> .....	<b>10</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>11</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>12</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>14</b>
<b>1. Electroforesis bidimensional de antígenos de <i>Taenia crassiceps</i></b> .....	<b>14</b>
a. Parásitos y animales.....	14
b. Preparación de antígenos de <i>T. crassiceps</i> (TcAg).....	14
c. 2-D electroforesis e inmunoblot .....	15
d. Análisis de las imágenes.....	18
<b>2. Electroforesis bidimensional de antígenos de <i>Taenia solium</i></b> .....	<b>21</b>
a. Parásitos y animales.....	21
b. Preparación de antígenos de <i>T. solium</i> .....	21
c. 2-D electroforesis e inmunoblot .....	22
d. Análisis de las imágenes (ver anexo III) .....	23
<b>3. Electroforesis unidimensional de antígenos de <i>Taenia solium</i></b> .....	<b>25</b>
a. Parásitos y Animales .....	25
b. Preparación de antígenos de <i>T. solium</i> .....	26
c. Limpieza de las proteínas de los LV <sub>j</sub> .....	26
d. Electroforesis unidimensional e inmunoblot.....	27
<b>Resultados</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Electroforesis bidimensional de antígenos de <i>Taenia crassiceps</i></b> .....	<b>31</b>
<b>2. Electroforesis bidimensional de antígenos de <i>Taenia solium</i></b> .....	<b>44</b>
<b>3. Electroforesis unidimensional de antígenos de <i>Taenia solium</i></b> .....	<b>56</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>71</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>80</b>

Análisis de los 2D-IgG inmunoblots en el modelo murino: <i>Taenia crassiceps</i> .....	80
Análisis de la variabilidad antigénica/inmunológica en la infección natural: <i>Taenia solium</i> en cerdos.....	81
<b>Perspectivas.....</b>	<b>82</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>83</b>
<b>Artículos publicados .....</b>	<b>93</b>
A1- Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: the case of IgG response in experimental <i>Taenia crassiceps</i> cysticercosis.....	93
A2- Protein and antigen diversity in the vesicular fluid of <i>Taenia solium</i> cysticerci dissected from naturally infected pigs .....	93
A3- Budding of <i>Taenia crassiceps</i> cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals.....	93
A4- Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to focus on the challenge ....	93
A5- Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis.....	93
<b>Anexos .....</b>	<b>94</b>
Anexo I- Construcción de fenogramas con Mega 5.....	94
Anexo II- Procedimientos.....	97
Anexo III- Manual para el análisis de imágenes en 2-Dimensiones .....	99
Anexo IV- Información suplementaria.....	133

## Resumen

El agente causal de la cisticercosis y neurocisticercosis humana y porcina es el parásito *Taenia solium*. La prevalencia de la Teniasis/Cisticercosis depende en gran medida del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo (huésped intermediario).

El estudio de la diversidad de la respuesta inmunológica del huésped en la cisticercosis y de la diversidad antigénica de los parásitos es relevante para entender los mecanismos inmunológicos que el huésped desarrolla ante el parásito y su modulación por el cisticerco, cuya combinatoria define la diversidad de resultados de la infección en el huésped y en el parásito.

Primeramente – y debido a la disponibilidad y control sobre el modelo- se estudió la diversidad de la respuesta inmune IgG en ratones experimentalmente infectados con *Taenia crassiceps* de tres cepas (Balb/cAnN, C3HeB/FeJ y C57BL/6J) con diferentes grados de susceptibilidad a la infección y ambos sexos. El ejercicio permitió el desarrollo de una novedosa metodología el análisis de imágenes en 2-Dimensiones mediante la división de 2D-IgG inmunoblots mediante una cuadrícula equidistante de 10x10.

Los resultados del presente trabajo describen por primera ocasión la respuesta inmune mediada por anticuerpos IgG de 30 ratones de diferentes fondos genéticos y de ambos sexos, a los 30 días de haber sido infectados con un desafío supuestamente idéntico de 10 cisticercos de *T. crassiceps* en la cavidad peritoneal.

Diversidad fue encontrada en los ratones infectados en cuanto a la carga parasitaria de cada uno y también en la respuesta inmune IgG hacia antígenos del parásito: ningún inmunoblot fue igual a otro ni en el número de antígenos reconocidos ni en la identidad de los mismos (PM, pI). Antígenos relevantes, como aquellos asociados a las cargas parasitarias bajas, fueron identificados.

La metodología de análisis aplicada a la cisticercosis porcina por *T. solium* permitió determinar el grado de diversidad en los parásitos que infectan diferentes huéspedes, así como determinar la diversidad de la respuesta inmune IgG hacia los antígenos parasitarios.

Finalmente, para determinar el tamaño de la diversidad de la respuesta inmune comparada contra la diversidad antigénica del parásito, se realizaron inmunoblots en 1-Dimensión. La diversidad antigénica del parásito es considerable, pero la diversidad de la respuesta inmune IgG sobrepasa por mucho a la del parásito.

## Abstract

The causal agent of human and swine cysticercosis and neurocysticercosis is the parasite *Taenia solium*. The prevalence of taeniasis / cysticercosis depends largely on the relationship that man establishes with animals, particularly with the pig (intermediate host).

The study of the diversity of the host' immune response in cysticercosis and the antigenic diversity of the parasites is important to understand the immune mechanisms that the host develops towards the parasite and its modulation by the cysticercus, which defines the combinatorial diversity of outcomes of the infection in the host and the parasite.

First - and due to the availability and experimental control over the model-, we studied the diversity of the IgG immune response in mice experimentally infected with *Taenia crassiceps* in three mice strains (Balb/cAnN, C3HeB/FeJ and C57BL/6J), each with different degrees of susceptibility to the infection, and of both sexes. The experiment allowed the development of a novel methodology for the analysis of 2-dimensional images, which includes dividing the 2D-IgG immunoblots with a 10x10 equidistant grid.

The results of this paper described for the first time, the diversity of the immune response mediated by IgG antibodies toward parasite antigens in 30 mice from different genetic backgrounds and both sexes, 30 days after being infected with a supposedly identical challenge of 10 cysticerci of *T. crassiceps* in the peritoneal cavity.

Diversity was found in the infected mice in terms of parasite burden in each one and also in the IgG immune response toward parasite antigens: not a single immunoblot was identical to another neither in the number of antigens recognized nor in the identity of them (PM , pl). Relevant antigens, such as those associated with low parasite burdens were identified.

This methodology and analysis applied to the study of the porcine cysticercosis by *T. solium* allowed the determination of the degree of diversity in the protein and antigen contents of parasites obtained from different hosts, and the determination of the degree of diversity of the IgG immune response of the different hosts toward parasite antigens.

Finally, to determine the extent of the diversity of the IgG immune response compared to the diversity of the parasite antigens, immunoblots were performed in 1-dimension. The analysis of this experiment showed that the antigenic diversity of the parasite is considerable, but the diversity of the IgG immune response exceeds by far that of the parasite.

## Antecedentes

### El parásito: *Taenia solium*

*Taenia solium* (platelminto de la clase Cestoda) es un parásito que tiene como huéspedes durante su ciclo de vida tanto al humano como al cerdo, utilizando a este último como huésped intermediario y al primero como huésped definitivo (Fig 1). El cerdo desarrolla la forma larvaria del parásito (cisticerco o metacéstodo) al ingerir huevos del parásito. Los cisticercos se alojan en varios tejidos del cerdo, principalmente en los músculos (maseteros, pterigoideos, tríceps, lengua, espaldilla, corazón, pierna, lomo, falda e intercostales, en orden decreciente de predilección (Vargas MG *et al* 1986, de Aluja AS Cistimex) aunque también se pueden encontrar frecuentemente cisticercos en el cerebro (Fig 2). El humano desarrolla la forma adulta del parásito o tenia en el intestino delgado luego de ingerir cisticercos contenidos en la carne de cerdo infectada cruda o mal cocida.

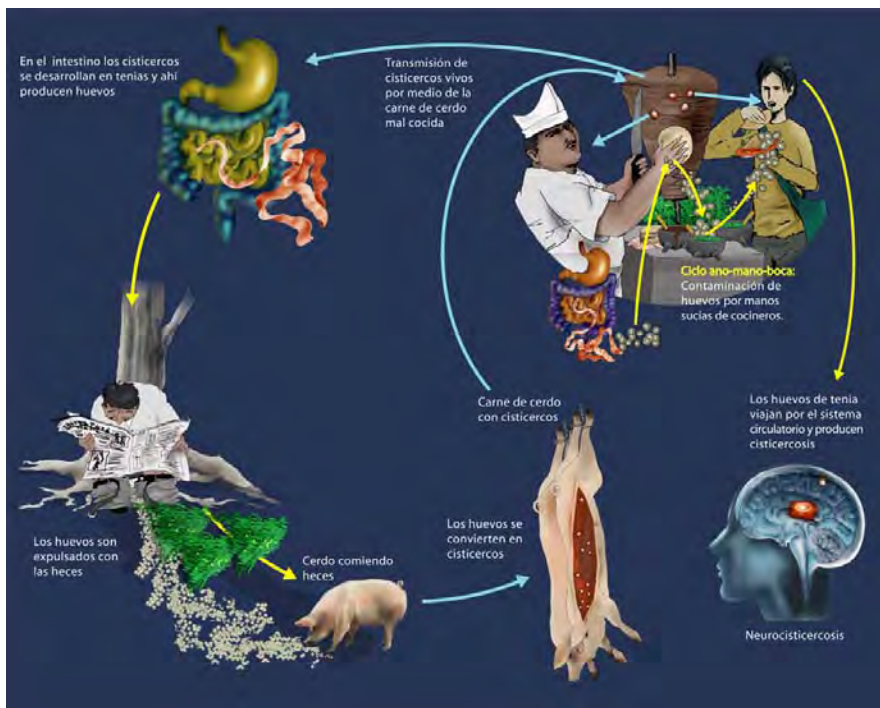


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *Taenia solium* (Tomado de [http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s5\\_4.html](http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s5_4.html))

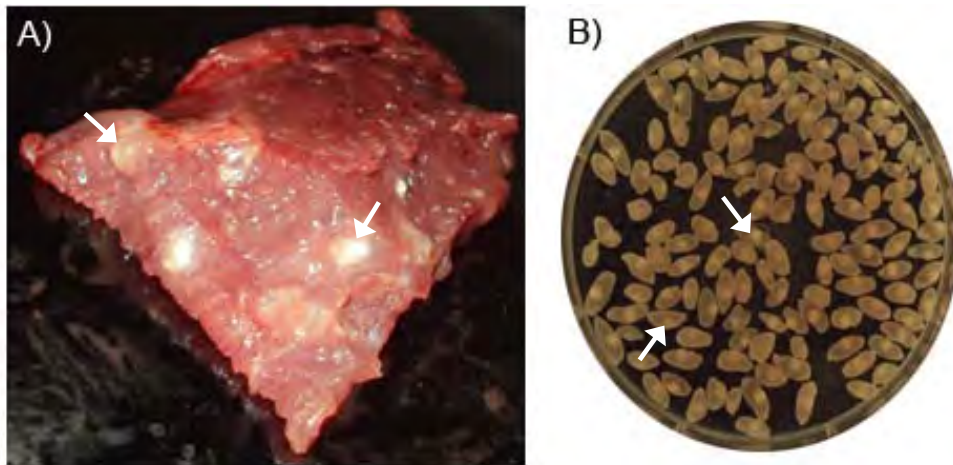


Figura 2. Fotografías de cisticercos de *Taenia solium*. A) Carne de cerdo infectada con cisticercos de *Taenia solium* (flechas). B) Cisticercos extraídos de carne de cerdo infectada. Cada vesícula es un cisticerco con el escólex invaginado (puntos blancos, flechas).

La tenia o gusano adulto madura en el intestino delgado humano y se compone de un escólex o cabeza compuesta de cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos, la cual se aplana hacia la parte inferior formando un cuello a partir del cual se forman los proglótidos y/o estróbilo, el cual compone el cuerpo de la tenia y puede llegar a medir varios metros de largo. Los proglótidos van diferenciándose y madurando conforme se van alejando del cuello. Los más distantes son totalmente maduros, con órganos femeninos y masculinos funcionales en cada uno de ellos y se encuentran llenos de huevos o grávidos (cerca de 50,000 en cada proglótido). Estos últimos se desprenden espontáneamente del gusano adulto y son excretados con las heces del huésped. El humano puede además desarrollar la forma larvaria del parásito al ingerir los huevos de *T. solium* debido a falta de higiene o consumiendo alimentos y agua contaminados con los huevos. En el humano, al igual que en el cerdo, los cisticercos se alojan en diferentes tejidos causando poca o ninguna molestia. Cuando los cisticercos se alojan en el sistema nervioso central (SNC) la condición se conoce como neurocisticercosis y puede ir asociada a una gran variedad de síntomas, desde cefaleas hasta fuertes convulsiones e incluso la muerte. El principal factor de riesgo para adquirir neurocisticercosis es ser portador de una tenia o convivir con alguien que lo sea, lo mismo sucede para la cisticercosis

porcina (Flisser A *et al*, 2003; Lescano AG *et al*, 2007; Lescano AG *et al*, 2009; Moore AC *et al*, 1995).

La cisticercosis/teniosis por *T. solium* es una enfermedad prevalente en regiones como México, Brasil, América central y la zona andina de Sudamérica; así como en China, India, sureste de Asia y África sub-Sahariana, donde las condiciones económicas y sociales de zonas rurales favorecen la propagación del parásito; y emergente en países desarrollados como EUA debido a la migración de personas provenientes de zonas endémicas (Kraft R, 2007; Moore AC *et al*, 1995; Sciutto *et al*, 2000; Serpa JA *et al*, 2011). Esta parasitosis es responsable de considerables pérdidas económicas por el decomiso de carne de cerdo contaminada y es un problema de salud pública ya que constituye la principal enfermedad parasitaria del SNC en humanos (Chang KH *et al*, 1998; Ramos-Zúñiga *et al*, 2012).

### **Cisticercosis porcina**

Los cerdos se infectan con el parásito al ingerir heces humanas con huevos de *T. solium*. En el intestino delgado los huevos pierden sus envolturas por acción de las sales biliares y enzimas proteolíticas y las oncosferas atraviesan la mucosa intestinal y entran al torrente sanguíneo o al sistema linfático que los distribuyen al hígado, corazón y después a los músculos y cerebro. Después de 14 días ya se encuentran partículas parasitarias. A los cuatro meses los cisticercos ya han alcanzado su tamaño definitivo y pueden permanecer en el huésped en su forma vesicular por periodos largos de tiempo, los cuales dependen de la cantidad de cisticercos vesiculares en el huésped y del estado nutricional del mismo. En áreas rurales endémicas es frecuente encontrar cerdos masivamente infectados con cisticercos vesiculares sin que los cerdos presenten síntomas definidos. En algunas áreas geográficas en México esta enfermedad endémica puede afectar, de acuerdo a algunos reportes, a más del 30% de los cerdos rurales (Morales J *et al*, 2008; Fleury A *et al*, 2006).



La cisticercosis es una parasitosis crónica. La mayoría de los cerdos infectados con *Taenia solium* producen anticuerpos contra antígenos del parásito, los cuales no parecen destruir al cisticerco desarrollado pero algunos de ellos podrían afectar la capacidad de éste para convertirse en gusano (García G *et al*, 2001). Aunque la presencia de anticuerpos contra antígenos del parásito ha sido ampliamente utilizada con fines diagnósticos y de seroprevalencia, un resultado positivo en inmunoensayos para detectar la presencia de anticuerpos contra antígenos del parásito no necesariamente indica la presencia del parásito, especialmente en áreas endémicas donde algunos cerdos no infectados resultan positivos en estas pruebas (Sciutto *et al*, 1998). La identificación confiable de los cerdos infectados es uno de los puntos clave para detener la transmisión del parásito. Los métodos de detección actuales se basan en la identificación del parásito en los cerdos vivos (palpación de la lengua) o post mortem (inspección de la carne). Sin embargo ambos métodos suelen pasar por alto algunos cerdos infectados, especialmente aquellos con cargas parasitarias muy bajas (Gomes AB *et al*, 2007), y hasta la fecha no se cuenta con un método inmunodiagnóstico totalmente efectivo y confiable (Ramos-Kuri M *et al* 1992; Sciutto E *et al*, 1998; Scheel CM *et al*, 2005; Prabhakaran V *et al*, 2007). Las deficiencias de los métodos de diagnóstico actuales permiten que la propagación del parásito continúe de las zonas rurales a las urbanas. Las condiciones de pobreza y la falta de información sobre el ciclo de vida del parásito, pero principalmente la falta de inspección sanitaria de la carne de cerdo en rastros municipales y clandestinos, permiten que el parásito persista en zonas rurales.

En el caso de los métodos de inmunodiagnóstico, algunas de sus fallas podrían deberse a la diversidad antigénica poco explorada del parásito, así como a las diferencias que existen en la respuesta inmune que cada huésped monta en contra de sus parásitos, dado que muchos de estos métodos se basan en antígenos crudos o semipurificados del parásito. Hace falta un estudio que explore la diversidad (entendida como la variedad, abundancia de cosas distintas, semejanza, diferencia) tanto del parásito como de la respuesta inmune medida

por las IgG hacia antígenos del parásito que los huéspedes infectados con el mismo presentan.

### **El modelo para el estudio de la cisticercosis por *T. solium*: *Taenia crassiceps***

*Taenia crassiceps* es un cestodo parásito con un ciclo de vida similar al de *T. solium*. Este parásito, debido a sus características que lo hacen fácil de propagar y de cultivar en el laboratorio, ha sido utilizado como alternativa para estudiar varios aspectos de la relación huésped-parásito, así como para obtener nuevos antígenos candidatos para inmunodiagnóstico o vacunación debido a las similitudes antigénicas que presenta con *T. solium* (Sciutto E *et al*, 2011; Peralta RH *et al*, 2010; Suzuki LA *et al*, 2007, Arruda GC *et al*, 2005; Espíndola NM *et al*, 2002; Vaz AJ *et al*, 1998; Larralde C *et al*, 1990)

*T. crassiceps* se puede propagar fácilmente en el laboratorio inyectando cisticercos en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c hembras en donde el parásito se reproduce por gemación (Fig 3).



Figura 3. Ratones balb/cAnN hembras infectados con *Taenia crassiceps* con diferentes tiempos de infección, como se puede notar por el tamaño del abdomen.

Los estudios en este modelo incluyen infecciones en diferentes cepas de ratón y sexos, lo que ha servido para determinar que el fondo genético del huésped tiene efectos sobre la reproducción del parásito

(Fragoso G *et al*, 1996, Sciutto E *et al*, 1991, Fragoso G *et al*, 1998). Asimismo, se ha observado que existe un dimorfismo sexual entre hembras y machos, presentando las hembras mayores cargas parasitarias que los machos (Fragoso G *et al*, 2008). El efecto de las hormonas directamente sobre el parásito estimulando o inhibiendo su

reproducción ha sido identificado como una de las causas de este dimorfismo sexual. Este efecto puede explicar las observaciones que se han hecho en cerdos naturalmente infectados con *T. solium*, donde los cerdos castrados y las hembras gestantes se encuentran más frecuentemente infectados que los machos (Morales J *et al*, 2006; Morales J *et al*, 2002). Además ha sido reportado en este modelo un proceso de feminización de los machos, lo que conlleva que, a periodos largos de infección, las diferencias en cargas parasitarias entre machos y hembras se minimicen (Morales-Montor J *et al*, 2005).

Importantes aspectos de la interacción inmunológica entre el parásito y el huésped han sido además estudiados en este modelo. Se sabe que al inicio de la infección los ratones infectados con *T. crassiceps* presentan una respuesta inmune tipo Th1 o inmunidad celular, caracterizada por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IgG2a, así como macrófagos con actividad proinflamatoria, evidenciada por los altos niveles de IL-12 y óxido nítrico (ON) que producen (Rodriguez-Sosa M *et al*, 2002). La respuesta inmune de los ratones tipo Th1 restringe la reproducción del parásito en las etapas iniciales de la infección, pero conforme el tiempo de infección progresa (después de tres a cuatro semanas de infección), el tipo de respuesta cambia hacia Th2 (respuesta humoral, caracterizada por altos niveles de IL-4, IL-6, IL-10 e IgG1) la cual es más permisiva al crecimiento del parásito (Terrazas LI *et al*, 1998; Villa OF *et al*, 1996). Este cambio se debe a la capacidad del parásito de producir moléculas que regulan el ambiente de citocinas en los huéspedes infectados, para de esta manera “manipular” el sistema inmune del huésped y promover su propia supervivencia (Terrazas LI, 2008).

Asimismo, en este modelo murino de cisticercosis, se han observado otros cambios en la respuesta inmune del huésped conforme avanza la infección, los cuales comprenden cambios en las poblaciones celulares del peritoneo de ratones infectados, cavidad donde los parásitos crecen y se reproducen. Al inicio de la infección ocurre el reclutamiento de linfocitos y monocitos a la cavidad peritoneal. Sin embargo, conforme la infección avanza, aparecen otros tipos celulares como eosinófilos, neutrófilos y macrófagos. Éstos últimos, después de tres semanas de

infección, expresan diferentes marcadores de superficie en comparación con los que presentan en la fase aguda de la infección, además de que se vuelven pobres productores de citocinas pro-inflamatorias y de ON, lo que se asocia con una pobre habilidad de los mismos para inducir proliferación antígeno-específica de células CD4<sup>+</sup> (Rodriguez-Sosa M *et al*, 2002). Se ha demostrado que la exposición prolongada a helmintos o a sus productos provoca los cambios antes mencionados en los macrófagos, lo que conlleva a la aparición de una población diferente de macrófagos, denominada macrófagos alternativamente activados (Terrazas LI, 2008; Allen JE *et al*, 2001; Allen JE *et al*, 1996; Raes G *et al*, 2005; Gomez-Garcia L *et al*, 2005).

A pesar de las diferencias existentes entre *T. crassiceps* y *T. solium*, gran parte de la información obtenida a partir del estudio de la respuesta inmune en la infección experimental de ratones con *T. crassiceps* ha sido extrapolada con éxito a lo que sucede en la infección natural en cerdos y humanos con *T. solium*, lo que ha permitido comprender mejor la relación huésped/parásito en esta última.

La infección con *T. crassiceps* en ratones ofrece muchas ventajas que hacen que este sea un buen modelo para el estudio de una parasitosis compleja en un huésped complejo, además de que permite obtener información útil de la relación huésped/parásito que pueda ser extrapolable a lo que sucede en la infección por *T. solium* en humanos y/o en cerdos. La posibilidad de controlar muchas variables en este modelo que difícilmente podrían controlarse en el escenario de la infección natural por *T. solium* (por ejemplo: edad, tiempo de infección, sexo, fondo genético, etc) hacen de *T. crassiceps* un modelo conveniente para estudiar diferentes aspectos de la relación huésped/parásito.

## Planteamiento del Problema

La cisticercosis porcina y la neurocisticercosis humana son problemas persistentes en países como el nuestro y emergentes en países desarrollados. A pesar de que, gracias a una gran cantidad de esfuerzos alrededor del mundo se cuenta con una gran cantidad de métodos de inmunodiagnóstico y con algunas vacunas contra la cisticercosis, no se cuenta aún con algún método de inmunodiagnóstico o vacuna que sea totalmente efectivo. Se sabe que existen diferencias genéticas entre los parásitos de diferentes regiones del mundo, al punto de que se han identificado dos regiones geográficas principales (Asia y África/Latinoamérica) (Hancock K *et al*, 2001; Nakao M *et al*, 2002; Ito A *et al*, 2003). Diferencias genéticas han sido reportadas también entre diferentes aislados de cisticercos de distintas localidades en una misma región geográfica, entre cerdos de una misma localidad y aún entre cisticercos de un mismo cerdo (Maravilla P *et al*, 2003; Bobes RJ *et al*, 2010). Estas diferencias genéticas bien podrían derivar en diferencias antigénicas. Sin embargo, sólo en contadas ocasiones se ha reportado la existencia de variabilidad antigénica entre diferentes aislados de cisticercos (Yakoleff-Greenhouse V *et al*, 1962), y menos aún se ha considerado esta variabilidad en la búsqueda de nuevos antígenos para el inmunodiagnóstico o vacunación, a pesar de que aún se utilizan frecuentemente cisticercos aislados de cerdos infectados como fuente de antígenos, siendo que antígenos sintéticos/recombinantes proveen resultados más reproducibles.

Los huéspedes infectados con el parásito, tanto en el modelo murino como en el cerdo y humano, producen una gran cantidad de anticuerpos en contra del mismo sin que esto parezca afectar su reproducción (en el caso de *T. crassiceps*) o inducir su destrucción, por lo que pareciera que este tipo de respuesta inmune es irrelevante en contra el parásito.

La variabilidad antigénica (entendida como la diversidad o diferencias en los antígenos presentes en diferentes aislados parasitarios), aunada a la variabilidad

inmunológica de los huéspedes (entendida como la diversidad o diferencias en las inmunoglobulinas contra antígenos parasitarios producidas por diferentes huéspedes infectados), podría estar involucrada en el éxito limitado que han tenido las pruebas inmunodiagnósticas y las vacunas. Sin embargo, el tamaño (entendido como el grado de diversidad o diferencia) de dichas variabilidades no ha sido sistemáticamente estudiado.

## **Justificación**

La cisticercosis y neurocisticercosis son problemas de salud pública persistentes en países en desarrollo como el nuestro. En esta parasitosis, que afecta tanto a cerdos como a humanos, se ha observado que existe una variedad de síntomas y manifestaciones diferentes presentes entre diferentes huéspedes infectados con el parásito. Asimismo, se han observado diferencias en la localización y en el número de cisticercos que infectan a huéspedes provenientes de distintas áreas geográficas, principalmente en el número y localización de cisticercos en el cerebro (neurocisticercosis).

El estudio genético de cisticercos aislados de diferentes zonas geográficas alrededor del mundo ha permitido la identificación de dos genotipos principales, lo cual podría explicar parcialmente las diferencias clinicopatológicas de la enfermedad encontradas entre huéspedes infectados con el parásito provenientes de distintas áreas geográficas. Sin embargo, estos estudios poco explican las diferencias clinicopatológicas encontradas entre huéspedes infectados de una misma región geográfica.

De la misma manera, dichas diferencias genéticas encontradas entre cisticercos aislados de diferentes regiones geográficas no explican del todo el éxito limitado que han tenido los esfuerzos actuales para encontrar una vacuna o un método inmunodiagnóstico totalmente efectivo, por lo que es necesario seguir buscando nuevas estrategias para tratar de resolver este problema.

El estudio de las diferencias (diversidad) que pudieran existir en los antígenos (proteínas del parásito que son reconocidas por las inmunoglobulinas del huésped) de cisticercos aislados de diferentes huéspedes infectados, así como de las diferencias en la respuesta inmune humoral IgG que diferentes huéspedes infectados (diversidad inmunológica) producen en contra del parásito, y la medición del tamaño de ambas diversidades (antigénica e inmunológica), podría brindar nuevas pistas y/o soluciones al problema de desarrollar una vacuna o un método inmunodiagnóstico totalmente efectivos. Las inmunoglobulinas tipo G han sido seleccionadas como objeto de estudio en el presente caso por ser la cisticercosis una enfermedad crónica, por ser las Ig más abundantes en suero y por la alta especificidad que las mismas presentan.

### **Hipótesis**

a) Si todos los ratones infectados con *T. crassiceps* tienen el mismo grado de susceptibilidad a la infección, se esperaría que reconocieran los mismos antígenos del líquido vesicular del cisticerco y que mostraran el mismo perfil de “spots” en los geles en 2-D.

b) También cabría esperar que existiera una cierta correlación entre la carga parasitaria y la respuesta inmune del huésped.

c) Cisticercos aislados de cerdos que se encuentran infectados naturalmente con *Taenia solium*, expresarán las mismas proteínas, y por ende, los mismos antígenos a pesar de infectar huéspedes distintos.

d) Cerdos naturalmente infectados con *Taenia solium*, mostrarán una respuesta inmune humoral distinta entre ellos, pero será posible encontrar antígenos parasitarios que las inmunoglobulinas de todos los cerdos del estudio reconozcan.

## Objetivos

### Generales

Caracterizar la respuesta inmune mediada por anticuerpos IgG en ratones infectados con *Taenia crassiceps* para la identificación de antígenos del líquido vesicular a través de imágenes de 2D-IgG inmunoblots.

Identificar y determinar el tamaño de la diversidad antigénica del parásito e inmunológica del huésped (medida por anticuerpos IgG del suero) en cerdos naturalmente infectados con *Taenia solium*.

### Específicos

1) Analizar la respuesta inmune medida por anticuerpos IgG en ratones infectados experimentalmente hacia antígenos de líquido vesicular de *Taenia crassiceps* por medio de imágenes de 2D-IgG inmunoblots.

2) Analizar el efecto de la cepa, sexo e individualidad del huésped (ratones) sobre la carga parasitaria y número de “spots” en ratones infectados por *T. crassiceps*.

3) Desarrollar un método de análisis para medir la variabilidad de imágenes en 2-Dimensiones de los 2D-IgG inmunoblots generados del análisis del modelo murino de cisticercosis.

4) Determinar el tamaño de la diversidad antigénica de cisticercos de *T. solium* aislados de diferentes cerdos infectados.

5) Determinar el tamaño de la diversidad inmunológica de anticuerpos IgG en cerdos naturalmente infectados con *T. solium*.

6) Determinar cuál de las dos diversidades (inmunológica y antigénica) es mayor en cerdos naturalmente infectados con *T. solium*.



## Materiales y métodos

### 1. Electroforesis bidimensional de antígenos de *Taenia crassiceps*

#### a. Parásitos y animales

Cinco ratones hembras y cinco machos de cada una de las cepas C57BL/6J (resistente a la infección), C3HeB/FeJ (resistencia media) y Balb/cAnN (susceptible) obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas fueron infectados con *T. crassiceps* mediante la inyección intraperitoneal de 10 cisticercos fragmentados con un bisturí (Fragoso et al, 2008) y suspendidos en 100 µL de PBS estéril. Después de 30 días de infección, los ratones fueron sangrados por la cola y sacrificados de acuerdo a los lineamientos institucionales (cámara de CO<sub>2</sub>). La sangre se dejó coagular y se colocó a 4°C para consensar el coágulo. La cavidad peritoneal de cada ratón fue lavada repetidamente con PBS estéril para recuperar los cisticercos en cajas de Petri y contarlos. El suero de cada ratón se obtuvo a partir de la sangre coagulada mediante centrifugación (14,000 rpm) y el suero de cada ratón fue congelado a -20°C hasta su utilización.

#### b. Preparación de antígenos de *T. crassiceps* (TcAg)

Para la preparación de los antígenos solubles del Líquido Vesicular (LV) de *T. crassiceps*, cientos de cisticercos de la cavidad peritoneal de un ratón donador hembra Balb/cAnN fueron cosechados y lavados varias veces con PBS frío suplementado con antibióticos al 2% v/v (Anti-Anti 100 X, Gibco Cat. 15240). Los cisticercos fueron después suspendidos en un volumen mínimo de agua destilada y sometidos a dos ciclos de congelamiento-descongelamiento (-78 °C-30 °C) en presencia de un coctel de inhibidores de

proteasas (Amersham), luego de lo cual se centrifugaron a 25,000 rpm durante 30 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado y la cantidad de proteína se determinó colorimétricamente utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (No. Cat. 500-006) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Alícuotas de 50 µL fueron guardadas a -20°C hasta su uso.

#### c. 2-D electroforesis e inmunoblot

Con el objetivo de detectar los antígenos que los anticuerpos del suero de cada ratón reconocen del parásito, se realizaron 30 electroforesis bidimensionales de TcAg.

##### i. Primera dimensión: separación por punto isoeléctrico

##### 1. Rehidratación de la tira IPG.

Se utilizaron tiras de 7 cm pHi 3-10 NL (Bio-Rad, Cat. 163-2002), las cuales fueron rehidratadas con 125 µL de la siguiente mezcla:

- Urea 6M (Research organics, Cat. 9692U)
- 2% w/v CHAPS (USB, Cat. 13361 1 GM)
- 0.8% w/v DTT (Promega Cat. V3151)
- 0.8% IPG Buffer (Bio-Lyte 3-10 Buffer, Bio-Rad, Cat. 163-2094)
- 0.002% Azul de Bromofenol
- 120 µg de TcAg
- Aforar a 125 µL con Agua MilliQ

Para rehidratar cada tira, la mezcla anterior fue colocada cuidadosamente en un carril de una bandeja de rehidratación/equilibración (Bio-Rad, Cat.1654035). Con ayuda de un par de pinzas (Bio-rad, Cat. 1654070) se retiró la protección de la tira y ésta se colocó en la bandeja sobre la mezcla con el gel hacia abajo en contacto directo con la mezcla. Se agregaron 900  $\mu$ L de aceite mineral (PlusOne DryStrip Cover Fluid, Amersham Biosciences, Cat. 17-1335-01) sobre la tira para evitar la evaporación de la mezcla y se dejó rehidratar a temperatura ambiente por un mínimo de 12 horas.

## 2. Isoelectroenfoque

En una bandeja de electroenfoque (Bio-rad, Cat. 165-4030) se colocó sobre cada electrodo de uno de los carriles de la bandeja un papelito (Bio-Rad, Cat. 1654071) y se agregaron 10  $\mu$ L de agua nanopura a cada uno de ellos (Bio-Rad). Posteriormente, se sacó la tira de la bandeja de rehidratación, se dejó escurrir 5 segundos sobre papel absorbente y se colocó con el gel hacia abajo en el carril de la cámara de electroenfoque cerciorándose que el gel hiciera contacto con los papelitos sobre los electrodos. La cámara se colocó después en el equipo Protean IEF Cell (Bio-Rad), se agregaron 900  $\mu$ L de aceite mineral sobre la tira, se colocó la tapa de la bandeja y se cerró la tapa del equipo. El isoelectroenfoque se realizó por un total de 10,000 V-hr en 3 pasos:

Paso 1: Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 250 V en 20 min.

Paso 2: Aumento lineal del voltaje hasta llegar a 4000 V en 2 horas.

Paso 3: Aumento rápido del voltaje a 4000 V y mantención hasta acumular 10,000 V-hr.

Terminado el programa de isoelectroenfoque, la tira fue extraída del equipo y se procedió a separar las proteínas en la segunda dimensión.

ii. Segunda dimensión: separación por peso molecular

1. Equilibración de la tira IPG

Se colocó la tira en un tubo de ensaye con 2 mL de amortiguador de equilibrio (6M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8 (SIGMA, Cat. 77-86-1), 2% w/v SDS (Bio-Rad, Cat. 161-0302), 20% v/v glicerol) + 0.5% w/v DTT (PROMEGA, Cat. V3151) y se incubó durante 10 min en agitación continua. Acto seguido, la tira fue incubada con 2 mL de amortiguador de equilibrio + 2.5% w/v de iodoacetamida (SIGMA, Cat. I1149-25G) durante 10 min.

2. Electroforesis

Después de la equilibración, la tira fue cargada en un gel de poliacrilamida (Ready-Gel 10-20%, Bio-Rad, Cat. 161-1395) y se sometió a electroforesis con corriente constante de 25 mA.

3. Electrotransferencia

Las proteínas separadas en 2-D fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa usando una cámara de transferencia semi-húmeda (Trans-Blot SD Semy Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante (20V, 1 h) utilizando amortiguador Tris-Glicina-Metanol (25 mM Tris pH 8.3, 250 mM glicina, 0.1% SDS, 20% v/v metanol)

#### 4. Western Blot

Las membranas se bloquearon con leche Svelty al 5% w/v en PBS-Tween 20 0.3% (SIGMA, Cat. P-1379) pH 7.4 (PBS-T) durante toda la noche a 4°C en agitación continua y posteriormente cada una fue incubada con un suero de un ratón distinto a una dilución 1:1000 en PBS-T + 5% leche Svelty a temperatura ambiente por 5 horas en agitación continua. Las membranas luego fueron lavadas 4 veces con 20 mL de PBS-T en agitación, cada lavado con una duración de 10 minutos. Para detectar los anticuerpos del suero unidos a los antígenos, las membranas se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano (goat anti-mouse IgG (h+L)-HRP; ZYMED, Cat. 62-6520) diluido 1:2500 en PBS-T durante 1 hora en agitación continua a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 4 veces con 20 mL de PBS-T durante 10 min. Finalmente, la reacción antígeno-anticuerpo fue revelada incubando las membranas con DAB (SIGMA Cat. D5905; 0.5 mg/ml en PBS-T+ 0.015% peróxido de hidrógeno) durante 10-15 min, tras lo cual las membranas se lavaron con agua corriente para detener la reacción.

#### d. Análisis de las imágenes

##### i. Adquisición

Las imágenes de los inmunoblots fueron digitalizadas utilizando un escáner HP Scanjet 3800 con una resolución de 1200 dpi en formato tif.

## ii. Procesamiento

Las imágenes escaneadas fueron transformadas al formato .1sc para su análisis en PdQuest (Bio-Rad) utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). Posteriormente las imágenes analizadas fueron transferidas a Adobe Photoshop donde se hizo el conteo del número total de puntos (desde ahora “spots”) y la identificación de sus coordenadas. Todas las imágenes fueron analizadas con los mismos parámetros de brillo, contraste y color para minimizar el sesgo. Para estimar la variabilidad técnica de este procesamiento de imágenes cuatro imágenes escogidas al azar fueron procesadas 5 veces de la misma manera. Una variación de  $\approx 5\%$  en el conteo de spots en cada imagen fue encontrada. La variabilidad en la posición de los spots fue calculada tomando como referencia los spots más prominentes localizados en los extremos y en el centro de las imágenes, y fue de 1.8 kDa para peso molecular (PM) y 0.02 unidades de pH para el punto isoeléctrico (pI). El número total de spots en cada una de las imágenes fue compilado en una base de datos. Se determinó además el número total de spots distintos entre las imágenes, comparando las coordenadas de peso molecular y de punto isoeléctrico de todos los spots de todas las imágenes y determinando cuáles de ellos eran los mismos, tomando como referencia la variabilidad antes calculada en la posición de los spots.

## iii. Análisis

Cada una de las imágenes fue dividida por 10 filas equidistantes (PM) y 10 columnas equidistantes (pI), formando una cuadrícula de 10 por 10 casillas. Cada casilla fue valuada con un 1 (casilla positiva) o un 0 (casilla

negativa) dependiendo si dentro contenía al menos un spot ( $\geq 1$ ) o ninguno. Con esta información se construyó una base de datos de unos y ceros de cada uno de los 2D-IgG inmunoblots, correspondiente al suero de un ratón diferente, agregando información adicional como sexo, cepa, carga parasitaria (número de parásitos), categorías de carga (bajo o  $\leq 11$ , medio o  $> 11$  y  $\leq 50$ , alto o  $\geq 51$ ) y número de spots. El programa SPSS 15 fue utilizado para todos los análisis estadísticos.

Se realizó un ANOVA multivariado (Ostle B, 1973) para evaluar el efecto del fondo genético (cepas), el sexo y la combinación cepa-sexo sobre el número de spots, la carga parasitaria y las categorías de carga. Se realizó además una correlación lineal de Pearson entre el número de spots ( $\Sigma$ spots) y la carga parasitaria ( $\Sigma$ parásitos) de cada uno de los 30 ratones. También se correlacionaron los valores de cada una de las casillas (0 y 1) con las categorías de carga parasitaria mediante la prueba no paramétrica de  $\chi^2$  Kruskal-Wallis y entre ellas mediante una correlación bivariada de Pearson. Se obtuvieron matrices de similitud mediante una Correlación usando como medida el coeficiente de Dice. Fenogramas fueron contruidos utilizando el software Mega5 (Tamura K *et al*, 2011) con la información de las matrices de similitud (ver anexo I). La varianza de cada una de las imágenes fue calculada, para lo cual se construyó una “imagen promedio”, definida como la suma del número de spots dentro de cada casilla en todas las imágenes dividida entre el número total de imágenes (30 imágenes). La suma de la distancia al cuadrado entre el número de spots en cada casilla de cada imagen y la “imagen promedio” representa la contribución de esa imagen a la diversidad total (varianza). Las diversidades de cada imagen fueron analizadas mediante una prueba de ANOVA para determinar las fuentes de su variación (Cepa, sexo e individuos) y su correlación con las categorías de carga. Las correlaciones significativas entre las casillas positivas de las 30 imágenes fueron interpretadas como redes, en las cuales cada nodo correspondió a una casilla, cada correlación significativa a un conector y el doble del número de

conectores al número de conexiones. La proporción del  $\Sigma$ conectores/ $\Sigma$ spots en cada red fue interpretado como el Índice de Conectividad (IC) de esa red. Los análisis estadísticos fueron considerados significativos con una  $p < 0.05$  y muy significativos con  $p < 0.01$ .

## **2. Electroforesis bidimensional de antígenos de *Taenia solium***

### **a. Parásitos y animales**

Todos los cerdos utilizados en este estudio adquirieron cisticercosis por *T. solium* de manera natural en sus músculos esqueléticos, como fue confirmado por exámenes macro y microscópicos, y todos provinieron de zonas rurales endémicas geográficamente separadas con perfiles económicos y sociológicos similares en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla. Los cerdos fueron recolectados espaciadamente durante un periodo de tiempo comprendido entre el 02 de octubre de 2007 y el 28 de abril de 2010 (Tabla 6). Se obtuvieron muestras de sangre de los cerdos antes de ser sacrificados de acuerdo a los estándares establecidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (de Aluja AS, 1999). El suero de cada cerdo se obtuvo centrifugando la sangre coagulada y se prepararon alícuotas de 1 mL cada uno, las cuales fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **b. Preparación de antígenos de *T. solium***

Los cisticercos de *T. solium* fueron cuidadosamente extraídos de los músculos esqueléticos de los cerdos infectados con ayuda de pinzas y bisturí y colocados en PBS estéril durante 5-10 min. Con la ayuda de un bisturí



nuevo los cisticercos fueron ponchados y el LV de cada cisticerco fue colectado individualmente en tubos Eppendorf de 1 mL con 5  $\mu$ L de inhibidor de proteasas (Amersham, Cat. No. 80-6501-23). Una mezcla de LV de cisticercos individuales o "pool" de LV fue preparada mezclando volúmenes iguales (5-10  $\mu$ L) de los LV colectados de 15 cisticercos individuales de cada cerdo de manera que se creó un pool de LV por cerdo (LV<sub>i</sub>). Todos los LV individuales y los pools fueron congelados y guardados a -20°C hasta su uso.

c. 2-D electroforesis e inmunoblot

El contenido de cada una de las muestras de pool de LV (LV<sub>1-9</sub>) fue determinado utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se realizaron electroforesis en 2-Dimensiones como anteriormente se describió para el caso de *T. crassiceps*, con las siguientes variantes:

1) Paso i. Primera dimensión. Rehidratación de la tira. Cada tira fue hidratada con 35 $\mu$ g de proteínas de los distintos LV<sub>i</sub>. Las tiras utilizadas en este caso fueron de 7 cm pH 3-10 NL (GE Healthcare, Cat. 17-6001-12). La mezcla de rehidratación y el procedimiento no se modificaron.

2) Paso ii. Segunda dimensión. Electroforesis. Las tiras ya equilibradas fueron cargadas en geles de poliacrilamida (5% concentrador /12% separador) con 2 pozos extra, uno a cada lado de la tira, los cuales fueron utilizados para cargar el marcador de peso molecular (Fermentas, Cat. SM0671) y en el otro pozo 10  $\mu$ g del LV<sub>i</sub> correspondiente con amortiguador de carga (Laemli con  $\beta$ -mercaptoetanol). Cada gel fue sometido a electroforesis con corriente constante a 25 mA.

3) Paso ii. Segunda dimensión. Electrotransferencia. Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF por lo cual, previo a la transferencia, las membranas fueron activadas con metanol y equilibradas con amortiguador de transferencia. Las membranas transferidas fueron teñidas reversiblemente con MEM-CODE Reversible Stain Kit (PIERCE,

Cat. 24585), escaneadas y desteñidas para poder seguir con el Western Blot.

4) Paso 2. Segunda dimensión. Western Blot. Cada membrana fue incubada con el suero del cerdo del cuál provenían los cisticercos del  $LV_i$  correspondiente diluido 1:1000 (anticuerpo primario), de manera que la reacción resultante es la de cada cerdo con sus propios parásitos. Después de la incubación con el anticuerpo secundario (ZYMED, H+L Cat. 61-9120) las membranas fueron lavadas 5 veces con PBS-T antes de ser reveladas. El revelado se realizó con DAB 0.1 mg/mL en PBS-T + 0.015 % peróxido de hidrógeno.

5) Para cada  $LV_i$  se realizaron los experimentos por duplicado o triplicado para verificar la reproducibilidad. Sólo los spots presentes en las réplicas de cada  $LV_i$  fueron utilizados para análisis posteriores, descartando aquellos spots que no lo estuvieran.

#### d. Análisis de las imágenes (ver anexo III)

##### i. Adquisición

Las imágenes de las membranas teñidas reversiblemente y de los 2D-IgG inmunoblots fueron digitalizadas utilizando un escáner HP Scanjet G4050 con una resolución de 300 dpi en formato tif. Todas las imágenes fueron analizadas con los mismos parámetros de brillo, contraste y color para minimizar el sesgo.

## ii. Procesamiento

Las imágenes escaneadas fueron analizadas en PdQuest (Bio-Rad, versión 8.0.1) creando un experimento diferente para cada conjunto de imágenes (réplicas de un mismo LV<sub>i</sub>). De cada conjunto o experimento se obtuvo una imagen maestra o “master” gel, el cual contiene únicamente a los spots presentes en las réplicas. El número total de spots en cada una de las imágenes maestras fue compilado en una base de datos.

## iii. Análisis

Cada una de las imágenes maestras fue dividida por 10 filas equidistantes (PM) y 10 columnas equidistantes (pl), formando una cuadrícula de 10 por 10 casillas. Cada casilla fue valuada con un uno (casilla positiva) o un cero (casilla negativa) dependiendo si dentro contenía al menos un spot ( $\geq 1$ ) o ninguno. Con esta información se construyó una base de datos de unos y ceros de cada uno de los 2D-IgG inmunoblots, correspondiente a la reacción del suero de con cerdo diferente contra los antígenos del LV<sub>i</sub> de sus propios cisticercos, agregando información adicional como sexo, origen del cerdo y número de spots. El programa IBM® SPSS® Statistics Version 19 fue utilizado para todos los análisis estadísticos.

Una prueba de ANOVA Univariado fue usada para analizar el efecto de la variable independiente sexo de los cerdos (2 niveles)

sobre la variable dependiente  $\Sigma$  spots. Se realizó una correlación de Pearson entre las casillas y se identificaron las casillas que correlacionaban significativamente entre sí. Se obtuvieron matrices de similitud mediante una Correlación usando como medida el coeficiente de Dice. La prueba no paramétrica de  $\chi^2$  fue usada para correlacionar casillas positivas con el sexo del huésped. Fenogramas fueron construidos utilizando el software Mega5 (Tamura K *et al*, 2011) con la información de las matrices de similitud (ver anexo I). La varianza de cada una de las imágenes maestras fue calculada, para lo cual se construyó una “imagen promedio”, definida como la suma del número de spots dentro de cada casilla en todas las imágenes dividida entre el número total de imágenes (30 imágenes). La suma de la distancia al cuadrado entre el número de spots en cada casilla de cada imagen y la “imagen promedio” representa la contribución de esa imagen a la diversidad total (varianza). Los análisis estadísticos fueron considerados significativos con  $p < 0.05$  y muy significativos con  $p < 0.01$ .

### **3. Electroforesis unidimensional de antígenos de *Taenia solium***

#### **a. Parásitos y Animales**

Todos los cerdos utilizados adquirieron cisticercosis por *T. solium* de manera natural se obtuvieron de distintas zonas rurales de los estados de Morelos, Guerrero y Puebla (Tabla 6). Los cisticercos y el suero fueron colectados como se describió con anterioridad.

b. Preparación de antígenos de *T. solium*

Como en el caso anterior (electroforesis bidimensional de antígenos de *T. solium*), se realizó un pool de LV de los cisticercos obtenidos de cada uno de los cerdos, utilizando 15 cisticercos individuales en cada caso ( $LV_i$ , donde  $i$  tiene un valor entre 1 y 11 y representa el pool de LV de los cisticercos provenientes de cada cerdo). El contenido de proteínas de cada  $LV_i$  fue determinado mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad)

c. Limpieza de las proteínas de los  $LV_i$

Para eliminar de la mezcla de proteínas de cada  $LV_i$  las inmunoglobulinas del huésped contenidas en la misa, cada  $LV_i$  fue incubado con Proteína G Sefarosa (PGS) (Hi Trap Protein G HP, GE Healthcare, Cat. 14-0404-01). Para realizar este procedimiento, el contenido de una columna Hi Trap de 1 mL fue removido de la columna de polipropileno y vaciados en un tubo eppendorf de 2 mL. La PGS obtenida de la columna fue lavada 5 veces con 500  $\mu$ L de amortiguador de unión (Buffer de Fosfatos 10 mM, pH 7.0) en agitación constante durante 2 minutos, cada lavado seguido de la centrifugación del tubo a 8000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante en cada caso fue desechado. Un último lavado fue realizado con 500  $\mu$ L de agua Milli-Q después del cual el  $LV_i$  (200  $\mu$ g de proteínas del  $LV_i$  diluidos en un volumen final de 500  $\mu$ L de agua Milli-Q fue añadido a la PGS e incubado durante 15 minutos en agitación moderada constante a temperatura ambiente. Finalmente el tubo fue centrifugado durante 1 min a 8000 rpm y el sobrenadante fue colectado como F1. Cinco lavados posteriores de la PGS fueron realizados con 500  $\mu$ L de amortiguador de unión y el sobrenadante de cada uno de ellos fue colectado como F2, F3-4 y F5-6. Los sobrenadantes colectados durante este procedimiento (F1 a F6) fueron concentrados mediante el equipo Vacufuge (Eppendorf) durante 2 horas utilizando el programa para soluciones acuosas. Este procedimiento fue repetido para

cada uno de los  $LV_i$ , y el contenido de proteína de cada sobrenadante concentrado fue medido. Para reutilizar la PGS, ésta fue incubada durante 20 min con Amortiguador de Elución (Glicina 0.1M, pH 2.7), seguido de un segundo lavado de 10 minutos y de cuatro lavados más de 2 minutos cada uno con el mismo amortiguador, descartando el sobrenadante en cada caso. Posteriormente la PGS fue equilibrada con cinco lavados de amortiguador de unión y reutilizada.

#### d. Electroforesis unidimensional e inmunoblot

##### i. Electroforesis

1. La electroforesis unidimensional se realizó en geles de poliacrilamida-SDS (5% concentrador, 10% separador). Cada uno de los geles elaborados constó de 4 pozos: el primero, tercero y cuarto fueron del tamaño de un peine de 10 pozos, mientras que el segundo fue del tamaño de 7 pozos. Sólo se utilizaron los 3 primeros carriles. Para realizar el pozo grande, se colocó cinta diurex sobre 7 dientes del peine de manera que al colocarlo en el gel quedara la forma de un pozo grande. En el primer pozo se cargaron 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular (Fermentas), en el segundo pozo (pozo grande) se cargaron 70  $\mu$ g del sobrenadante F1 de los  $LV_i$  y en el tercer pozo se colocó el  $LV_i$  original (sin limpiar). Se utilizó un gel independiente por cada uno de los once  $LV_i$ . Cada gel fue sometido a electroforesis a 25 mA corriente constante. Previo a la electrotransferencia, los geles fueron teñidos reversiblemente con Zinc-Imidazol (Hardy E *et al*, 2004, ver anexo II) y digitalizados. Posteriormente, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Hi Bond, Amersham, Cat. RPN303D) utilizando una cámara semi-húmeda (Scie-Plas) durante 1.5 horas a 200 mA, colocando Blotting papers (Bio-Rad, Cat. 170-3969) recortados a la medida del gel y humedecidos en amortiguador de transferencia,

dos bajo la membrana y dos sobre el gel. Para confirmar la transferencia de proteínas, las membranas fueron teñidas reversiblemente con CPTS (ver anexo II), marcando con lápiz los límites de las áreas donde se encontró el bandeo de proteínas (área 1: bandas de LV<sub>i</sub> limpias; área 2: bandas de LV<sub>i</sub> sin limpiar).

## ii. Western Blot

1. Las membranas fueron bloqueadas con leche Svelty al 5% en PBS-T en agitación constante a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, utilizando como guías las marcas hechas en lápiz, las membranas fueron cortadas en tiras de 3 mm de ancho obteniendo así 13 tiras del área 1, y 2 tiras del área 2. Cada tira fue incubada durante 5 horas a temperatura ambiente en agitación continua con solución de bloqueo fresca, como se describe a continuación:

### a. Tiras área 1

- i. Tira 1: Suero cerdo 1 diluido 1:2000
- ii. Tira 2: Suero cerdo 2 diluido 1:2000
- iii. Tira 3: Suero cerdo 3 diluido 1:2000
- iv. Tira 4: Suero cerdo 4 diluido 1:2000
- v. Tira 5: Suero cerdo 5 diluido 1:2000
- vi. Tira 6: Suero cerdo 6 diluido 1:2000
- vii. Tira 7: Suero cerdo 7 diluido 1:2000
- viii. Tira 8: Suero cerdo 8 diluido 1:2000

- ix. Tira 9: Suero cerdo 9 diluido 1:2000
  - x. Tira 10: Suero cerdo 10 diluido 1:2000
  - xi. Tira 11: Suero cerdo 11 diluido 1:2000
  - xii. Tira 12: Sueros cerdo 1 al 11, diluidos 1:2000 cada uno.
  - xiii. Tira 13: Sin suero
- b. Tiras área 2
- i. Tira 1: Sueros cerdo 1 al 11, diluidos 1:2000 cada uno.
  - ii. Tira 2: Sin suero

Pasado el tiempo de incubación, las tiras fueron lavadas con PBS-T, incubadas con el anticuerpo secundario (Goat anti-Porcine IgG, HRP; Millipore, Cat. AP166P) y reveladas siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para las membranas de los 2D-inmunoblots de antígenos de *Taenia solium*.

iii. Análisis de las imágenes

1. Adquisición

Después del Western Blot, las tiras se dejaron secar, se acomodaron reconstruyendo la membrana antes de ser cortada y se escanearon utilizando un escáner HP Scanjet G4050 con una resolución de 300 dpi en formato tif. Se obtuvieron de esta manera 11 imágenes escaneadas.



## 2. Procesamiento

Las imágenes digitalizadas (geles e inmunoblots) fueron analizadas con el programa Quantity One (Bio-Rad) para la detección de bandas y el cálculo de los pesos moleculares de cada una.

## 3. Análisis

Cada una de las imágenes fue analizada con el programa Quantity One y se obtuvieron los reportes de las bandas presentes en cada caso o  $LV_i$ . Se exportaron los datos de peso molecular de cada una de las bandas reconocidas en los  $LV_i$  limpios y se compararon con las bandas de otras imágenes para determinar qué bandas eran las mismas y cuáles eran diferentes, qué bandas fueron reconocidas por un mismo suero en los diferentes  $LV_i$ , así como el número y origen de los sueros que reconocieron cada una de las bandas en cada  $LV_i$ . Utilizando esta información, se construyeron matrices de similitud utilizando el programa SPSS 19 para determinar qué tanto se parecen entre sí las imágenes de proteína (geles) y de inmunoblots dentro de un mismo  $LV_i$  y entre  $LV_i$ . Fenogramas fueron construidos con los datos de las matrices de similitud utilizando el software Mega5 (para comparar los patrones de bandeo de diferentes sueros en un mismo  $LV_i$  y entre diferentes  $LV_i$ ). Todas las matrices de similitud fueron construidas utilizando el Coeficiente de Dice y todos los fenogramas fueron construidos utilizando el método de agrupación UPGMA.

## Resultados

### 1. Electroforesis bidimensional de antígenos de *Taenia crassiceps*

Las proteínas de *T. crassiceps* fueron separadas en 2-Dimensiones y, después de transferidas a membranas de nitrocelulosa, se dejaron reaccionar con los anticuerpos del suero de cada uno de 30 ratones infectados de 3 cepas (Balb/c AnN, C3HeB/FeJ y C57BL/6) y ambos sexos para obtener los 2D-IgG inmunoblots.

El conjunto de las imágenes de los 2D-IgG inmunoblots obtenidas se muestra en la figura 4. Visualmente es fácil apreciar la diversidad que existe entre las imágenes, aún entre aquellas de individuos del mismo sexo y la misma cepa, así como la existente entre diferentes cepas y sexos. Ninguna imagen es igual a otra.

Estas imágenes fueron después procesadas computacionalmente como se ha descrito en Materiales y Métodos para identificar los spots (fig 5), determinar el número de spots en cada imagen y calcular sus coordenadas.

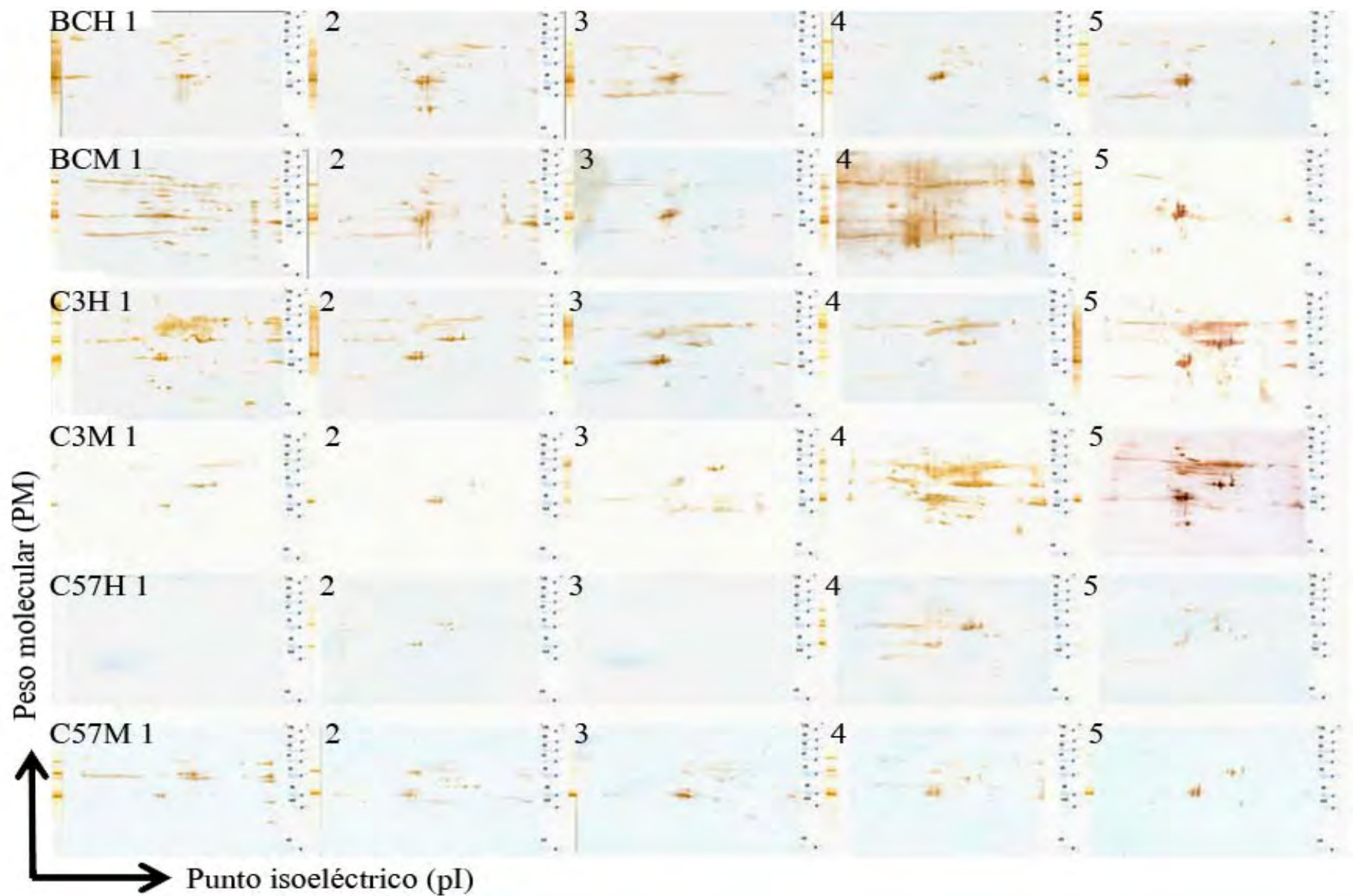


Figura 4. Imágenes de los 2D-IgG inmunoblots de los 30 ratones. Las imágenes se agrupan por cepas (BC: Balb/cAnN; C3H: C3HeB/FeJ; C57: C57BL/6) y por sexo (filas, H: hembras; M: machos). Visualmente son apreciables las similitudes y diferencias entre las imágenes.

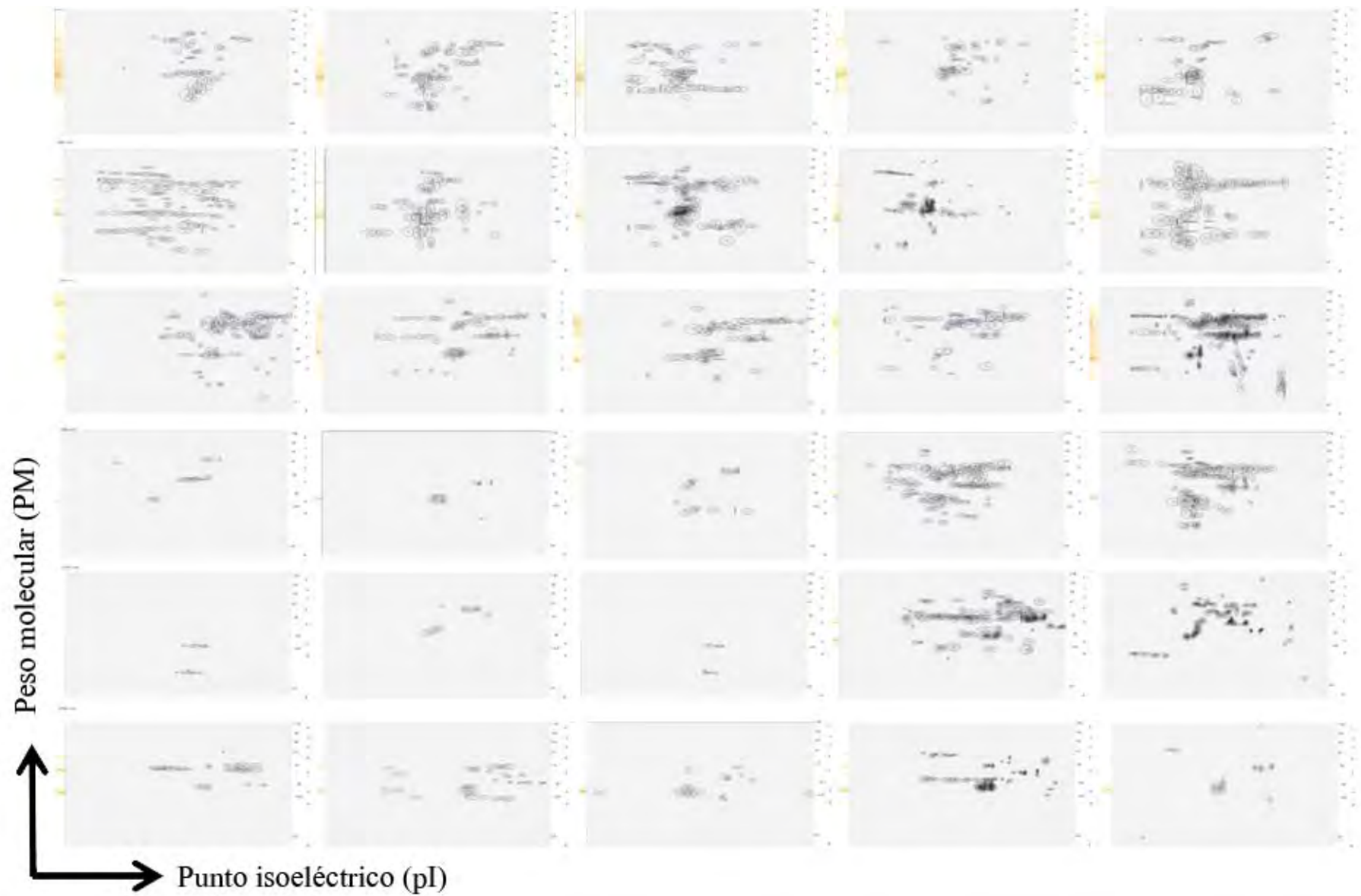


Figura 5. Imágenes de los treinta 2D-IgG inmunoblots de la figura 4 procesadas por PdQuest. Las elipses corresponden al área de los spots y las cruces al centro de los mismos.

En la tabla 1 se muestran los datos de  $\Sigma$  de spots y  $\Sigma$  de parásitos (carga parasitaria) para cada ratón de las tres cepas. Se puede observar que las hembras tienen mayores cargas parasitarias que los machos en todos los casos y que la cepa Balb/cAnN tiene mayores cargas parasitarias que las otras dos cepas tanto en hembras como en machos. También se puede observar que los individuos de una misma cepa y de un mismo sexo muestran variaciones tanto en cargas parasitarias como en número de spots, indicando que el efecto de individuo en la variación también es importante.

Cepa \ Sexo	Ind	Hembras		Ind	Machos	
		$\Sigma$ parásitos	$\Sigma$ spots		$\Sigma$ parásitos	$\Sigma$ spots
BalbC/AnN (susceptible)	1	300	51	6	50	101
	2	200	68	7	180	75
	3	500	66	8	0	78
	4	260	45	9	100	70
	5	200	63	10	8	77
Promedio		292	59		68	80
Desv. Est.		124	10		74	12
C3HeB/FeJ (resistencia media)	11	11	85	16	2	13
	12	0	67	17	5	14
	13	4	59	18	13	17
	14	20	68	19	3	104
	15	11	135	20	0	91
Promedio		9	83		5	48
Desv. Est.		8	31		5	46
C57BL/6J (resistente)	21	0	13	26	10	25
	22	0	10	27	0	37
	23	0	10	28	1	17
	24	26	89	29	16	49
	25	13	61	30	14	15
Promedio		8	37		8	29
Desv. Est.		12	36		7	14

Tabla 1. Resumen de los resultados numéricos obtenidos después del análisis de los 2D inmunoblots de antígenos de *Taenia crassiceps*. Carga parasitaria ( $\Sigma$  parásitos) y  $\Sigma$  de spots (número de spots en los 2D-IgG inmunoblots), promedio y desviación estándar (Desv. Est.) de los 30 ratones infectados (Ind: individuos) experimentalmente después de 30 días de infección.

Para determinar el efecto de la cepa y del sexo sobre la carga parasitaria y número de spots se realizó una prueba de ANOVA multivariada. El resultado de esta prueba se muestra en la tabla 2.

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significancia
Modelo corregido	cargas	323977.900(a)	5	64795.580	18.406	.000
	bandas	12523.367(b)	5	2504.673	3.130	.026
Intersección	cargas	126360.300	1	126360.300	35.894	.000
	bandas	93297.633	1	93297.633	116.573	.000
cepa	cargas	198036.200	2	99018.100	28.127	.000
	bandas	8134.467	2	4067.233	5.082	.014
sexo	cargas	43548.300	1	43548.300	12.370	.002
	bandas	381.633	1	381.633	.477	.496
cepa * sexo	cargas	82393.400	2	41196.700	11.702	.000
	bandas	4007.267	2	2003.633	2.503	.103
Error	cargas	84488.800	24	3520.367		
	bandas	19208.000	24	800.333		
Total	cargas	534827.000	30			
	bandas	125029.000	30			
Total corregida	cargas	408466.700	29			
	bandas	31731.367	29			

a R cuadrado = .793 (R cuadrado corregida = .750)

b R cuadrado = .395 (R cuadrado corregida = .269)

Tabla 2. Efecto de la cepa y sexo de los ratones sobre la carga parasitaria y el número de spots en los 2D-IgG inmunoblots. En la tabla se muestra el resultado de la prueba de ANOVA multivariado de las variables dependientes: carga parasitaria (cargas) y número de spots (bandas) y las variables independientes: cepa y sexo.

El ANOVA mostró que tanto la carga parasitaria como el número de spots varían por efecto del fondo genético del ratón ( $p=0.000$  y  $p=0.014$ ) mientras que el sexo sólo afecta las cargas parasitarias ( $p=0.002$ ).

El ANOVA se realizó nuevamente pero utilizando en esta ocasión como variables los spots compartidos (spots presentes en más de un 2D-IgG inmunoblot) y los spots únicos (spots presentes en sólo un 2D-IgG inmunoblot) (tabla 3).

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	spots.compartidos	2275.867 <sup>a</sup>	5	455.173	1.596	.199
	spots.unicos	4653.500 <sup>b</sup>	5	930.700	5.814	.001
	spots.totales	12523.367 <sup>c</sup>	5	2504.673	3.130	.026
	CARGA	323977.900 <sup>d</sup>	5	64795.580	18.406	.000
Intersección	spots.compartidos	27482.133	1	27482.133	96.372	.000
	spots.unicos	19507.500	1	19507.500	121.858	.000
	spots.totales	93297.633	1	93297.633	116.573	.000
	CARGA	126360.300	1	126360.300	35.894	.000
CEPA	spots.compartidos	2006.467	2	1003.233	3.518	.046
	spots.unicos	2089.400	2	1044.700	6.526	.005
	spots.totales	8134.467	2	4067.233	5.082	.014
	CARGA	198036.200	2	99018.100	28.127	.000
SEXO	spots.compartidos	58.800	1	58.800	.206	.654
	spots.unicos	140.833	1	140.833	.880	.358
	spots.totales	381.633	1	381.633	.477	.496
	CARGA	43548.300	1	43548.300	12.370	.002
CEPA * SEXO	spots.compartidos	210.600	2	105.300	.369	.695
	spots.unicos	2423.267	2	1211.633	7.569	.003
	spots.totales	4007.267	2	2003.633	2.503	.103
	CARGA	82393.400	2	41196.700	11.702	.000
Error	spots.compartidos	6844.000	24	285.167		
	spots.unicos	3842.000	24	160.083		
	spots.totales	19208.000	24	800.333		
	CARGA	84488.800	24	3520.367		
Total	spots.compartidos	36602.000	30			
	spots.unicos	28003.000	30			
	spots.totales	125029.000	30			
	CARGA	534827.000	30			
Total corregida	spots.compartidos	9119.867	29			
	spots.unicos	8495.500	29			
	spots.totales	31731.367	29			
	CARGA	408466.700	29			

a. R cuadrado = .250 (R cuadrado corregida = .093)

b. R cuadrado = .548 (R cuadrado corregida = .454)

c. R cuadrado = .395 (R cuadrado corregida = .269)

d. R cuadrado = .793 (R cuadrado corregida = .750)

Tabla 3. Efecto de la cepa y el sexo de los ratones sobre el número de spots totales, únicos y compartidos entre los 2D-IgG inmunoblots. En la tabla se muestra el resultado de la prueba de ANOVA multivariado de las variables dependientes: carga parasitaria (CARGA), spots.compartidos, spots.unicos y spots.totales y las variables independientes: cepa y sexo.

Los resultados fueron similares al ANOVA anterior: independientemente de las características de los spots (compartidos, únicos o totales), el número de spots se asoció significativamente a la variable cepa en todos los casos, pero no así a la variable sexo.

Dada la diversidad encontrada en los 2D-IgG inmunoblots, el siguiente paso fue explorar las fuentes de la misma, para lo cual se ideó un método de análisis de los 2D-IgG inmunoblots que permitiera obtener más información de los mismos, además de permitir encontrar spots relacionados con variables, como susceptibilidad, sexo o carga parasitaria.

Para esto, cada una de las imágenes de 2D-IgG inmunoblots fue dividida por una cuadrícula equidistante de 10x10, generando de esta manera 100 casillas en cada imagen. Con este procedimiento, los spots dentro de cada una de las casillas quedan agrupados. Las casillas ocupadas por spots fueron identificadas: de 3000 casillas (100 casillas por imagen \* 30 imágenes) sólo 490 se encuentran ocupadas por al menos un spot. Agrupando las imágenes entre sí se obtuvo que de las 100 casillas posibles, 77 se encuentran ocupadas por al menos un spot en al menos una imagen.

Utilizando a cada una de las 77 casillas ocupadas como variables, se determinó mediante una prueba  $\chi^2$  la relación que pudiera existir entre cada una de ellas y la carga parasitaria (dividida en tres niveles: baja o <11 parásitos; media o  $\geq 11$  y <50 parásitos; y alta o  $\geq 50$  parásitos) con el objetivo de encontrar antígenos relacionados con la resistencia o la susceptibilidad a la infección. No se encontró una correlación significativa de alguna casilla con la carga parasitaria



baja que pudiera apuntar a antígenos protectores. La mayoría de las casillas se ubican en la intersección de las tres categorías de carga (Fig 6).

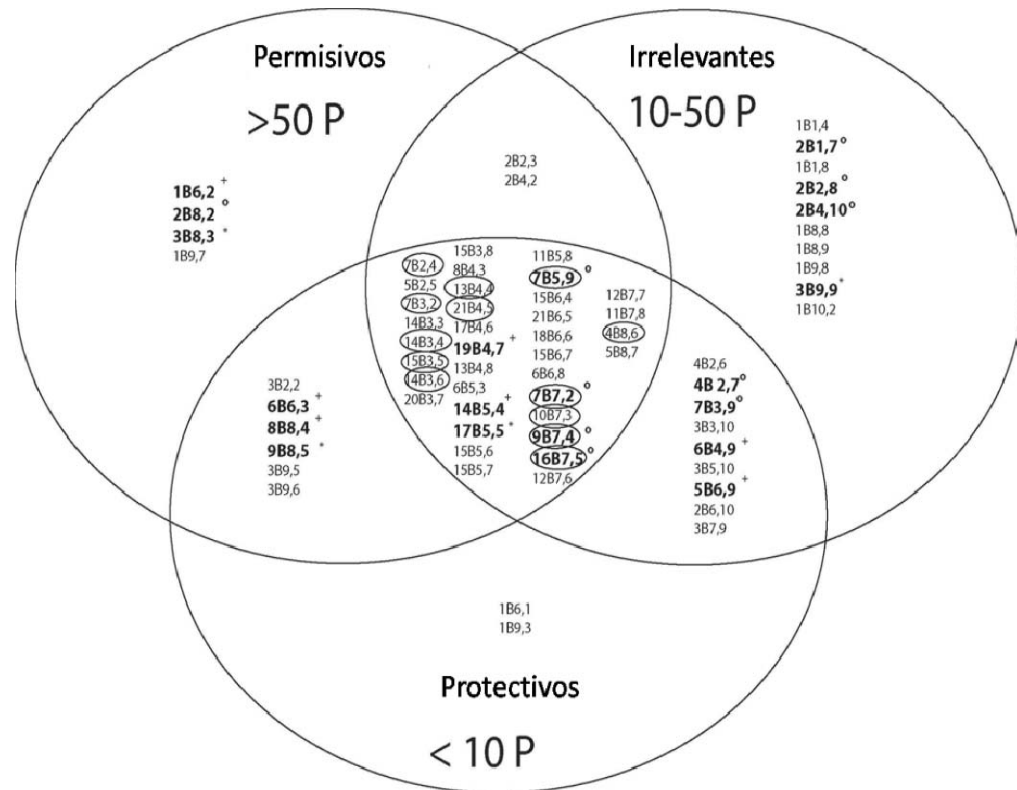


Figura 6. Asociación de las casillas con la carga parasitaria. Diagrama de Venn donde se muestran las casillas que correlacionaron con cada nivel de carga parasitaria. En círculos están las casillas altamente correlacionadas ( $p < 0.01$ ). [\*:  $p = < 0.05$ ; +:  $p = > 0.05$  y  $< 0.1$ ; °  $p = > 0.1$  y  $< 0.2$ ].

Para determinar la validez de asumir que las casillas son variables de respuesta independiente se realizó una correlación entre las 77 casillas con al menos un spot. De las 5925 correlaciones, 604 fueron significativas ( $p < 0.05$ ) de las cuales 18 fueron negativas y el resto positivas. Trescientos dos casillas resultaron muy significativas ( $p < 0.01$ ; 9 negativas y 293 positivas). La mayoría de las casillas que correlacionaron se encuentran en la región central de los 2D-IgG inmunoblots (69.5%), donde también se localiza la mayoría de los spots (84%; MW = 11.3-59.0 kDa and pI = 4.2-7.0).

La representación física de las correlaciones entre casillas dio como resultado una red, con la cual se construyó un modelo (Fig 7 A). Se construyeron además, redes para cada una de las cepas computacionalmente. Se determinó el índice de conectividad para cada una de esas redes (Fig 7 B), determinado como el número de conexiones (correlaciones significativas/2) entre el número de spots.

$$\text{Índice de conectividad} = \frac{\# \text{ de conexiones}}{\text{número de spots}}$$

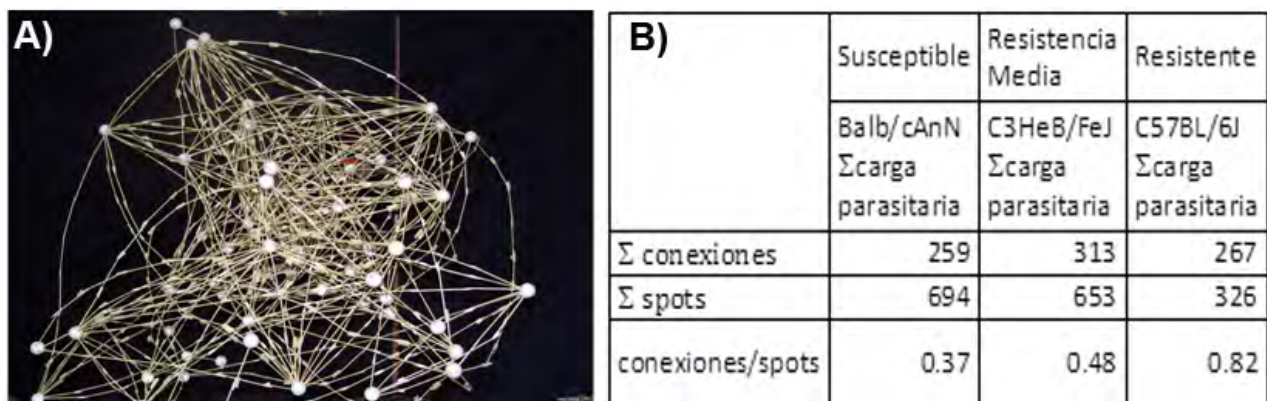


Figura 7. Red e índices de conectividad de las casillas de los 2D-IgG inmunoblots. A) Representación física de la red construida a partir de las casillas que correlacionaron significativamente. Cada bolita blanca representa una casilla y la líneas que las unen las conexiones. B) Tabla donde se presentan los índices de conectividad de las redes construidas para cada cepa.

Los índices de conectividad correlacionaron con el grado de resistencia a la infección de las diferentes cepas de ratones: la cepa de resistencia media y resistente (C3HeB/FeJ y C57BL/6J, respectivamente) tuvieron índices de conectividad mayores que la cepa susceptible (Balb/c).

La distribución del número de conexiones por casilla y el número de casillas con ese número se graficó para saber si seguía una ley de potencia (Fig 8). Se encontró que el 29% de las casillas tienen el 50% de las conexiones.

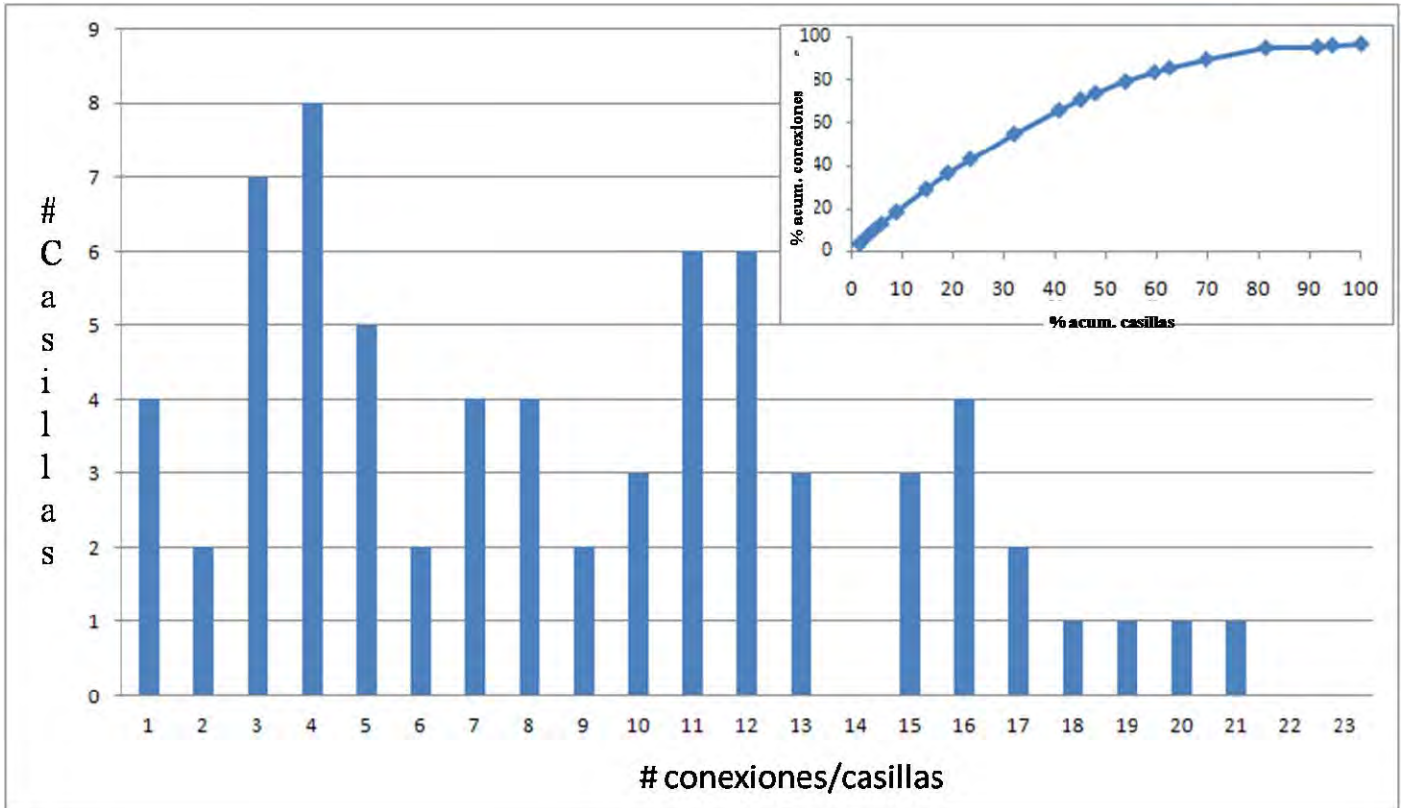


Figura 8. Distribución del número de conexiones por casilla y el número de casillas. En el eje de las x se encuentra el #conexiones/casillas y en el eje de las y el # de casillas con ese número. La gráfica del lado superior derecho relaciona la frecuencia acumulada de casillas positivas con la frecuencia acumulada de conexiones. En esta última gráfica se puede observar que el 29% de las casillas agrupan el 50% de las conexiones.

Calculando los porcentajes de similitud entre las imágenes de los ratones se observó que las cepas más resistentes (C3HeB/FeJ y C57BL/6J) son las que tienen las imágenes más parecidas y por ende se agrupan más cercanamente en un fenograma (figura 9).

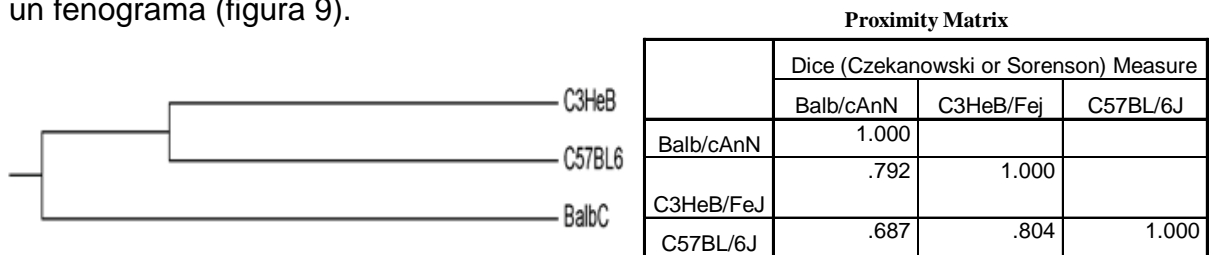


Figura 9. Similitud de los 2D-IgG-inmunoblots de tres cepas de ratones. Izquierda: Fenograma construido a partir de la matriz de similitud (derecha) donde se muestra las cepas cuyos 2D-IgG inmunoblots fueron más similares. Un valor de 1 representa que son idénticas las imágenes.

Ahondando en el análisis se exploraron los spots individuales de los 2D-IgG inmunoblots. Se encontró un total de 1673 spots (suma del número de spots de las 30 imágenes), de los cuales 1132 fueron spots con diferentes coordenadas, o spots distintos. Setecientos setenta y cinco spots son spots únicos, es decir, que se encuentran solamente en una imagen de los 30 2D-IgG inmunoblots (Figura 4). Varios spots se encontraron en más de una imagen: 243 en dos, 90 en tres, 22 en cuatro, nueve en cinco, dos en seis y uno en siete imágenes, siendo este último el spot más compartido entre ellas. Esto representa el número de sueros que reconocieron esos spots en particular (fig 10).

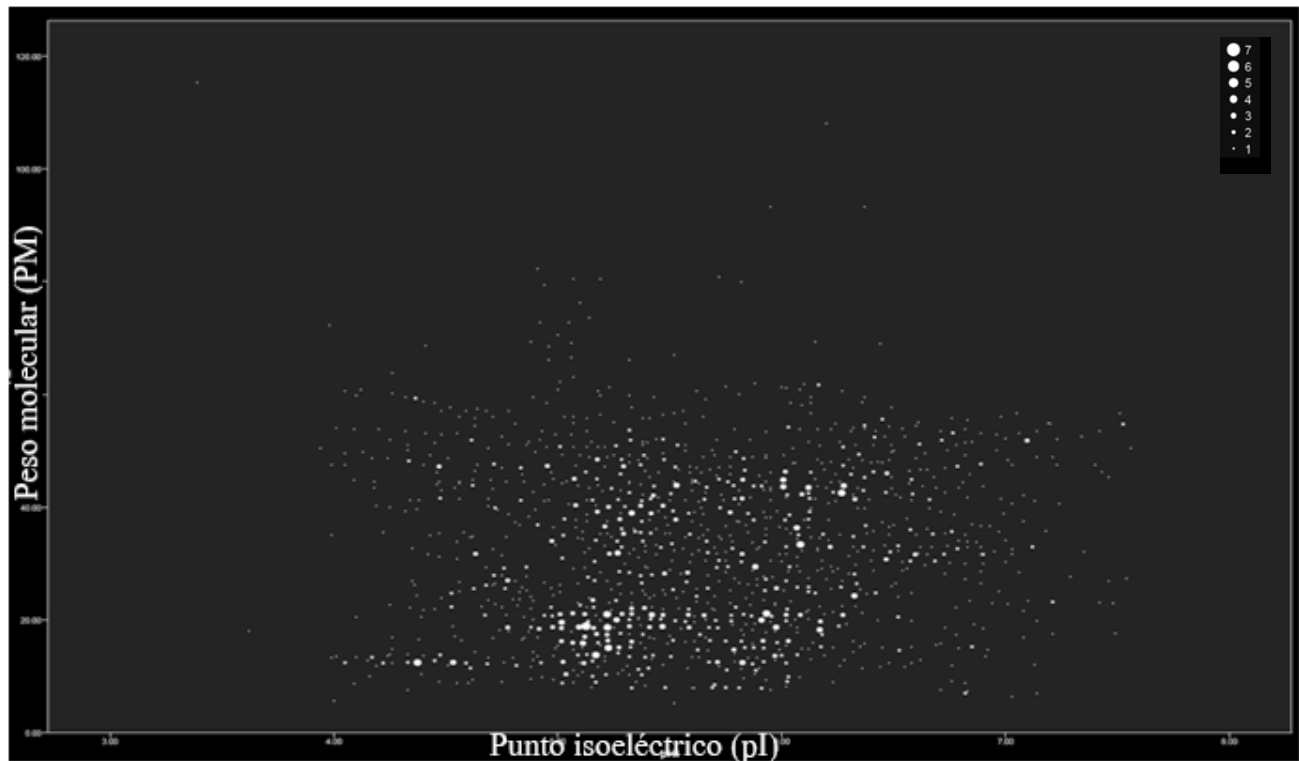


Fig 10. Todos los spots identificados mediante sus coordenadas de peso molecular y punto isoeléctrico. En la gráfica se representan todos los spots encontrados, asemejando un firmamento. El tamaño de cada spot representa en número de sueros de diferentes ratones que lo reconocieron, de acuerdo a la escala (de 1 a 7). Eje X: Punto isoeléctrico. Eje Y: Peso Molecular (kDa).

La identificación de estos spots permitió determinar el número mínimo de spots necesarios para detectar a los 30 ratones infectados, que es de nueve spots diferentes. En la figura 11 se muestra el número de spots y el porcentaje de individuos que pueden ser identificados con ese número.

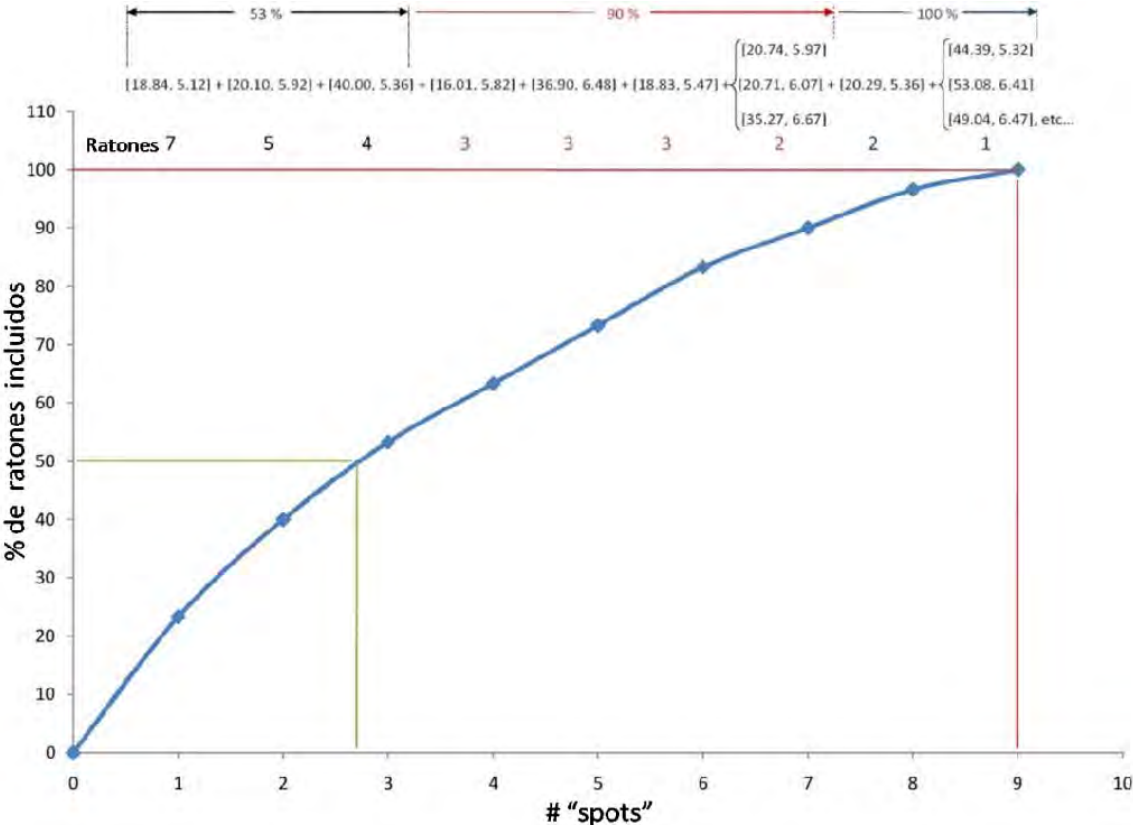


Figura 11. Gráfica de frecuencia acumulada. En la gráfica se muestra el número de spots y el porcentaje de individuos que pueden ser incluidos con ese número. En la parte superior se muestra el mínimo número de spots necesarios para detectar a todos los individuos y las coordenadas de los mismos, así como el número de individuos que se incluyen al ir agregando cada uno [PM, pl].

Existen además spots que sólo se comparten entre los miembros de una misma cepa siendo spots que sólo los sueros de esos individuos reconocieron. La distribución de los spots compartidos entre cepas o intra cepas se muestra en la figura 12.

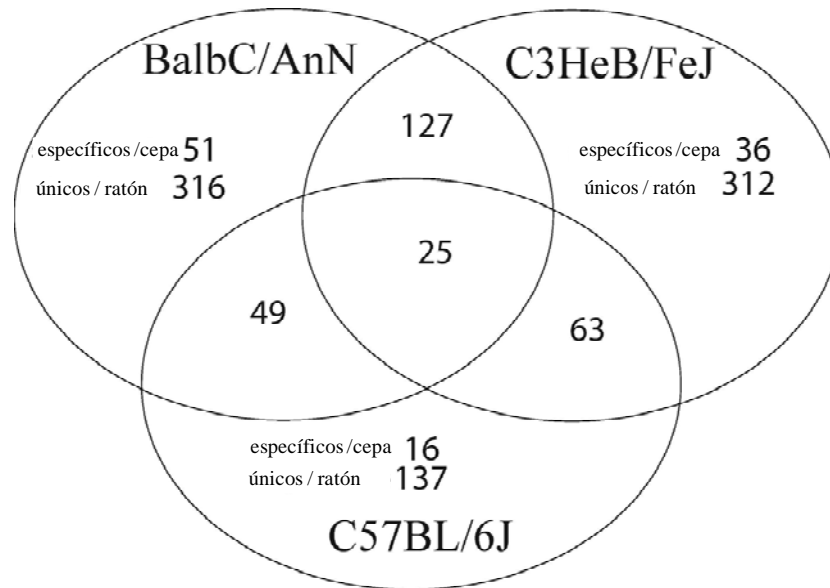


Fig 12. Número de spots compartidos entre cepas. En el diagrama de Venn se muestra el número de spots que comparten sólo miembros de una misma cepa (específicos/cepa), los spots que fueron reconocidos por sólo un individuo (únicos/ratón) y los compartidos entre cepas (intersecciones de los círculos).

El método de análisis de imágenes en 2-Dimensiones desarrollado en el modelo de cisticercosis murina fue después aplicado al problema de la cisticercosis porcina por *Taenia solium*.

## **2. Electroforesis bidimensional de antígenos de *Taenia solium***

Las proteínas del pool de LV de cisticercos obtenidos de once cerdos naturalmente infectados fueron separadas en 2-Dimensiones y transferidas a membranas para realizar el Western Blot con el suero de los cerdos correspondientes. Los experimentos fueron realizados por duplicado o triplicado y sólo aquellos spots presentes en las réplicas fueron considerados para análisis posteriores. Las imágenes fueron analizadas con PdQuest para la detección de spots como previamente se ha indicado en materiales y métodos (anexo III) y del análisis de las réplicas de cada imagen se obtuvo una imagen maestra que comprende los spots presentes en las réplicas. Primeramente se analizaron los spots de proteína en las membranas teñidas reversiblemente previamente a la realización del Western Blot. Las imágenes maestras de los LV de los cisticercos de los nueve cerdos se muestran en la figura 13.

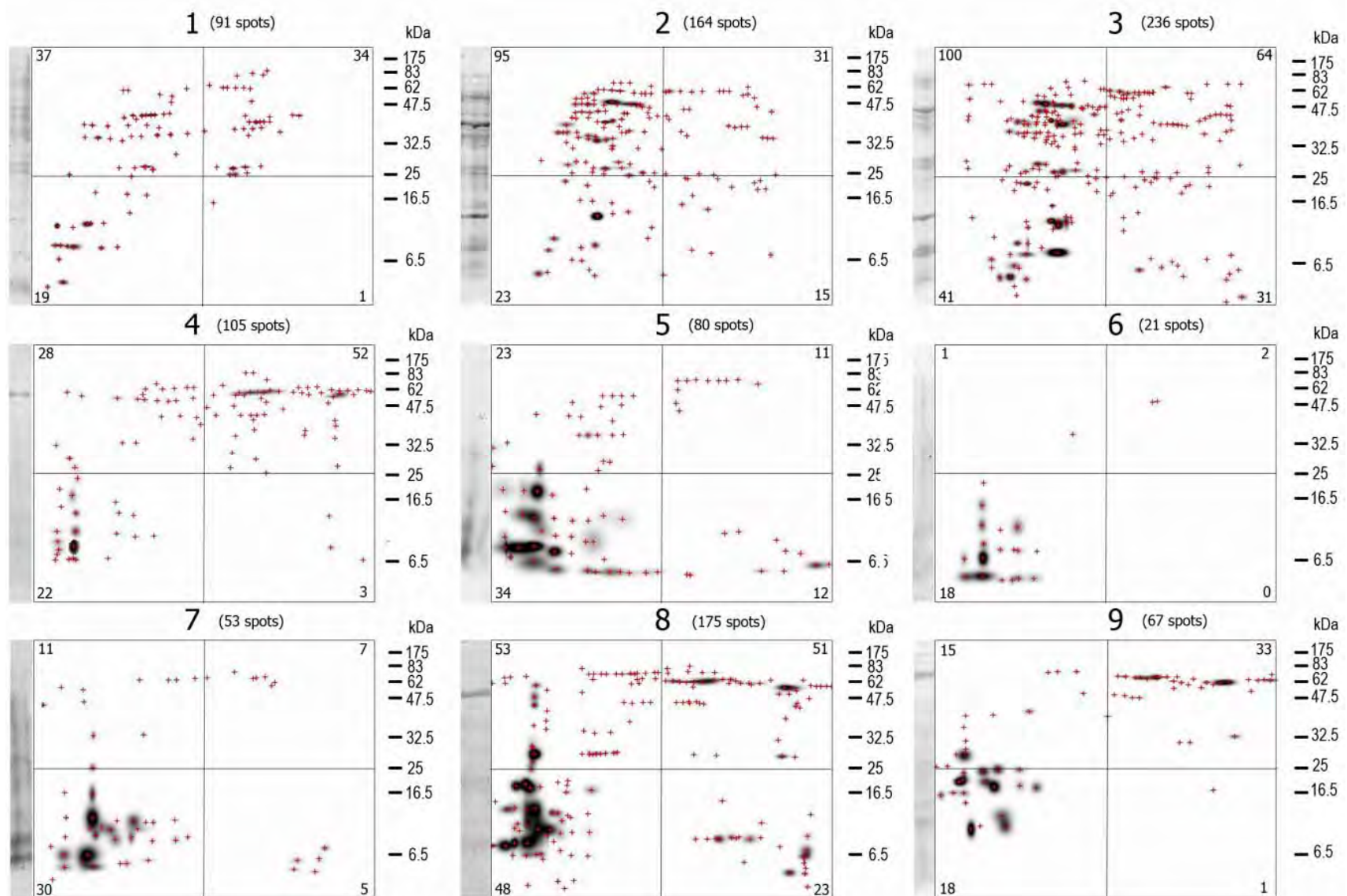


Figura 13. Imágenes de las proteínas de cisticercos obtenidos de cerdos diferentes, separadas mediante electroforesis bidimensional. Las imágenes procesadas por PdQuest o imágenes maestras de nueve pools de LV de cisticercos de cerdos naturalmente infectados separadas mediante electroforesis bidimensional se muestran en esta figura. Cada imagen corresponde a las proteínas del LV de los cisticercos obtenidos de un cerdo distinto y cada cruz representa un spot individual. Las imágenes maestras se dividen en cuatro partes, los números en las esquinas de cada cuadrante constituye el número de spots dentro del mismo. El número total de spots ( $\Sigma$  spots de proteína) está indicado en la parte superior de cada imagen. La primera línea de cada imagen corresponde a las proteínas separadas en 1-Dimensión.



En la figura 13 es fácil observar las similitudes y diferencias entre las imágenes. Visualmente se observan spots que se comparten entre varias de las imágenes así como spots que no se comparten con alguna otra imagen (por ejemplo, los spots del lado inferior izquierdo parecen compartirse entre varias de las imágenes, mientras que algunos de los spots del centro y parte inferior izquierda de algunas imágenes es claro que son únicos de las mismas). Ninguna imagen es igual a otra, ni en el número de spots ni en la posición de los mismos denotando la diversidad que existe en los contenidos proteicos de los LV de cisticercos provenientes de diferentes cerdos.

Al realizar el Western Blot con los sueros correspondientes al cerdo del cual provinieron los cisticercos la diversidad se conserva, como se puede observar en la figura 14.

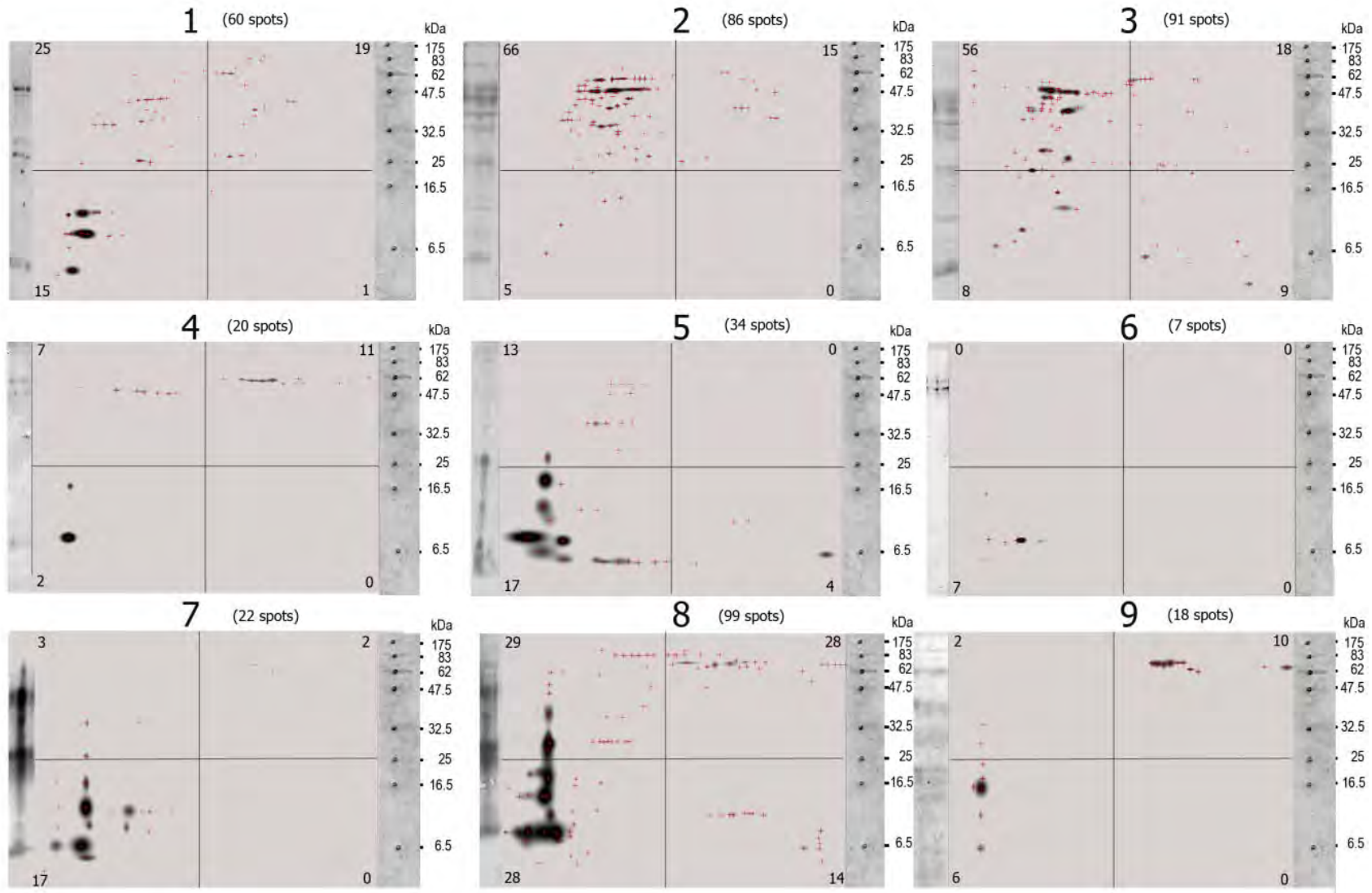


Fig 14. Imágenes de los 2D-IgG inmunoblots obtenidas después de hacer reaccionar las proteínas mostradas en la figura 13 con el suero correspondiente del cerdo del cual provinieron los parásitos. Las imágenes maestras de los 2D-IgG inmunoblots obtenidas después del procesamiento con PdQuest se muestran aquí. Las imágenes se encuentran divididas en cuadrantes, en las esquinas de cada uno se indica el número de spots antigénicos que contienen ( $\Sigma$  spots antigénicos). El número total de spots se indica en la parte superior de cada imagen. Las cruces representan spots individuales. La primera línea de cada imagen corresponde al Western Blot de los antígenos separados en una dimensión. El número mostrado en la parte superior de cada imagen (1 al 9) es el número con el cual se identificó a cada cerdo diferente en el presente estudio.

El análisis visual de los 2D-IgG inmunoblots es suficiente para notar claramente que ninguno es igual a otro, y que las diferencias entre ellos son grandes, aunque algunos spots (complejos antígeno-anticuerpo IgG) parecen estar presentes en más de una imagen (por ejemplo: los spots del lado inferior izquierdo de las imágenes). Asimismo, después de analizar el número de spots antigénicos presentes en cada imagen, se puede notar que ningún 2D-IgG inmunoblot tiene el mismo número de spots antigénicos que otro. Para determinar si las diferencias en el número de spots podrían ser debido al sexo del huésped, un ANOVA univariado fue realizado (Tabla 4).

Pruebas de los efectos inter-sujetos  
Variable Dependiente:  $\Sigma$  spots antigénicos

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4102.865a	1	4102.865	4.655	.068
Intercept	24556.198	1	24556.198	27.862	.001
Sexo	4102.865	1	4102.865	4.655	.068
Error	6169.357	7	881.337		
Total	31491.000	9			
Corrected Total	10272.222	8			

a. R Squared = .399 (Adjusted R Squared = .314)

Tabla 4. ANOVA univariado. En la tabla se muestra el resultado del ANOVA univariado entre la variable dependiente:  $\Sigma$  spots antigénicos y la variable independiente: sexo.

El análisis de ANOVA reveló que la  $\Sigma$  de spots antigénicos no se asoció al sexo de los cerdos ( $p=0.068$ ), siendo la diversidad de las imágenes atribuible a los individuos. Comparando las imágenes entre sí, no se encontró un solo spot antigénico que fuera reconocido por las IgGs de los sueros de los nueve cerdos, como más adelante se discute.

Para poder analizar con más detalle esta diversidad encontrada en los 2D-IgG inmunoblots y calcular el tamaño de la misma, las imágenes maestras fueron divididas en cien casillas mediante una cuadrícula de 10x10. Como ocurrió para  $\Sigma$  spots antigénicos, ninguno de los 2D-IgG inmunoblots tuvo el mismo número de casillas positivas (casillas con al menos un spot, tabla 5), ni el mismo patrón de casillas positivas.

Cerdo	Sexo	Características	Edad (años)	Nivel de infección	Origen	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína en LV	$\Sigma$ spots proteína	$\Sigma$ spots antigénicos	Casillas positivas proteínas	Casillas positivas en inmunoblots	Varianza proteínas 2-D	Varianza 2D-IgG inmunoblots
1	♀	Gestante (8 semanas), muy agresiva	1	Poco infectado	Morelos	2.471	91	60	36	28	158.9	89.7
2	♂	-----	2	Moderadamente infectado	Morelos	9.788	164	86	44	27	408.9	259.5
3	♂	-----	1.5	Moderadamente infectado	Morelos	10.035	236	91	56	37	801.8	294.5
4	♀	No gestante	2	Moderadamente infectado	Morelos	2.23	105	20	38	11	167.3	47.5
5	♀	Bien alimentada, 2 meses de haber parido Estado moderado de malnutrición	1	Poco infectado	Morelos	1.63	80	34	35	20	118.7	57.9
6	♀	-----	1	Muy infectado	Morelos	2.984	21	7	13	5	200.5	64.5
7	♀	-----	2	Moderadamente infectado	Guerrero	5.887	53	22	31	17	166.5	61.0
8	♀	Castrada	3	Moderadamente infectado	Morelos	3.92	175	99	52	35	349.0	248.5
9	♀	No gestante	2	Moderadamente infectado	Morelos	3.841	67	18	30	10	173.5	62.4

Tabla 5. Características de los nueve cerdos infectados. En la tabla se muestran las características de los cerdos naturalmente infectados utilizados en este estudio (sexo, edad, nivel de infección, origen), el contenido de proteína de los cisticercos aislados de cada cerdo y características de los inmunoblots: el número de spots de proteína y de spots antigénicos, el número de casillas positivas y la varianza calculada para las imágenes.

El 2D-IgG inmunoblot del cerdo seis fue el que tuvo menor número de casillas positivas con cinco casillas, mientras que el del cerdo tres presentó el mayor número de casillas positivas con 37. Incluyendo las 100 casillas de los

nueve cerdos, 87 de las 100 casillas fueron positivas en las imágenes de proteína en 2D de las cuales 68 fueron positivas en los 2D-IgG inmunoblots representando el 87% ( $68/87=78\%$ ). Así como no se encontró un spot que estuviera presente en todos los 2D-IgG inmunoblots, tampoco se encontró una casilla positiva en los nueve, aunque se encontró una casilla positiva en ocho de los nueve 2D-IgG inmunoblots. Esa casilla, positiva en las nueve imágenes de proteína en 2D, contuvo 13 spots de proteína distintos entre un rango de 7.65-8.21 de pI y 5.79-8.59 de peso molecular. De esos 13 spots, nueve fueron reconocidos por al menos uno de los nueve sueros, de los cuales sólo cinco fueron reconocidos por más de un suero aunque ninguno por los ocho sueros que resultaron positivos para esa casilla en los 2D-IgG inmunoblots. El spot dentro de esta casilla que fue más frecuentemente reconocido fue por cuatro de los ocho sueros. Hubo trece casillas más que fueron positivas en más del 50% de los 2D-IgG inmunoblots: dos casillas fueron positivas en siete de los nueve 2D-IgG inmunoblots (Casilla 72: 7.65-8.21 pI y 8.59-12.75 kDa PM; Casilla 81: 8.21-8.78 pI y 7.79-8.59 kDa PM) pero, como en el caso anterior, de los spots dentro de estas casillas ninguno fue reconocido por los siete sueros. El spot más frecuentemente reconocido se encontró en la casilla 72, el cual fue reconocido por cinco sueros (7.94 pI, 10.68 kDa PM). Es importante notar que 24 casillas (24%) fueron positivas por un solo suero, lo cual representa antígenos que son reconocidos por cerdos individuales.

Para observar más claramente las zonas de las imágenes de proteína en 2D y de los 2D-IgG inmunoblots donde más se concentran los spots se realizó un diagrama, el cual se muestra en la figura 15.

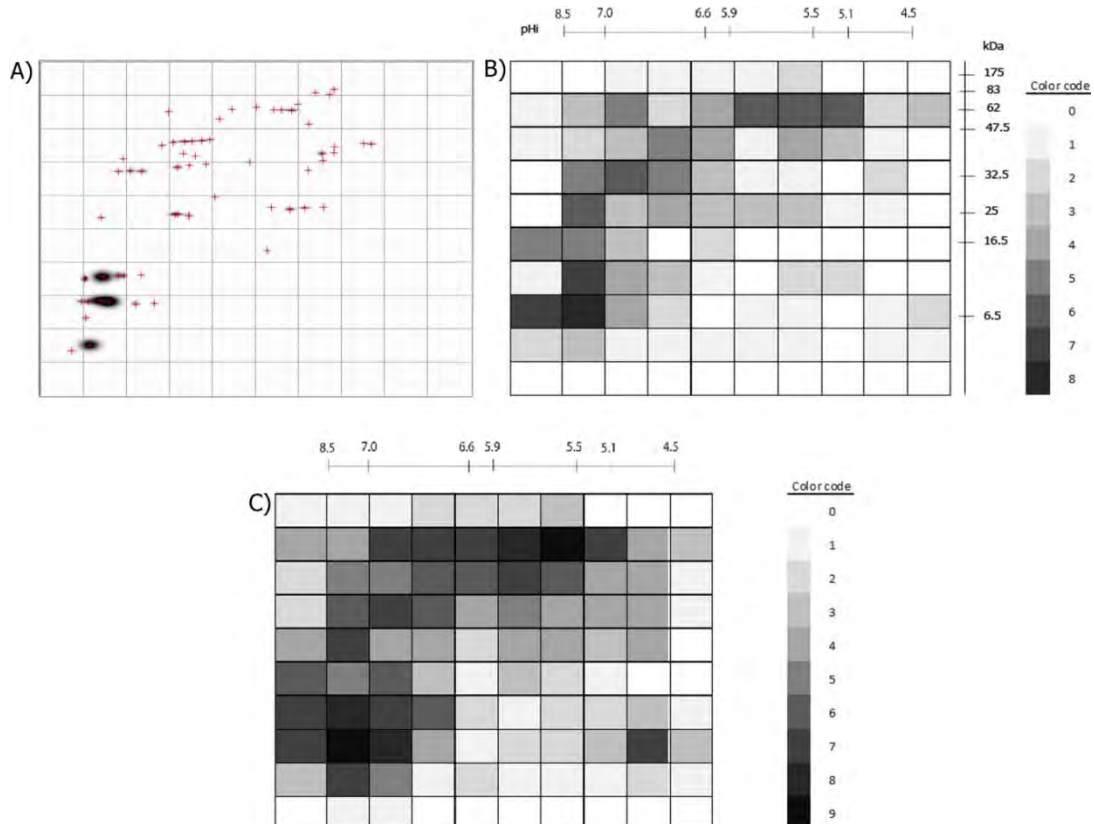


Figura15. División de las imágenes en 2D mediante una cuadrícula de 10x10. A) Ejemplo de un inmunoblots procesado dividido por una cuadrícula de 10x10. B) Las 100 casillas generadas para los 2D-IgG inmunoblots se muestran aquí. Las casillas positivas están coloreadas con diferentes intensidades de acuerdo al número de sueros que las reconocieron. El código de color se muestra a la derecha de la imagen. C) Casillas positivas en las imágenes de proteínas en 2D. Al igual que para los 2D-IgG inmunoblots, las intensidades de color de cada casilla representan el número de imágenes en las cuales fueron positivas, de acuerdo al código de color al lado de la imagen.

En la figura anterior se puede notar que las zonas más oscuras en B) corresponden a las zonas más oscuras en C). También es fácil observar que hay casillas coloreadas en C) que no lo están en B) ya que no todas las proteínas fueron reconocidas por los sueros.

Para poder detectar serológicamente a los nueve cerdos involucrados en este trabajo sería necesario incluir al menos dos casillas positivas (Casilla 82: 7.65 – 8.21 pI y 5.79 – 8.59 KDa PM; y cualquier otra de estas 10 casillas: 22,23,26-30,34,61 y 81 [por ejemplo casilla 81: 8.21 – 8.78 pI y 5.79 – 8.59 KDa PM]) o incluir al menos cinco spots diferentes (8.13 pI, 8.03 kDa PM; 7.85 pI, 8.03 kDa PM; 8.15 pI, 6.64 kDa PM; 7.99 pI, 5.95 kDa PM; 8.31 pI, 7.81 kDa PM).

La división de las imágenes de proteína en 2D y de los 2D-IgG inmunoblots mediante una cuadrícula de 10x10 permitió la estimación de las similitudes de las imágenes de los nueve LV tomando en cuenta la posición en la que los spots se encuentran en las imágenes. Para este propósito se construyó una matriz de similitud utilizando la información de la base de datos de casillas positivas y negativas. Esta matriz mostró que las imágenes de proteína en 2D se parecen entre un 28% y 80%, siendo diferentes en 20% a 72% (figura 16 A). Los 2D-IgG inmunoblots son parecidos en 6.3% a 65.6% o diferentes de 34.4% a 93.7% (figura 17 A)). Esto revela la gran diversidad de las imágenes obtenidas y a la vez permite estimar el tamaño de esa diversidad. Los 2D-IgG inmunoblots que más se parecen son los correspondientes a los cerdos #2 y #3 los cuales se parecen en 65.6%, y los menos parecidos y más diferentes son los correspondientes a los cerdos #2 y #6, los cuales sólo se parecen en 6.3%. Estos valores correlacionan con los porcentajes de similitud más altos y más bajos en las imágenes de proteína en 2D. Se construyeron fenogramas para observar más claramente las imágenes más parecidas y más diferentes entre sí (Figuras 16 y 17 B)).

2D-proteins	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	75	71.74	62.16	56.34	36.73	47.76	54.55	46.15
2		100	80	58.54	50.63	28.07	40.00	52.08	49.32
3			100	65.96	54.95	28.99	55.17	61.11	54.12
4				100	57.53	31.37	40.58	60.00	50.75
5					100	41.67	57.58	59.77	50.00
6						100	40.91	30.77	47.62
7							100	55.42	50.00
8								100	59.26
9									100

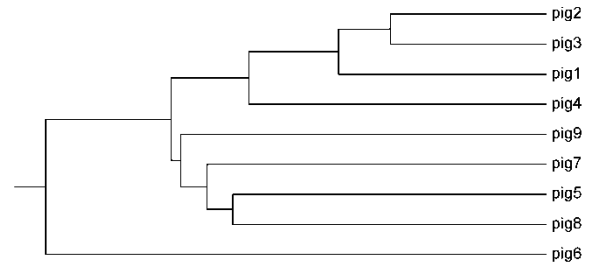


Figura 16. Similitud de las imágenes de proteínas separadas en 2-Dimensiones *Taenia solium*. A) Matriz de similitud calculada para las nueve imágenes de proteínas en 2D. Los valores corresponden a los porcentajes de similitud B) Fenograma construido con la información de la matriz de similitud. Las imágenes de proteína en 2D de los nueve cerdos fueron agrupadas de acuerdo a su parecido.

**A)**

2D-immunoblots	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	65.5	55.4	25.6	45.8	24.2	44.4	54	31.6
2		100	65.6	31.6	34	6.3	31.8	45.2	32.4
3			100	29.2	28.1	9.5	29.6	41.7	29.8
4				100	12.9	25	28.6	43.5	47.6
5					100	24	43.2	47.3	33.3
6						100	36.4	20	26.7
7							100	46.2	51.9
8								100	44.4
9									100

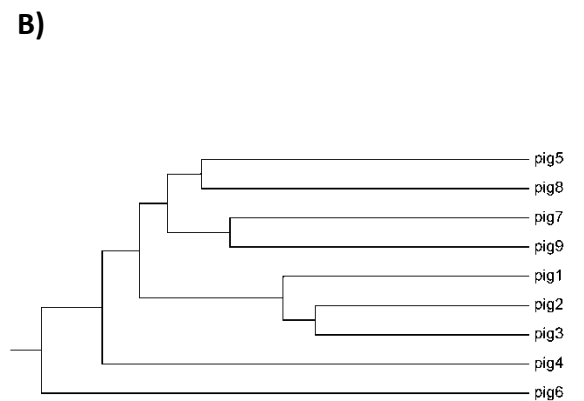


Figura 17. Similitud de los 2D-IgG inmunoblots de *Taenia solium*. A) Matriz de similitud calculada para los nueve 2D-IgG inmunoblots. Los valores corresponden a los porcentajes de similitud. B) Fenograma construido con la información de la matriz de similitud. Los 2D-IgG inmunoblots de los nueve cerdos fueron agrupados de acuerdo a su parecido

En las figuras anteriores (figura 16 y 17) se puede observar que tanto para las imágenes de proteína en 2D como para los 2D-IgG inmunoblots, las imágenes más parecidas entre sí también fueron las que se agruparon más cercanamente en los fenogramas. Si se comparan los porcentajes de similitud de la matriz de proteínas 2D con la de los 2D-IgG inmunoblots, en la gran mayoría de los casos las imágenes se parecen más entre sí en proteínas que en inmunoblots.



Para evaluar si había casillas que correlacionaran con un sexo en particular se realizó una prueba de  $\chi^2$  entre las 68 casillas positivas de los 2D-IgG inmunoblots con las dos categorías de sexo (machos y hembras). Sólo una casilla correlacionó significativamente con la variable sexo ( $p=0.028$ ). Esta casilla (4-75-5-09 pl y 28.05-41.61 kDa PM) fue positiva sólo en los machos, lo cual apunta a un antígeno (5.05 pl, 39.95 kDa PM) que podría ser reconocido preferencialmente por un sexo sobre otro.

La correlación de las casillas de los 2D-IgG inmunoblots entre sí mostró un total de 4950 correlaciones de las cuales 151 fueron significativas (3.05% - 141 positivas y 2 negativas): 49 (41 positivas y 8 negativas) fueron significativas ( $p<0.05$ ) y 102 (100 positivas y 2 negativas) fueron muy significativas ( $p<0.001$ ).

Las varianzas de las imágenes de proteína en 2D y de los 2D-IgG inmunoblots fueron calculadas comparando cada imagen contra una imagen promedio. Las varianzas de las imágenes de proteína en 2D fueron mayores que las de los 2D-IgG inmunoblots (tabla 5). Sin embargo, en estos experimentos lo que se estudió fue la manera en que huésped reconoce a sus propios parásitos (mediante las IgG), por lo que no es posible determinar si la diversidad de proteínas es mayor que la diversidad de antígenos. Para responder esta pregunta se realizaron experimentos utilizando inmunoblots en una dimensión y haciendo todas las combinatorias posibles de sueros y de LV. La razón de utilizar inmunoblots en una dimensión es que son los más utilizados para el inmunodiagnóstico, además de que permiten de una manera sencilla realizar diversas combinaciones de antígenos parasitarios y sueros de cerdos infectados.

Finalmente para determinar si existían diferencias en los cisticercos colectados de un cerdo, se corrió en 1-Dimensión el LV individual de los quince cisticercos colectados de un mismo cerdo y el pool de los mismos y se realizó un WB con el suero del mismo cerdo, como se muestra en la figura 18.

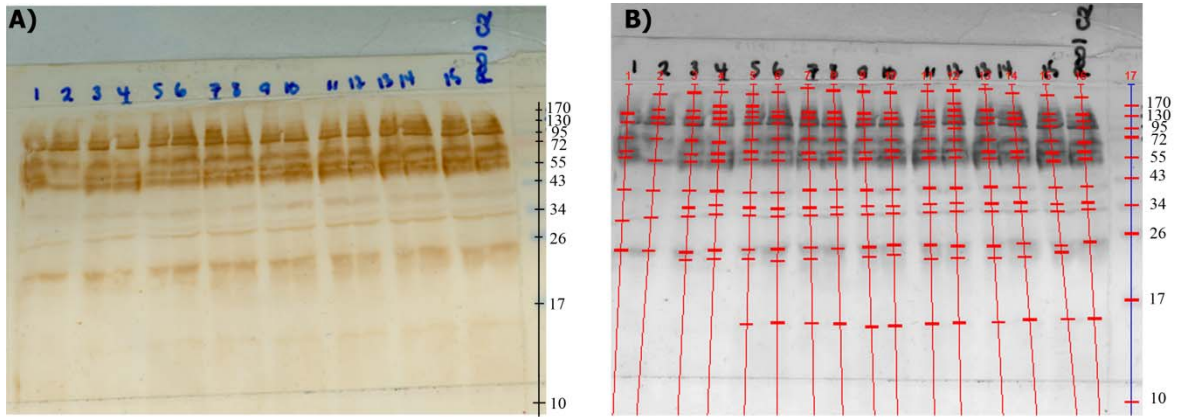


Fig 18. Diferencias entre los cisticercos aislados de un mismo cerdo. Las proteínas de 15 cisticercos diferentes provenientes de un cerdo infectado fueron separadas mediante un gel de acrilamida. A) Las proteínas del LV de los quince cisticercos (del 1 al 15) obtenidos de un solo cerdo infectado naturalmente fueron separadas en una dimensión. Las bandas presentes en la imagen corresponden a las reconocidas por las IgG del suero del cerdo de cual se obtuvieron los cisticercos (cerdo #2). B) Reconocimiento computacional de las bandas mediante el programa QuantityOne donde más claramente se observa la presencia/ausencia de bandas en cada uno de ellos. La última línea de cada imagen corresponde a la mezcla de los LV individuales de los 15 cisticercos (pool C2).

Visualmente, se perciben muy pocas diferencias en el reconocimiento de antígenos parasitarios por las IgG del suero de un cerdo entre cisticercos obtenidos del mismo cerdo (Fig 18 A). El análisis de la imagen mediante QuantityOne revela algunas diferencias (fig 18 B), aunque estas son mínimas comparadas con las diferencias encontradas en los LV de cisticercos de diferentes cerdos.

### 3. Electroforesis unidimensional de antígenos de *Taenia solium*

Los antígenos del líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* obtenidos de once cerdos distintos (tabla 6), todos naturalmente infectados con *T. solium*, fueron limpiados de su contenido de inmunoglobulinas para eliminar la interferencia producto de la reacción del anticuerpo secundario anti IgG de cerdo con inmunoglobulinas del cerdo presentes en el LV de los parásitos en Western Blots en 1-Dimensión. Para determinar si la limpieza de las muestras afectó el patrón de bandeo de las proteínas, se compararon los patrones de bandeo de cada uno de los LV<sub>i</sub> limpios contra esos mismos LV<sub>i</sub> sin limpiar.

Cerdo	Sexo	Fecha	Edad (años)	Nivel de infección	Origen	µg/µL de proteína en LV
1	♀	02-oct-07	1	Poco infectado	Morelos	2.471
2	♂	28-mar-08	2	Moderadamente infectado	Morelos	9.788
3	♂	26-mar-08	1.5	Moderadamente infectado	Morelos	10.035
4	♀	11-mar-08	2	Moderadamente infectado	Morelos	2.23
5	♀	06-nov-07	1	Poco infectado	Morelos	1.63
6	♀	16-oct-07	1	Muy infectado	Morelos	2.984
7	♀	14-jun-07	2	Moderadamente infectado	Guerrero	5.887
8	♀	03-jul-08	3	Moderadamente infectado	Morelos	3.92
9	♀	03-jul-08	2	Moderadamente infectado	Morelos	3.841
10	♀	02-feb-10	2	Muy infectado	Guerrero	9.05
11	♀	28-abr-10	Desconocida	Moderadamente infectado	Puebla	11.64

Tabla 6. Características de los once cerdos naturalmente infectados utilizados en este estudio.

Visualmente se observan algunas diferencias en las bandas de proteína entre los LV<sub>i</sub> limpios y sin limpiar. La diferencia que más claramente se observa es que en los LV<sub>i</sub> limpios las bandas se definen más claramente que en los LV<sub>i</sub> sin limpiar. No se aprecia una disminución en la cantidad de bandas en los LV<sub>i</sub> limpios con respecto a los LV<sub>i</sub> sin limpiar (Fig 19).

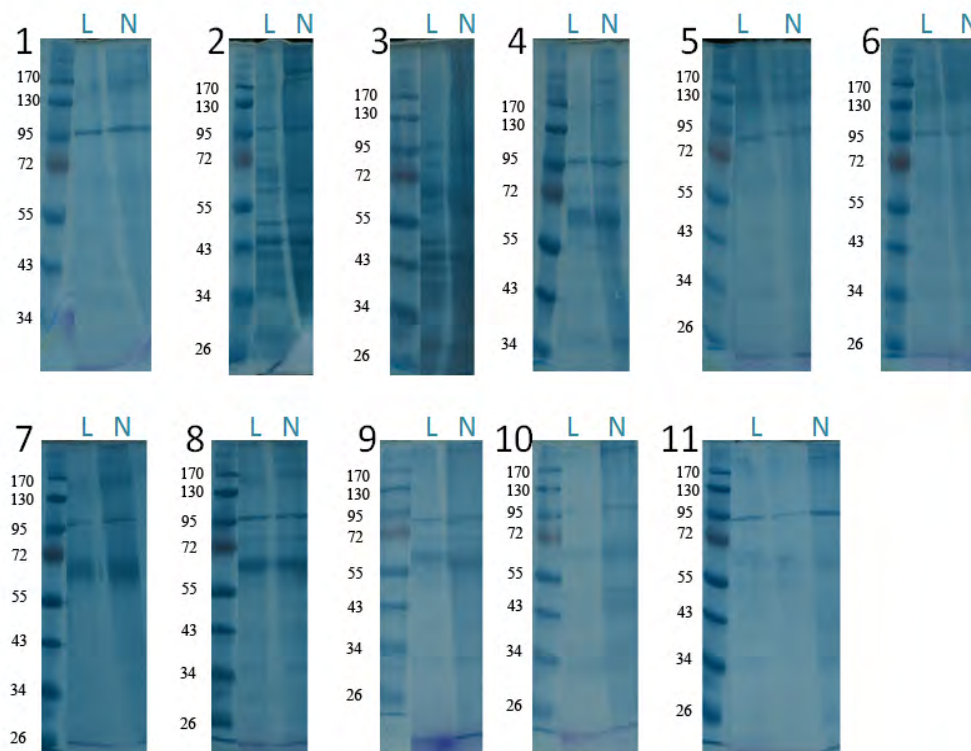


Fig 19. Proteínas de los LV de cisticercos aislados de once cerdos diferentes. Los patrones de bandeo de las proteínas de los once LV<sub>i</sub> se muestran en esta figura. En cada caso se muestra el marcador de peso molecular en la primera línea (kDa) seguido del LV<sub>i</sub> limpio (L) y del LV<sub>i</sub> sin limpiar (N) en la segunda y tercera líneas de cisticercos aislados de diferentes cerdos (1 al 11). Los números en la parte superior de cada imagen es el número con el cual fue identificado cada cerdo utilizado en este estudio. Imágenes de geles teñidos con zinc-imidazol.

Estas observaciones se corroboraron al analizar las imágenes de la figura anterior computacionalmente utilizando el programa QuantityOne. Gráficamente se representaron en una tabla la presencia o ausencia de bandas en cada comparación como se muestra en la figura 20 y se puede apreciar que en general hay más bandas en los LV<sub>i</sub> limpios que en los sin limpiar y no hubo una disminución significativa del número de bandas en los LV<sub>i</sub> limpios contrastando con el número de bandas en los LV<sub>i</sub> sin limpiar.

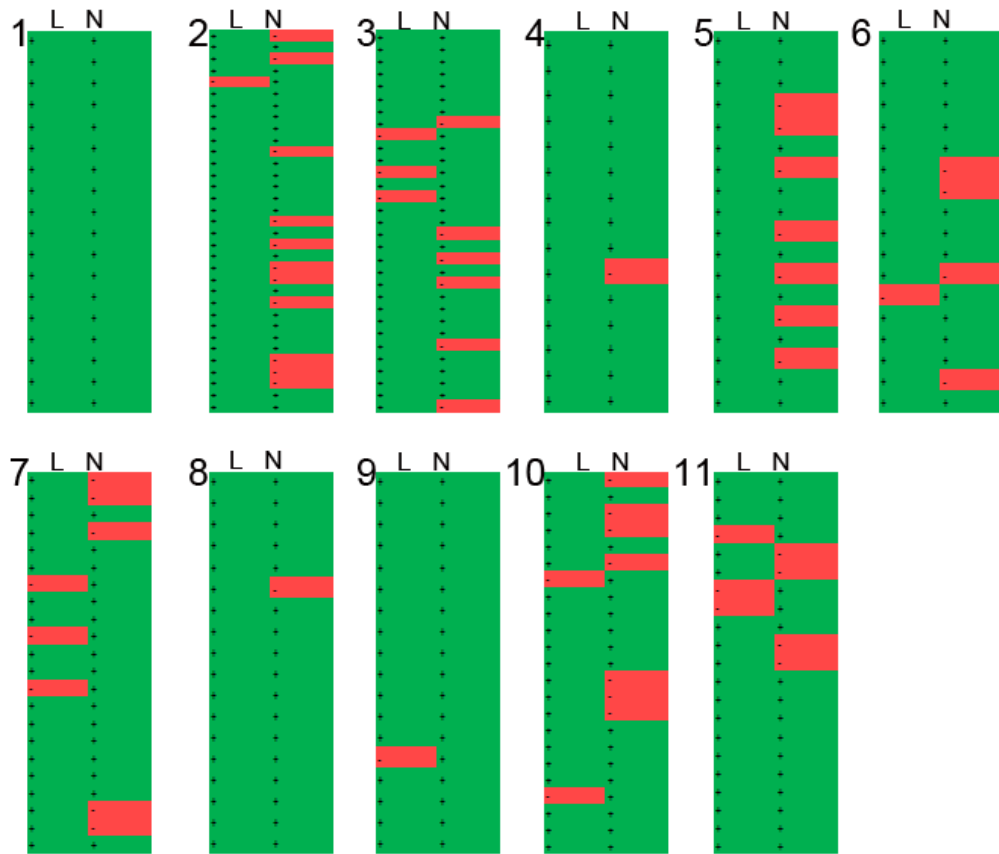


Fig 20. Efecto de la “limpieza” de los LV de cisticercos aislados de diferentes cerdos sobre el contenido de proteínas de los mismos. En las tablas se observa la presencia (+, verde) o ausencia (-, rojo) de bandas en cada uno de los  $LV_i$  limpios (L) y sin limpiar (N). Se muestran todas las bandas de proteína detectadas por QuantityOne en cada caso.

A pesar del limitado número de bandas de proteína detectados en cada  $LV_i$ , el número total de bandas distintas entre ellos es mucho mayor y no hay una banda de proteína que pueda ser encontrada en todos los  $LV_i$  (ver tabla 7).

proteínas del LV de cisticercos de:

Nombre	Banda	kDa	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
I1	1	247.18	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
I31	2	233.25	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AG	3	222.06	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
I2	4	220.47	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
I33	5	214.69	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
I3	6	207.38	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
AE	7	207.05	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
I4	8	195.56	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
AK	9	188.10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
I10	10	184.83	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
A	11	173.28	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
I23	12	172.16	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
B	13	161.00	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
I5	14	155.34	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
I28	15	148.04	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
C	16	145.78	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
I30	17	140.62	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
I11	18	135.06	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D	19	130.43	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
I12	20	129.60	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
P	21	123.19	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
I13	22	118.02	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
AA	23	115.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
I14	24	105.34	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
AB	25	102.78	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
E	26	96.53	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
F	27	90.76	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
I24	28	88.91	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I25	29	85.85	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Ñ	30	84.53	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I15	31	80.02	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	32	78.77	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
R	33	74.62	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
I29	34	74.41	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	35	70.35	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
I6	36	68.14	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	37	68.10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	38	65.88	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
T	39	62.82	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
I7	40	62.34	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
U	41	59.19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
I34	42	58.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
I	43	55.93	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
I17	44	55.21	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AN	45	54.25	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
I18	46	51.63	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
J	47	49.59	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
K	48	48.13	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
I19	49	47.75	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
I32	50	44.54	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
L	51	44.18	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
V	52	41.92	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I8	53	40.47	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
AC	54	40.27	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
M	55	37.86	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
I26	56	37.06	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
W	57	35.16	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
N	58	33.17	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
I9	59	32.42	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
X	60	30.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
I20	61	29.27	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Y	62	27.59	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
I21	63	27.49	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Z	64	25.55	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
I22	65	23.84	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
I27	66	22.86	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
I16	67	19.00	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AH	68	17.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AI	69	13.90	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
AJ	70	10.62	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabla 7. Total de bandas de proteína detectadas en los LV<sub>i</sub> provenientes de cisticercos de diferentes cerdos infectados (C1 a C11).

	Proximity Matrix										
	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	100.00	23.53	40.82	36.36	51.43	27.78	48.78	27.78	27.03	28.57	46.15
2		100.00	46.88	29.17	40.00	31.37	39.29	43.14	23.08	35.09	33.33
3			100.00	30.43	29.17	40.82	40.74	40.82	20.00	40.00	34.62
4				100.00	37.50	24.24	36.84	30.30	23.53	46.15	33.33
5					100.00	17.14	35.00	22.86	33.33	24.39	42.11
6						100.00	29.27	38.89	21.62	28.57	35.90
7							100.00	43.90	23.81	42.55	27.27
8								100.00	16.22	33.33	25.64
9									100.00	32.56	35.00
10										100.00	35.56
11											100.00

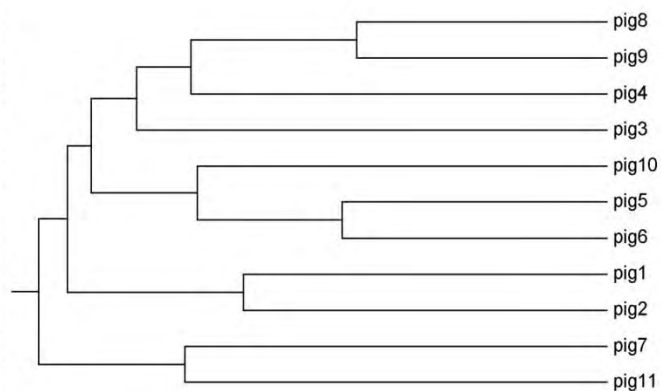


Figura 21. Grado de similitud de los contenidos proteínicos del LV de cisticercos aislados de once cerdos diferentes. Izquierda: Matriz de similitud donde se muestran los porcentajes de similitud de las bandas de proteína de los diferentes LV<sub>i</sub> entre sí. Derecha: fenograma derivado de la matriz de similitud donde se puede observar gráficamente el grado de similitud entre dichos LV<sub>i</sub>.

La figura 21 muestra la matriz de similitud de los diferentes  $LV_i$  entre sí, así como el fenograma. En el mismo se puede apreciar que los  $LV_i$  de cisticercos provenientes de los cerdos #2 y #3 son los más parecidos en su bandeo de proteínas (46.88%) mientras que aquellos provenientes del cerdo #7 son los menos parecidos con los demás (ver rama del fenograma etiquetada como "pig7").

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron cortadas en tiras para realizar el Western Blot utilizando un suero de cerdo distinto en cada tira y realizando así todas las combinatorias de sueros de los cerdos infectados con antígenos de  $LV_i$  (121 combinatorias más los controles). Las imágenes obtenidas de los inmunoblots fueron las siguientes (fig 22):



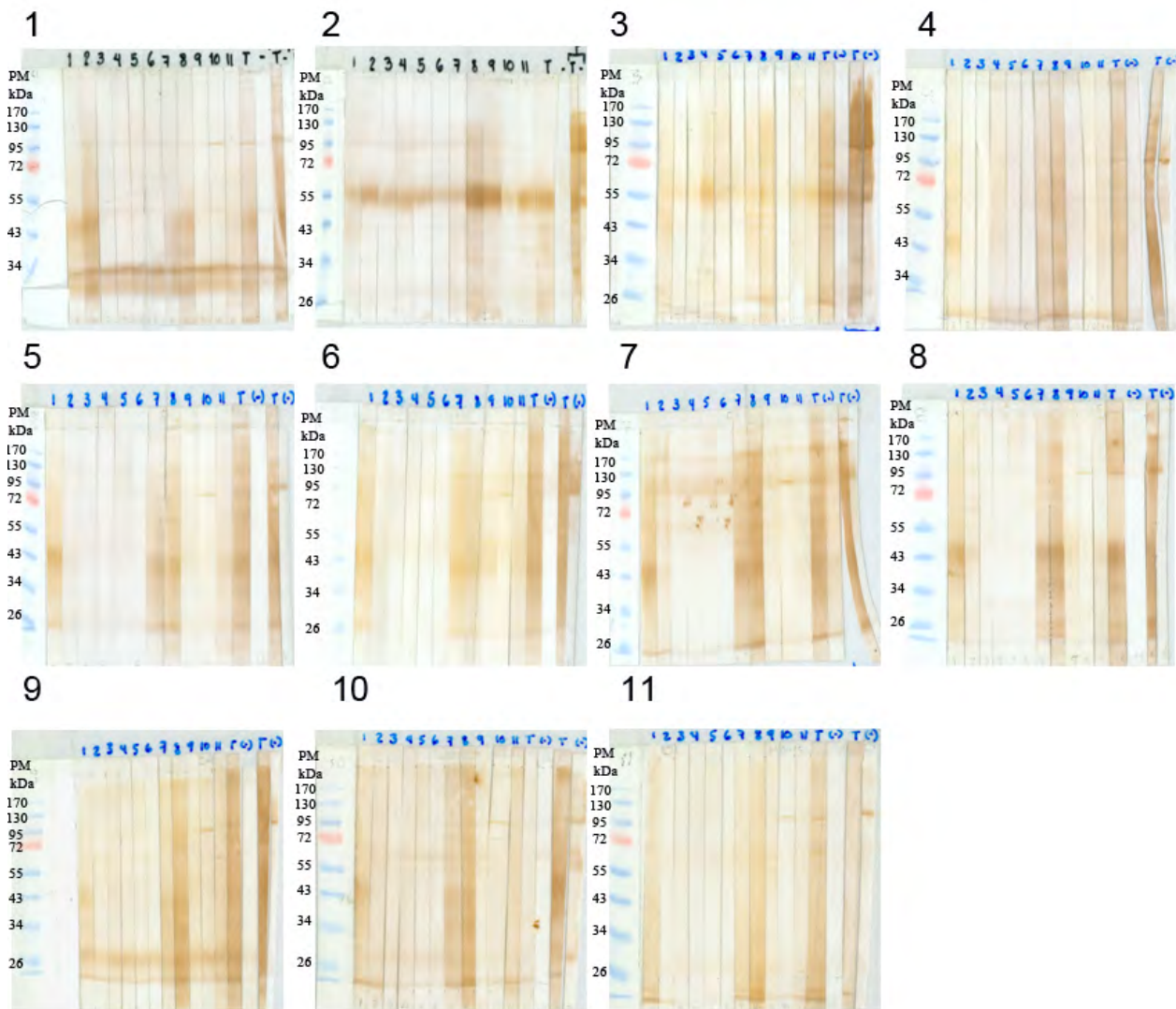


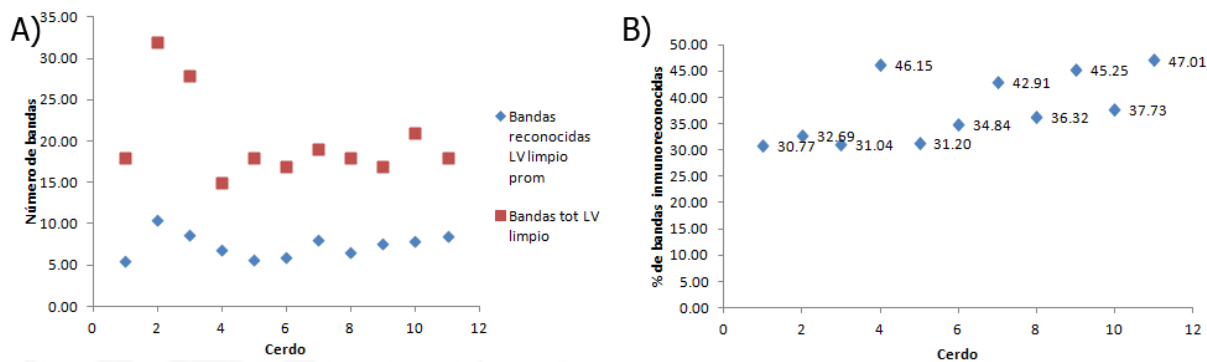
Figura 22. Conjunto de imágenes de los Western Blots de los 11  $LV_i$  limpios. Cada tira corresponde a la reacción del  $LV_i$  de cisticercos provenientes de distintos cerdos (imágenes del 1 al 11) con el suero de cada uno de ellos (sobre las tiras, del 1 al 11), con la combinación de todos (T) o sin suero (-). Las últimas dos tiras en cada caso corresponde al  $LV_i$  sin limpiar.

Visualmente los patrones de bandeo en las imágenes de Western Blot difieren entre los distintos  $LV_i$ . Las últimas dos tiras de cada imagen corresponden a las tiras controles, donde los  $LV_i$  sin limpiar fueron reaccionados con todos los sueros (T) o sin suero, sólo con el anticuerpo secundario (-). Si se observa la última línea en todos los casos, marcada con “(-)”, se puede notar que el anticuerpo secundario *per se* reacciona en todos los casos revelando desde unas

cuantas bandas hasta un barrido de bandas, los cuales hacen imposible discernir la reacción de los anticuerpos del suero unidos a proteínas del  $LV_i$  de la reacción del anticuerpo secundario. Por esta razón los  $LV_i$  fueron limpiados de su contenido de inmunoglobulinas. Si ahora se observa la antepenúltima línea en todos los casos, también marcada con “(-)”, y se compara con la última línea se puede observar que en los  $LV_i$  limpios la reacción del anticuerpo secundario desaparece por completo o se disminuye considerablemente en todos los casos, facilitando así la distinción entre las bandas producto del anticuerpo secundario y las bandas producto del reconocimiento de proteínas en los  $LV_i$  por inmunoglobulinas G del suero. En los casos en que la reacción con el anticuerpo secundario no fue completamente eliminada, las bandas obtenidas en los  $LV_i$  limpios que estuvieran a la misma altura que las bandas producto del anticuerpo secundario (control) fueron consideradas para el análisis posterior si éstas eran más intensas que el control, denotando así que además fueron reconocidas por inmunoglobulinas del suero.

El análisis de los Western Blots reveló que sólo alrededor de la mitad de las bandas de proteína fue reconocida por los sueros ( $36/70=51.4\%$ , Figura 23) y que los sueros además reconocieron seis bandas adicionales que no fueron detectadas en los geles de proteína teñidos, dando un total de 42 bandas distintas reconocidas por los sueros. Estas seis bandas podrían encontrarse en muy baja concentración o por debajo del límite de detección del método de tinción y por lo tanto no fueron visualizadas en los geles. Sin embargo, la respuesta inmune de anticuerpos es capaz de detectar cantidades muy pequeñas de antígeno y de amplificar la respuesta hacia ellos, lo que pudo haber permitido la detección de estas bandas en los Western Blot.

En promedio, cada  $LV_i$  mostró 21 bandas (15 – 26 bandas;  $\sigma$ : 4.21) en los Western Blot, pero no hubo alguna banda que fuera reconocida en todos los  $LV_i$ ,



independientemente del suero utilizado.

Fig 23. Número de bandas de proteínas y antígenos detectadas en cada uno de los  $LV_i$  de cisticercos aislados de diferentes cerdos. A) Número de bandas de proteína presentes en cada uno de los LV de los cisticercos aislados de distintos cerdos y el número de bandas que fueron reconocidas por el suero del cerdo correspondiente en cada caso. B) Porcentaje de bandas reconocidas por los sueros en WB en cada uno de los LV de cisticercos aislados de distintos cerdos (promedio: 37.81).

Aunque varios  $LV_i$  tuvieron bandas del mismo peso molecular éstas no fueron reconocidas por el mismo número de sueros, algunas fueron reconocidas por un número similar pero no por los mismos sueros en todos los casos (Figura 24 y Tabla 8). Este resultado pone de manifiesto una de las debilidades de utilizar Western Blot de extractos parasitarios como método de diagnóstico: varios antígenos pueden tener un mismo peso molecular y agruparse en una sola banda.

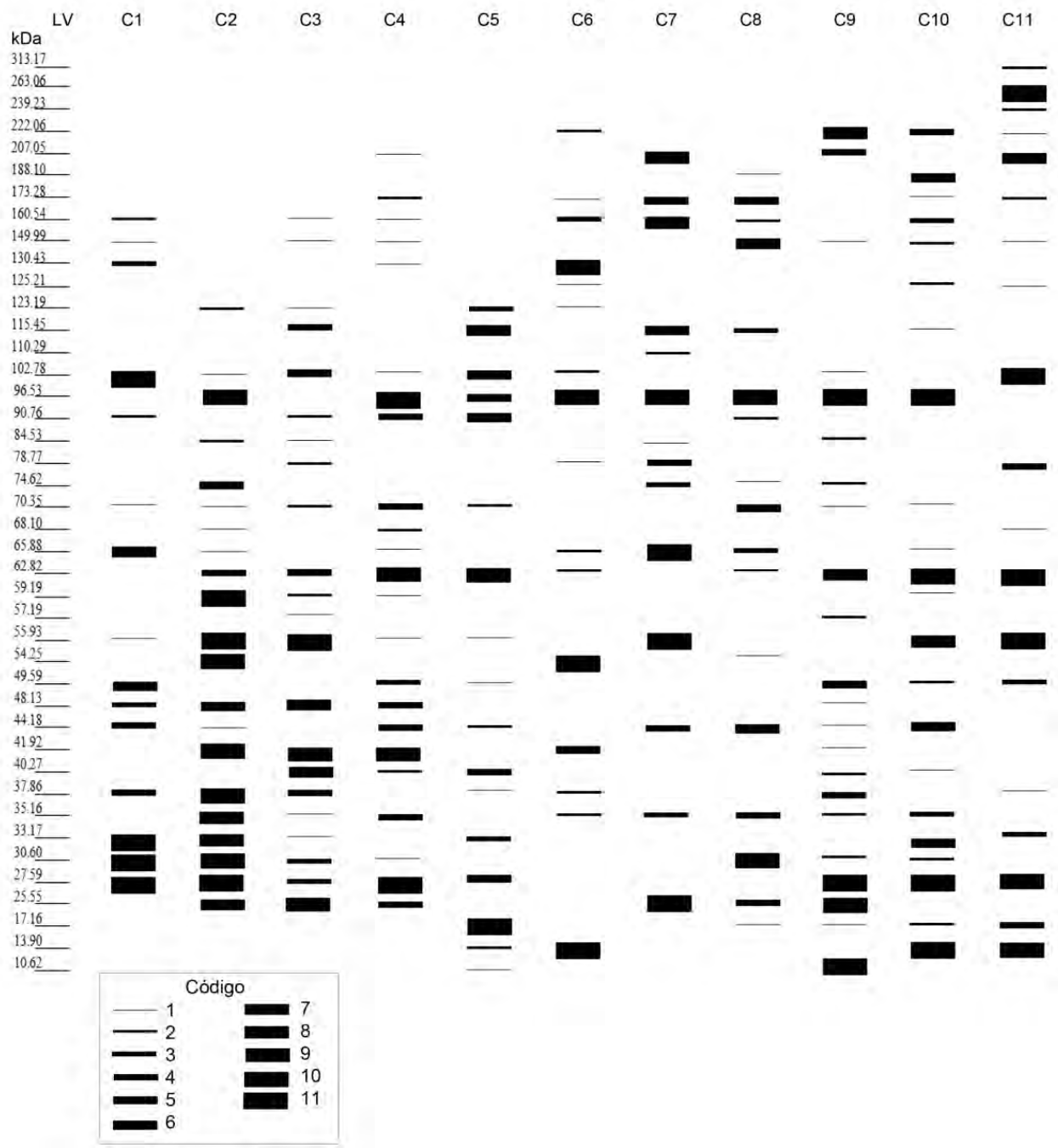


Figura 24. Resumen de las bandas reconocidas en Western Blot en cada uno de los LV<sub>i</sub> limpios de inmunoglobulinas. El grosor de cada banda indica el número de sueros que reconocieron cada banda en los diferentes LV<sub>i</sub> limpios, de acuerdo al código que se establece en la parte inferior de la figura.

LVI limpios de cisticercos de diferentes cerdos naturalmente infectados (C1 al 11)													
Nombre	Banda	kDa	LV C1	LV C2	LV C3	LV C4	LV C5	LV C6	LV C7	LV C8	LV C9	LV C10	LV C11
AO	1	313.17											1,4
AP	2	263.06											1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
I1	3	247.18											
AQ	4	239.23											5,8
I31	5	233.25											
AG	6	222.06						8,10			3,4,5,7,8,9,10,11	2,6,10,11	5
I2	7	220.47											
I33	8	214.69											
I3	9	207.38											
AE	10	207.05				10			2,4,5,6,7,8,9,10		2,3,4,10		2,3,4,6,7,8,10
I4	11	195.56											
AK	12	188.10								8		4,5,7,8,9,10	
I10	13	184.83											
A	14	173.28				6,8		8	4,8,9,10,11	7,8,9,10,11		2	7,8
I23	15	172.16											
B	16	160.54	4,11		10	8		8,9,10	1,2,3,4,5,6,7,10	2,10		7,8,9	
I5	17	155.34											
C	18	149.99	2		2	5				1,2,5,7,8,9,10	1	5,7	4
I28	19	148.04											
I30	20	140.62											
I11	21	135.06											
D	22	130.43	1,2,11			10		1,2,3,5,6,7,8,9,10,11					
I12	23	129.60											
AM	24	125.21						4				5,8	1
P	25	123.19		7,8	9		2,8,10	11					
I13	26	118.02											
AA	27	115.45			1,4,7,8		3,4,5,6,7,8,11		2,4,5,6,7,8	4,7,8		4	
Q	28	110.29							1,3				
I14	29	105.34											
AB	30	102.78	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	2	4,5,9,10,11	5	2,3,4,5,6,8	5,7			5		1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
E	31	96.53		1,3,4,5,6,7,8,9,10,11		1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	5	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	1,2,3,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11		
F	32	90.76	2,8		7,8		3,7,8,9,10,11			7,8			
I24	33	88.91											
I25	34	85.85											
N	35	84.53		8,9	10				8		8,9		
I15	36	80.02											
O	37	78.77			6,9				1	3,6,7,8			4,5,6,7
R	38	74.62		5,6,7,8,11						4,7,8	6	7,8	
I29	39	74.41											
G	40	70.35	7	8	8,10	1,4,8,9	4,8			1,2,6,7,8	8	8	
I6	41	68.14											
S	42	68.10		8			4,8						8
H	43	65.88	2,4,5,6,7,8,10	10			10	7,8	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,6		6	
T	44	62.82		2,5,8,9	3,4,6,7,9	1,2,3,4,5,6,7,8,9,11	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	6,9		7,8	1,2,3,4,5,6,8,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
I7	45	62.34											
U	46	59.19		1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	7,8	8							2
I34	47	58.94											
AD	48	57.19			10						9,11		
I	49	55.93	2	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	8	3		1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11		3,4,5,6,7,8,9,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	
I17	50	55.21											
AN	51	54.25		1,2,3,4,5,6,8,9,10,11					1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11				
I18	52	51.63								8			
J	53	49.59	3,4,5,6,9,10			4,6,10	9				2,3,6,8,11	5,11	2,3,4
K	54	48.13	1,2,8	2,5,6,8,9,11	1,4,5,6,7,8,11	4					10		
I19	55	47.75											
I32	56	44.54											
L	57	44.18	1,2,7,8	7		1,4,7,8	6,9		1,2,7,8	1,2,7,8,9,11	9	1,2,5,7,8,11	
V	58	41.92		1,2,3,4,5,6,7,8,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9	9		1,7,8,9,11			10		
I8	59	40.47											
AC	60	40.27			1,2,3,5,6,7,9	4,10	2,7,8,11				1,7	1	
M	61	37.86	1,2,7,8	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11	3,7,10,11		1	1,11			1,7,8,9		5
I26	62	37.06											
W	63	35.16		3,4,5,6,7,8,10,11	8	4,7,8,9		1,2	1,7,8	7,8,9,11	7,8	1,7,8	
N	64	33.17	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	2,3,4,5,6,7,8,11	10		1,2,10					1,3,4,5,6,7	3,4,5
I9	65	32.42											
X	66	30.60	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11	1,3,5	4				2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	7,10	4,5	
I20	67	29.27											
Y	68	27.59	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,4,5	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	4,5,6,9,10				1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11
I21	69	27.49											
Z	70	25.55		7	2,3,4,5,6,7,8,9,11	3,5,6,11			1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,7,8	1,2,3,4,5,6,8,9,10,11		
I22	71	23.84											
I27	72	22.86											
I16	73	19.00											
AH	74	17.16					1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11			8	4	2,10	1,3,7,8
AI	75	13.90					8,11	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11				1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11
AJ	76	10.62					8				1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11		

Tabla 8. Total de las bandas encontradas en los LV<sub>i</sub> limpios obtenidos de cisticercos de diferentes cerdos infectados. Los números separados con comas en las celdas corresponden a la identidad de los sueros de los cerdos que reconocieron cada banda en cada LV<sub>i</sub> (cerdos 1 al 11).

Con el fin de comparar mejor los patrones de bandeo tanto de proteínas como en los inmunoblots, se elaboraron matrices de similitud y fenogramas que permitieran determinar numéricamente el grado de diversidad y así mismo determinar si la diversidad de proteínas era mayor a la de antígenos.

Primeramente se compararon qué tan similares eran los patrones de bandeo de distintos sueros en cada uno de los LV<sub>i</sub>, para lo cual se obtuvieron las matrices de similitud en SPSS (fig 24) y posteriormente se hicieron los fenogramas con esa información (fig 25).

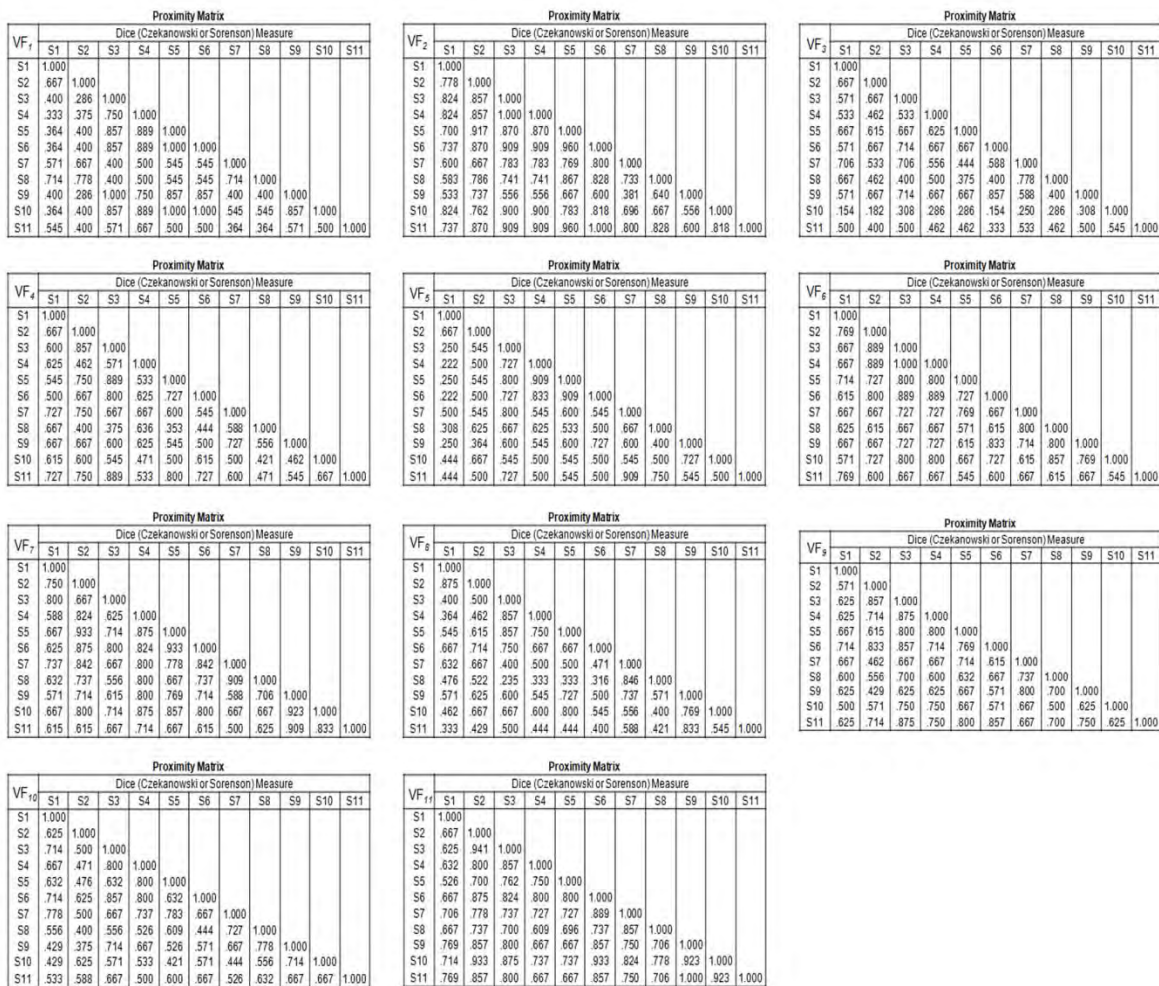


Fig 24. Matrices de similitud de los once LV (VF<sub>1</sub> al 11). En las matrices se comparan los patrones de bandeo de los 11 sueros en cada LV. Los valores dentro de las tablas son porcentajes de similitud. S1 a S11 corresponden a los sueros de los cerdos 1 al 11.

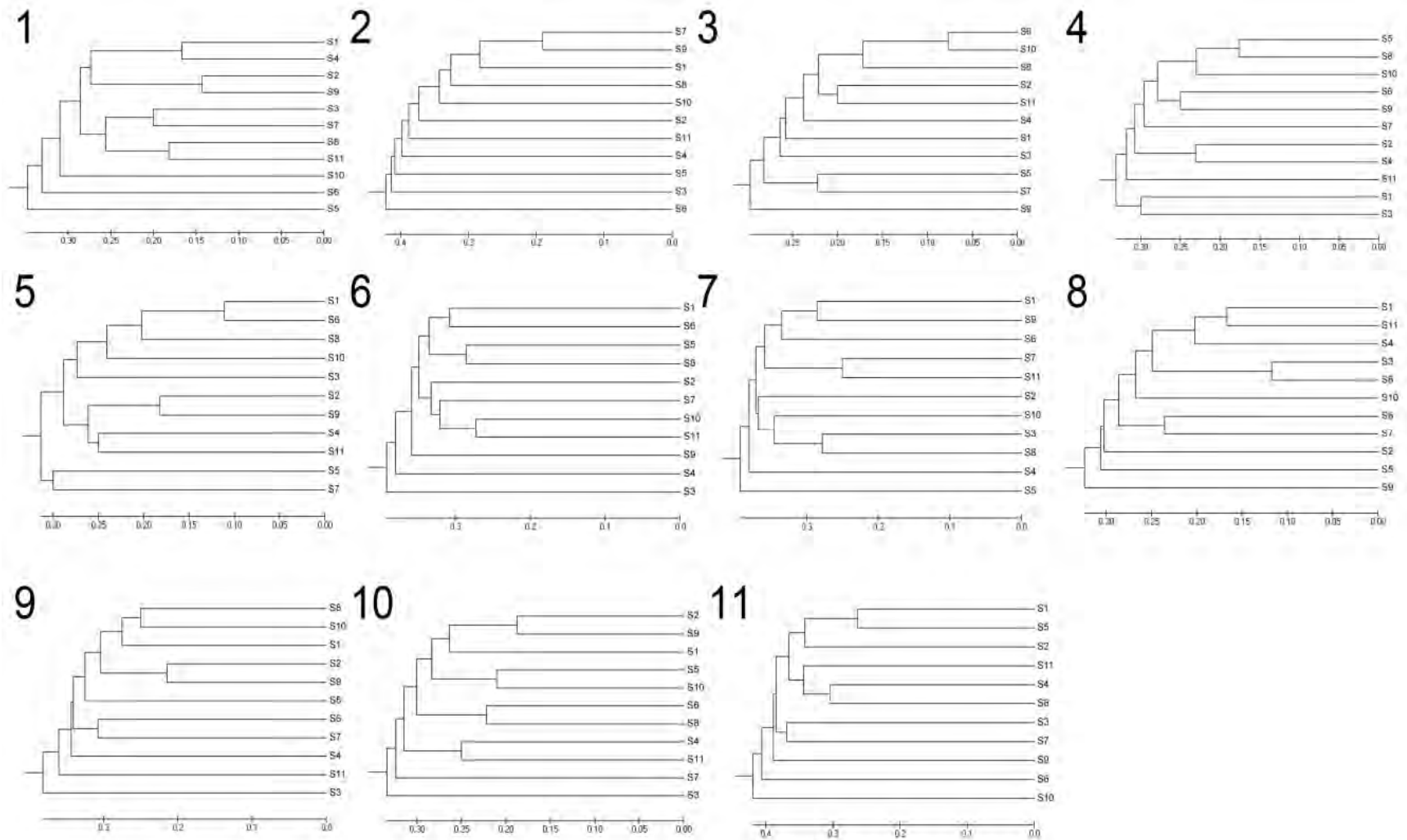


Fig 25. Fenogramas obtenidos a partir de las matrices de similitud de los inmunoblots de cada uno de los  $LV_i$ . Los números en la parte superior izquierda de cada fenograma corresponden a los  $LV_i$  (1 al 11). “S1” a “S11” corresponden a cada uno de los sueros de los cerdos infectados, del uno al once.

Los fenogramas muestran que las IgG de los cerdos no reconocen las mismas bandas en todos los LV, ya que los sueros de los cerdos que más cercanamente se agrupan en un LV no lo hacen en los otros LV, lo que demuestra que cada cerdo tiene una historia particular con sus cisticercos y que estas historias podrían ser similares en algún momento, lo que explica que algunos sueros de cerdos reconozcan bandas en otros LV que no se encuentran presentes en el LV de sus propios cisticercos.

Los inmunoblots de cada LV<sub>i</sub> mostraron un número limitado de bandas muy inferior al número total de bandas diferentes encontradas en los inmunoblots (42 bandas). Para poder compararlos y conocer el grado de diversidad entre ellos se procedió a comparar las bandas (presencia o ausencia) de los inmunoblots de los diferentes LV<sub>i</sub> entre sí. Primeramente se construyó una matriz de similitud y con esa información se construyó un fenograma (Fig 26).

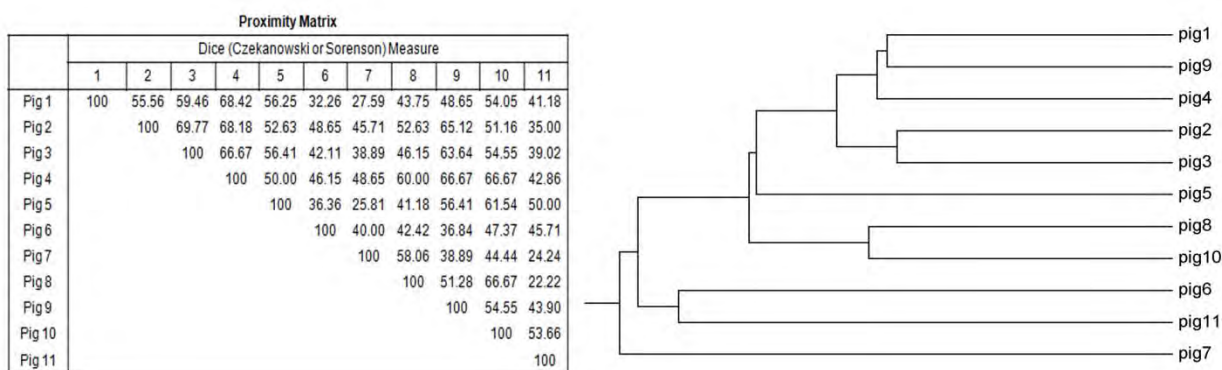


Figura 26. Matriz de similitud y fenograma resultantes de comparar las bandas de los 11 inmunoblots de todos los LV<sub>i</sub>. Izquierda: Matriz de similitud donde se muestran los valores de similitud entre los inmunoblots de los once cerdos en porcentaje (Pig 1 al 11). Derecha: Fenograma donde se observa visualmente la similitud entre los mismos.

Los inmunoblots que más se parecen son los del LV<sub>2</sub> y el LV<sub>3</sub> (69.77%). Éstos mismos fueron los inmunoblots más parecidos en 2-Dimensiones debido a que sus contenidos proteicos son muy similares en 2-Dimensiones. En electroforesis unidimensional, al analizar las bandas de proteínas, éstos dos LV<sub>i</sub>



no resultaron ser los más similares (46.88% de similitud, ver figura 21) pero el parecido se incrementa a 69.77% en los 1D- inmunoblots (ver figura 26).

Para determinar que diversidad es mayor, si la de las proteínas del parásito o la de la respuesta inmune IgG, se calculo la varianza de las imágenes de proteína y la de los inmunoblots contra una imagen promedio. La imagen promedio se construyó tomando en cuenta el total de bandas presentes en cada caso y la presencia o ausencia de cada una de ellas en cada LV. Para el caso de los inmunoblots se realizó de dos maneras: a) cero y uno. Cada banda tomó un valor de cero o de uno dependiendo de si se encontraba o no en el WB de cada uno de los LV. La imagen promedio fue la suma de los valores de cero y uno de cada una de las bandas dividida entre el número de LV (once). Este mismo procedimiento se realizó para obtener la imagen promedio de las bandas de proteína de los LV; b) Se les asignó a cada banda un número dependiendo del número de sueros que reconocieron esa banda en cada uno de los LV. La imagen promedio fue la suma de los valores de cada una de las bandas dividida entre el número de LV (once).

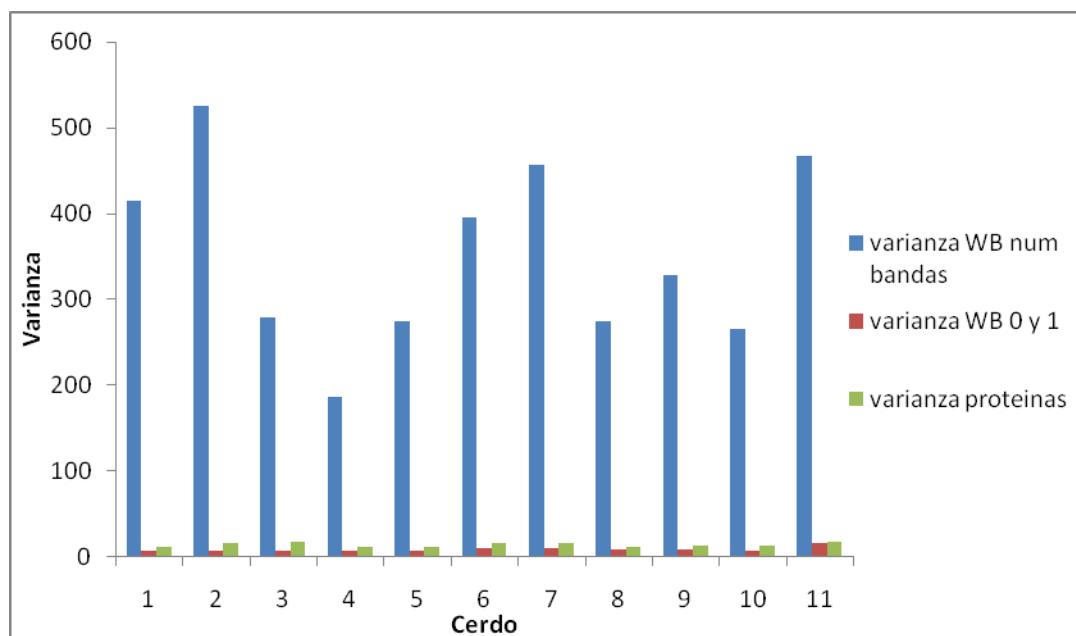


Fig 27. Comparación de las varianzas calculadas. En la gráfica se muestran los valores de las varianzas calculadas cada una de las imágenes (proteína e inmunoblot) del LV de cisticercos obtenidos de distintos cerdos.

Como se puede observar en la figura 27, la varianza de la respuesta inmune es mucho mayor que la varianza de las proteínas. La varianza de los inmunoblots usando valores de cero y uno para determinar la presencia o ausencia de bandas mostró una varianza menor que la de proteínas debido a que el número de bandas inmunoreconocidas por las IgG de los sueros es menor que el número total de bandas de proteína. Al tomar en cuenta el número de sueros que reconocen cada banda la varianza crece significativamente. Esto demuestra que la variabilidad de la respuesta inmune entre diferentes huéspedes infectados sobrepasa por mucho la variabilidad del parásito. Sin tomar en cuenta el número de sueros que reconocen cada banda y sólo si es reconocida o no en cada uno de los  $LV_i$ , la varianza disminuye, incluso es un poco menor que la varianza de las proteínas de parásitos de diferentes huéspedes. Esto representa que las inmunoglobulinas G de los sueros de los cerdos van dirigidas contra un número limitado de bandas, al considerar el número de sueros que reconocen cada una de ellas la varianza aumenta ya que, a pesar del número limitado de bandas, no todos los sueros las reconocen en todos los casos.

## **Discusión**

El efecto del fondo genético y del sexo en la infección con *Taenia crassiceps* son fenómenos que ya han sido reportados y estudiados (Fragoso G *et al*, 1996, Sciutto E *et al*, 1991, Fragoso G *et al*, 1998; Fragoso *et al*, 2008). En los experimentos aquí reportados la variación de las cargas parasitarias por efecto de la cepa y el sexo de los ratones ocurrió de conformidad con dichos reportes previos. Sin embargo, el presente estudio analiza estos resultados con un enfoque y una metodología distinta: la medición cuantitativa del fenómeno y no sólo cualitativa. Se pudo medir la variación encontrada en las cargas parasitarias y el número de spots en los 2D-IgG inmunoblots entre ratones de la misma cepa y del mismo sexo. Éstas variaciones pueden tener varios orígenes: metodológica, diferencias entre los cisticercos del inóculo, variaciones específicas entre los huéspedes individuales (genética, ambiental, estrés, sanidad) o una combinación

de ellas. Sin embargo aislar las causas exactas de la variación individual y controlarlas de manera que la variabilidad sólo pueda ser atribuida al componente individual es sumamente difícil. Algunos avances al respecto se han realizado en el laboratorio investigando la variabilidad que pueda existir entre los cisticercos del inóculo mediante experimentos de cultivo *in vitro*. En estos experimentos se ha encontrado que los cisticercos que aparentemente son iguales no lo son y estas diferencias entre ellos se reflejan en velocidades de gemación distintas y a diferentes tiempos. Adicionalmente, los cisticercos responden a diferentes factores de estrés como son el oxidativo y el relacionado con la energía (glucosa) (ver anexo III). El microambiente existente dentro de la cavidad peritoneal de cada ratón aunado a las diferencias en los cisticercos que componen el inóculo inicial pueden ser responsables de parte de la diversidad encontrada en este trabajo, aunque su participación sólo puede ser reconocida pero no calculada.

La gran diversidad de la respuesta inmune humoral IgG encontrada en los 2D-IgG inmunoblots no se esperaba. Esta gran diversidad refleja la individualidad de la relación huésped-parásito y de la respuesta inmune IgG en ella. Diferentes factores biológicos y ambientales podrían estar relacionados con esta individualidad, por ejemplo: a) Ampliación somática del repertorio de IgG; b) Diferencias en los cisticercos de inóculo inicial; c) Diferentes niveles de estrés en cada huésped; d) diferencias en el historial inmunológico de cada huésped.

La diversidad encontrada limita la capacidad de desarrollar herramientas de diagnóstico basadas en IgG y/o en antígenos únicos, ya que para poder incluir a los 30 ratones utilizados en este estudio con una prueba serológica, al menos tres spots son necesarios para detectar al 50% de los individuos y al menos nueve spots para detectar al 100%. En el caso de las imágenes divididas por una cuadrícula, se requieren 4 casillas con al menos un spot para detectar al 100% de los individuos. No se encontraron spots asociados con las cargas parasitarias bajas que pudieran ser candidatos para vacunas y la falta de asociación entre el número de spots y las cargas parasitarias fortalece la opinión de que los anticuerpos IgG son irrelevantes en la protección contra la cisticercosis (Baig S *et*

al, 2006) debido a que no limitan la reproducción de los cisticercos e incluso podrían favorecerla ocultando antígenos vulnerables a otros mecanismos del sistema inmune más efectivos.

Los resultados con otro tipo de inmunoglobulinas podrían ser diferentes (por ejemplo IgG2a, inmunoglobulina asociada a la respuesta Th1 efectiva contra los cisticercos) pudiendo correlacionar otros tipos de inmunoglobulinas con la protección a la infección y mejorando la selección de antígenos candidatos a vacunas o inmunodiagnóstico.

La división de los 2D-IgG inmunoblots en 100 casillas mediante una cuadrícula no afectó la clasificación de las principales fuentes de diversidad de las imágenes, cepa>individuo>sexo. Las correlaciones positivas y negativas de las casillas entre sí representan el 10% del total de las correlaciones, porcentaje que excede 10 veces el 1% de ocurrencia al azar. Este hecho podría validar la idea de que existe una red inmunológica que aún no comprendemos. Posiblemente existe una conectividad entre clonas de células B que se regulan mutuamente durante la respuesta inmune del huésped contra los cisticercos. Otras posibilidades que podrían explicar las correlaciones entre las casillas positivas y la relación del índice de conectividad con la carga parasitaria son: a) un mismo epítipo ampliamente distribuido entre los antígenos del parásito (por ejemplo, un glicomotivo); b) Los repertorios de anticuerpos de las cepas existentes incluyan reactividad a un epítipo ampliamente distribuido en los antígenos del parásito que la cepa susceptible no incluya: c) Las cepas más resistentes sintetizan IgGs de más alta afinidad y especificidad, mientras que Balb/c sintetiza más anticuerpos pero que reaccionan con epítipos irrelevantes o que distraen al sistema inmune.

El índice de conectividad no correlacionó con los niveles de carga parasitaria y sólo correlacionó con el fondo genético de los ratones, siendo este último el principal determinante de las diferencias en las cargas parasitarias entre cepas. La diversidad en cargas parasitarias encontradas a nivel individual entre los miembros de una misma cepa indica que esta diversidad puede ser provocada por otros factores derivados de la relación particular de cada huésped con sus

parásitos, como pueden ser diferencias en el inóculo inicial, infecciones concomitantes o factores de estrés. Esta diversidad a nivel individuos no ha sido medida sistemáticamente pero es significativa.

La metodología de análisis de imágenes en 2-Dimensiones desarrollada en el modelo murino de la cisticercosis fue después aplicada al problema de la cisticercosis porcina por *Taenia solium*.

En el caso de la cisticercosis porcina se encontró que cisticercos aislados de diferentes cerdos rurales naturalmente infectados expresan diferentes proteínas y antígenos en sus LVs. El análisis de las imágenes de proteína en 2D y de los 2D-IgG inmunoblots reveló que sus diversidades son de un tamaño considerable. No se encontró un solo spot presente en todas las imágenes de proteína en 2D y ninguno de los 2D-IgG inmunoblots presentó el mismo patrón de spots. De hecho ningún spot antigénico fue inmunoreconocido en los nueve 2D-IgG inmunoblots. Del total de proteínas presentes en las imágenes en 2D sólo una fracción de ellas fue inmunoreconocida en cada caso (del 19% al 65%). Las diferencias encontradas en las proteínas y antígenos expresados por los cisticercos de diferentes cerdos pueden deberse a diferencias genéticas entre los parásitos, variabilidad de los huéspedes y/o una combinación de ambos.

La diversidad genética en *Taenia solium* ha sido estudiada y se han identificado dos regiones geográficas principales: Asia y África/Latinoamérica (Hancock K *et al* 2001; Nakao M *et al* 2002, Ito A *et al* 2003). Diferencias genéticas también han sido reportadas entre cisticercos de diferentes cerdos dentro de la misma localidad, así como entre diferentes localidades de una misma región y país (Maravilla P *et al* 2003; Bobes RJ *et al*, 2010). Más aún, diferencias genéticas detectables han sido encontradas entre los cisticercos de un mismo cerdo, aunque la variación intra cerdo es mucho menor que la variación entre cerdos (Bobes RJ *et al*, 2010), lo que puede indicar que los cerdos se infectan con los huevos de una sola tenia. Los cerdos utilizados en este estudio fueron colectados durante un periodo de tiempo de poco menos de un año (Octubre 2007 a Abril 2010) y provinieron de diferentes localidades del centro de México, por lo que es muy

probable que cada uno se hubiera infectado con huevos de diferentes gusanos. En cerdos infectados experimentalmente con huevos de tenia se ha demostrado que la inmunidad a una segunda infección dura al menos cinco meses, mientras los cisticercos sean vesiculares (de Aluja AS *et al*, 1999). Esto concuerda con la menor variabilidad genética encontrada en los cisticercos de un cerdo comparada con la variabilidad genética entre cerdos (Bobes RJ *et al*, 2010; Vega R *et al*, 2003) y con las pocas diferencias antigénicas encontradas en este trabajo al comparar los líquidos vesiculares de 15 cisticercos dentro de un mismo cerdo. También es posible que las diferencias en las proteínas y antígenos que los cisticercos expresan en cada huésped al tiempo en que fueron obtenidos sean debidas al mismo ya que los cerdos rurales difieren entre ellos en muchas formas (fondo genético, edad, sexo, historia inmunológica, castración, preñez, estado nutricional, condiciones de estrés, posición social en la piara, etc.), y el parásito debe adaptarse a las condiciones específicas que encuentra en cada huésped (Recker M *et al*, 2011; Rópolo AS *et al*, 2010; Haag KL *et al*, 2007).

Del total de spots antigénicos encontrados en los 2D-IgG inmunoblots algunos de ellos fueron más frecuentemente reconocidos que otros. De éstos al menos cinco serían necesarios para poder detectar serológicamente a los nueve cerdos utilizados en este estudio. Estos cinco antígenos concuerdan en su bajo peso molecular (5.95 – 8.03 kDa) y su punto isoeléctrico básico (7.85 – 8.31 pI). Dos de estos antígenos tienen un peso molecular de  $\approx 8$  kDa por lo que podrían ser posibles miembros de la ya reportada familia de antígenos de 8 kDa (Hancock K *et al*, 2003; Ferrer E *et al* 2007) que ha sido utilizada para serodiagnóstico de la cisticercosis. Interesantemente con estos dos antígenos de  $\approx 8$  kDa cinco de los nueve cerdos (55.5%) pueden ser detectados. Otro de estos cinco spots tiene un peso molecular cercano a 8 kDa (7.81 kDa) y es reconocido por el suero de tres cerdos, dos de los cuales también reconocen a uno de los antes mencionados antígenos de  $\approx 8$  kDa. Este spot antigénico puede ser un antígeno de 8 kDa modificado o truncado y por ende, difiriendo muy poco de los otros spots antigénicos de 8 kDa. Al incluir este spot, junto con los dos de  $\approx 8$  kDa, es posible detectar serológicamente al 66.6% de los cerdos. Varios autores (Lee EG *et al*,

2010; Atluri SRV *et al*, 2009; Sako Y *et al*, 2000) han enfocado sus esfuerzos para desarrollar una prueba inmunodiagnóstica para la cisticercosis utilizando antígenos de bajo peso molecular (LMA) ya que estos antígenos constituyen subunidades de proteínas inmunogénicas más grandes. Una de las características de la electroforesis bidimensional es precisamente la descomposición de proteínas grandes en sus subunidades individuales. Los pequeños cambios en los puntos isoeléctricos de spots antigénicos con el mismo peso molecular pueden ser debidos a cambios en los patrones de glicosilación de un mismo esqueleto de proteína (Ito A *et al*, 2002; Sato MO *et al*, 2006) y/o de diferentes esqueletos de proteína. Esto podría explicar por qué no se encontró un spot de proteína ni un spot antigénico que estuviera compartido en las nueve imágenes de proteínas en 2D ni en los nueve 2D-IgG inmunoblots.

La diversidad antigénica del parásito *Taenia solium* rara vez se ha estudiada a fondo. Hay pocos reportes de diferencias antigénicas en cisticercos de *T. solium* de diferentes aislados (Ito A *et al*, 2002; Sato MO *et al*, 2006; Yakoleff-Greenhouse V *et al*, 1962), sin embargo la diversidad genética del parásito ha sido sospechosa de ser responsable de la diversidad de manifestaciones clínicas de la cisticercosis humana (Fleury A *et al*, 2010; Campbell G *et al*, 2006) y porcina (de Aluja AS *et al*, 1996; de Aluja AS 2008). Esta sospecha va de acuerdo con los estudios en otros parásitos que han mostrado que las diferencias genéticas entre ellos tienen efectos en la respuesta inmune de los huéspedes. El caso de los diferentes genotipos de *Trypanosoma cruzi* que provocan diferentes patrones de respuesta inmune humoral (Dos Santos DM *et al*, 2009) es un ejemplo.

La diversidad encontrada en este estudio en el repertorio de proteínas de los LV en 2D se encuentra congruentemente relacionada con la diversidad de la respuesta inmune de los cerdos estudiados, expresada por los anticuerpos IgG de sus sueros. El tamaño de estas dos diversidades varió entre cerdos aunque las imágenes de proteínas en 2D fueron más parecidas entre sí (53.39%) que la percepción inmunológica de las mismas, mostrada por las IgG de los sueros (43.02%). Dado que la varianza de las imágenes fue mayor en las proteínas en 2D

que en los 2D-IgG inmunoblots, parece razonable concluir que no todas las proteínas en los LV son antigénicas para el huésped. Parte del contenido de proteínas de los LV pueden ser proteínas originarias del huésped (proteínas completas o productos de degradación de inmunoglobulinas y otras proteínas) pero es poco probable que estos contenidos de origen del huésped puedan ser reconocidos por las IgG del suero ya que esto implicaría un trastorno autoinmune de amplio espectro en el cerdo. Las diversidades de proteínas y antígenos encontradas en este estudio corresponden muy probablemente a diferentes momentos de la infección en cada huésped y los resultados podrían variar con el tiempo.

Las correlaciones significativas encontradas entre las casillas de los 2D-IgG inmunoblots también reflejaron la diversidad de las imágenes. De las 4950 correlaciones diferentes sólo el 3% fueron significativas. El significado biológico de estas correlaciones significativas es desconocido pero pueden representar antígenos que favorezcan o bloqueen (en el caso de correlaciones negativas) el reconocimiento de otros antígenos, implicando que una red inmunológica puede estar involucrada en la manera en que los cerdos infectados reconocen a los cisticercos como los ratones hacen con *T. crassiceps*. Si tal red existe también en cerdos y en humanos, el estudio de las diferentes interacciones entre los nodos podría brindar algunas pistas para entender mejor la cisticercosis y podría ser particularmente útil en el campo de diseño de vacunas, ya que podrían seleccionarse antígenos críticos que deban incluirse o descartarse.

Los experimentos realizados en 1 Dimensión muestran que si bien la diversidad antigénica de los cisticercos es grande, la diversidad de la respuesta inmune es aún mayor. Cada huésped tiene una historia particular con sus cisticercos y probablemente estas historias sean muy similares en algún punto, lo que explicaría que los cerdos tengan anticuerpos IgG en contra de bandas del LV de cisticercos de otros cerdos que no se encuentran presentes en el LV de sus propios cisticercos.



La combinación de las diversidades inmunológicas del huésped y del parásito descritas aquí fortalecen la hipótesis existente de que las diversidades clínicas y patológicas encontradas en la cisticercosis humana y porcina por *T. solium* podrían ser debidas a diferencias tanto del huésped como del parásito (Sciutto E *et al*, 2003; Fleury A *et al*, 2010; Shukla N *et al*, 2008). En este trabajo se demuestra que existen diferencias inmunológicas significativas entre los huéspedes infectados y los cisticercos infectantes.

Haber encontrado diversidad entre los cerdos infectados y entre los cisticercos que los infectan no es una gran sorpresa ya que los organismos vivos son únicos (Medawar PB, 1957) y la infección e inmunidad constituyen uno de los escenarios más prominentes y decisivos para la diversificación de las especies al hacer a algunos individuos susceptibles y a otros resistentes a la infección.

En cuestiones más prácticas, los cisticercos obtenidos de los músculos esqueléticos de cerdos naturalmente infectados son utilizados extensivamente alrededor del mundo como una fuente de antígenos para pruebas de inmunodiagnóstico (Sciutto E *et al*, 1998; Lee EG *et al*, 2010, Shukla N *et al*, 2008; Alturi SRV *et al*, 2009; Deckers N *et al*, 2010), diseño de vacunas (Sciutto E *et al*, 1995; Sciutto E *et al*, 2008) y estudios fisiopatológicos de la cisticercosis porcina y humana (Rodriguez S *et al*, 2009; Sciutto E *et al*, 2007, Sikasunge CS *et al*, 2009; Montano SM *et al*, 2005). La diversidad de la respuesta inmune del huésped y de los antígenos del LV de los cisticercos pueden explicar por qué las pruebas inmunodiagnósticas para la cisticercosis afirman tener muy altos porcentajes de sensibilidad/especificidad al principio, pero conforme las pruebas son usadas más ampliamente los valores tienden a disminuir (Scheel CM *et al*, 2005; Prabhakaran V *et al*, 2007; Ramos-Kuri M *et al* 1992). Esto ocurre también con pruebas de inmunodiagnóstico basadas en proteínas sintéticas o recombinantes, especialmente si fueron seleccionadas en un principio sobre la base de antígenos expresados por cisticercos obtenidos de diferentes cerdos infectados.

La gran diversidad antigénica mostrada aquí debe advertir a aquellos interesados en la búsqueda de nuevas y/o mejores pruebas inmunodiagnósticas o

vacunas para que críticamente seleccionen las muestras antigénicas ya que no todos los parásitos ni todos los huéspedes proporcionarán los mismos resultados. El uso de mezclas antigénicas complejas, como los líquidos vesiculares, como herramientas de diagnóstico de la cisticercosis por *T. solium* debe desalentarse, mientras que el uso de antígenos purificados debe promoverse.

## Conclusiones

### **Análisis de los 2D-IgG inmunoblots en el modelo murino: *Taenia crassiceps***

Los 2D IgG-inmunoblots demostraron una gran singularidad en la percepción inmunológica del parásito *T. crassiceps* por parte de cada huésped, la cual pudiera generar diversidad en las cargas parasitarias y en la evolución de la infección cisticercosa. Ésta diversidad en las cargas parasitarias se asocia claramente con el fondo genético de los ratones, con su sexo y con cada ratón individual, pero no así la  $\Sigma$  “spots” que sólo se asocia significativamente al fondo genético y al individuo *per se*. Dicha diversidad individual en  $\Sigma$  “spots” puede originarse en la variación entre los parásitos del inóculo y otros factores asociados a la individualidad de cada interacción ratón/cisticercos. .

Si se quisiera detectar mediante un ensayo serológico a los 30 ratones utilizados en el estudio en este estadio de la infección, se requeriría de un mínimo de nueve spots distintos.

A partir de las correlaciones significativas entre las casillas se pudo crear una red donde cada nodo representa una casilla y las conexiones entre ellas corresponden a las correlaciones significativas, las cuales están más estrechamente conectadas en las cepas de resistencia media y resistente (C3HeB/FeJ y C57BL/6J) que en la susceptible (Balb/cAnN).

Finalmente, con este modelo de cisticercosis se desarrolló un poderoso método de análisis de imágenes en 2-Dimensiones de manera numérica, que da como resultado un número de inferencias estadísticas válidas que permiten estudiar a profundidad la magnitud de las causas de la variabilidad individual en la relación hipotética entre la reacción antígeno/anticuerpo y la susceptibilidad/resistencia del huésped a un

patógeno y que además permiten calcular las dimensiones de dicha diversidad.

**Análisis de la variabilidad antigénica/inmunológica en la infección natural:  
*Taenia solium* en cerdos.**

Se demostró la existencia de diversidad en las proteínas que los cisticercos del parásito, *T. solium*, expresan en diferentes huéspedes infectados mediante el análisis de imágenes de proteínas separadas en 2-Dimensiones del LV de cisticercos aislados de diferentes cerdos. El análisis de los posteriores 2D-IgG inmunoblots demostraron que esa diversidad de proteínas es causa de diversidad en el reconocimiento de las mismas por los cerdos.

Además, si se quisiera detectar por medio de un ensayo serológico a los nueve cerdos utilizados en el estudio, se requeriría de un mínimo de cinco spots. Los spots más frecuentemente reconocidos por las IgG de los sueros de los cerdos son de bajo peso molecular ( $\approx 8$  kDa), por lo que podrían ser miembros de la familia de antígenos de 8 kDa.

Las diferencias encontradas en las proteínas y antígenos expresados por los cisticercos en distintos huéspedes pueden ser debidas a diferencias entre los parásitos, variabilidad del huésped y/o una combinación de ambas.

Las imágenes de proteínas en 2D son más similares entre sí que las imágenes de los 2D-IgG inmunoblots, por lo que la variabilidad de la respuesta inmune IgG de los cerdos sobrepasa por mucho la variabilidad del parásito, aunque esta última es considerable.

Por lo anteriormente expuesto, es relevante considerar la diversidad del parásito y de la respuesta inmune IgG para poder desarrollar mejores pruebas inmunodiagnósticas y vacunas contra la cisticercosis.

## Perspectivas

El presente estudio ha obtenido como resultados: un nuevo método de análisis de imágenes en 2-Dimensiones útil para explorar la diversidad de las mismas; la estimación de la diversidad antigénica de los cisticercos de *Taenia crassiceps* en el modelo murino de cisticercosis; y la estimación de la diversidad tanto proteínica como antigénica de cisticercos de *Taenia solium* aislados de diferentes cerdos naturalmente infectados.

Con base en el mismo, el siguiente paso en el estudio de la cisticercosis es la identificación y obtención antígenos útiles para inmunodiagnóstico serológico de cisticercosis y las correspondientes pruebas para comprobar su uso como método inmunodiagnóstico. Asimismo, ampliando el número de individuos utilizados en el estudio, podrían obtenerse antígenos candidatos útiles para vacunación, correlacionando los spots con las cargas parasitarias o con la resistencia de los cerdos a la infección.

Sin embargo, el potencial del método aquí desarrollado puede ser utilizado para estudiar otras muchas enfermedades o patologías de interés, como por ejemplo el Cáncer de Mama, donde podría ser aplicado con éxito para estudiar la diversidad de ésta enfermedad en pacientes, y con base en ello, poder proponer un método de inmunodiagnóstico temprano para la misma, ya que se sabe que pacientes con cáncer de mama desarrollan anticuerpos contra antígenos tumorales años antes de la aparición del tumor.

## Referencias

- Allen JE, Lawrence RA, Maizels RM. APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. *Int. Immunol.* 1996; 8(1):143-151.
- Allen JE, Loke P. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol.* 2001; 23(7): 345-352.
- Arruda GC, da Silva AD, Quagliato EM, Maretti MA, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Trop Med Int Health.* 2005;10(10):1005-12.
- Atluri SRV, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Evaluation of excretory secretory and 10–30 kDa antigens of *Taenia solium* cysticerci by EITB assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *Parasite Immunol.* 2009; 31(3):151-155.
- Atluri SRV, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Neurocysticercosis: immunodiagnosis using *Taenia solium* cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children. *Acta Trop* 2009; 110(1): 22-27.
- Baig S, Damian RT, Morales-Montor J, Ghaleb A, Baghdadi A, White AC Jr. Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease. *Microbes Infect.* 2006; 8(12-13): 2733-2735.
- Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes MdelR, Duarte-Escalante E, Vega R, de Aluja AS, Zúñiga G, Morales J, Larralde C, Sciutto E. Genetic diversity of *Taenia solium* form naturally infected pigs of central Mexico. *Vet Parasitol.* 2010; 168(1-2):130-135.
- Campbell G, Garcia HH, Nakao M, Ito A, Craig PS. Genetic variation in *Taenia solium*. *Parasitol Int.* 2006; 55 Suppl: S121-6.
- Cistimex. Ciclo de Vida de *Taenia solium*. URL: [http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/Capi1\\_1.html](http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/Capi1_1.html)

- de Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Zamora C, Sciutto E. *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol.* 1999; 81(2):129-35.
- De Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernández M, Sciutto E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol.* 1996; 61(1-2):49-59.
- De Aluja AS. Cysticercosis in the pig. *Curr Top Med Chem.* 2008; 8(5):368-74
- de Aluja AS. IV Cisticercosis Porcina en México. Cistimex UNAM México. URL: <http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1.html#capitulo4>.
- de Aluja AS. Laboratory animals and official Mexican norms (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica De México.* 2002; 138(3): 295-298.
- Deckers N, Dorny P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Trends parasitol.* 2010; 26(3): 137-44.
- Dos Santos DM, Talvani A, Guedes PM, Machado-Coelho GL, de Lana M, Bahia MT. Trypanosoma cruzi: genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Exp Parasitol.* 2009; 121(1):8-14.
- Espíndola NM, Vaz AJ, Pardini AX, Fernandes I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002; 96(4):361-8.
- Ferrer E, Bonay P, Foster-Cuevas M, González LM, Dávila I, Cortéz MM, *et al.* Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 152(1); 90-100
- Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Sciutto E, Larralde C. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104(4):243-50.

- Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yáñez O, Piña J, Carrillo-Mezo R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(6):551-8.
- Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.* 2003;87(1):43-51.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T, Sciutto E. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology.* 1996;112 ( Pt 1):119-24.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernández M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun.* 1998;66(2):760-4.
- Fragoso G, Meneses G, Sciutto E, Fleury A, Larralde C. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J Parasitol.* 2008;94(2):551-3.
- Garcia G, Sciutto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, Flores I, Aluja A, Jose MV, Larralde C. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol.* 2001;87(3):582-6.
- Gomes AB, Soares KA, Bueno EC, Espindola NM, Iha AH, Maia AA, Peralta RH, Vaz AJ. Comparative evaluation of different immunoassays for the detection of *Taenia solium* cysticercosis in swine with low parasite burden. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(6):725-31.
- Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol.* 2005, 27,395-405.
- Haag KL, Gottstein B, Ayala FJ. Taeniid history, natural selection and antigenic diversity: evolutionary theory meets helminthology. *Trends in Parasitol.* 2007; 24(2): 96-102.



- Hancock K, Broughel DE, Moura INS, Khan A, Pieniazek NJ, Gonzalez AE, *et al.* Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *Int J Parasitol.* 2001; 31:1601– 7.
- Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, Tsang VC. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(6):2577-86.
- Hardy E, Castellanos-Serra LR. "Reverse-staining" of biomolecules in electrophoresis gels: analytical and micropreparative applications. *Anal Biochem.* 2004; 328(1):1-13.
- Ito A, Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H. Mitochondrial DNA of *Taenia solium*: From Basic to Applied Science. In: Singh G and Prabhakar S, ed. *Taenia solium* cysticercosis: From Basic to Clinical Science. Wallingford, United Kingdom: CABI; 2002: 47-55.
- Ito A, Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, Okamoto M, Sato MO, *et al.* Multiple genotypes of *Taenia solium*--ramifications for diagnosis, treatment and control. *Acta Trop.* 2003; 87(1):95-101.
- Kraft R. Cysticercosis: an emerging parasitic disease. *Am Fam Physician.* 2007;76(1):91-6
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114(9):926-8.
- Lee EG, Bae YA, Kim SH, Díaz-Camacho SP, Nawa Y, Kong Y. Serodiagnostic reliability of single-step enriched low-molecular weight proteins of *Taenia solium* metacestode of American and Asian isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104(10): 676-683.

- Lescano AG, Garcia HH, Gilman RH, Gavidia CM, Tsang VC, Rodriguez S, Moulton LH, Villaran MV, Montano SM, Gonzalez AE; Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis hotspots surrounding tapeworm carriers: clustering on human seroprevalence but not on seizures. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(1):e371.
- Lescano AG, Garcia HH, Gilman RH, Guezala MC, Tsang VC, Gavidia CM, Rodriguez S, Moulton LH, Green JA, Gonzalez AE; Cysticercosis Working Group in Peru. Swine cysticercosis hotspots surrounding *Taenia solium* tapeworm carriers. Am J Trop Med Hyg. 2007;76(2):376-83.
- Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopex-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, *et al.* Detection of Genetic variation in *Taenia solium*. J Parasitol. 2003; 89:1250– 4.
- Medawar PB. The Uniqueness of the Individual. New York, USA: Basic Books; 1957.
- Montano SM, Villaran MV, Ylquimiche L, Figueroa JJ, Rodriguez S, Bautista CT, *et al.* Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. Neurology. 2005; 65(2):229-33.
- Moore AC, Lutwick LI, Schantz PM, Pilcher JB, Wilson M, Hightower AW, Chapnick EK, Abter EI, Grossman JR, Fried JA, *et al.* Seroprevalence of cysticercosis in an Orthodox Jewish community. Am J Trop Med Hyg. 1995;53(5):439-42.
- Morales J, Martínez JJ, Garcia-Castella J, Peña N, Maza V, Villalobos N, Aluja AS, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E. *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. Ann Trop Med Parasitol. 2006;100(2):123-35.
- Morales J, Martínez JJ, Rosetti M, Fleury A, Maza V, Hernandez M, Villalobos N, Fragoso G, de Aluja AS, Larralde C, Sciutto E. Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(9):e28

- Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltrán C, Villalobos N, Aluja A, Rodarte LF, Sciutto E, Larralde C. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2002; 30;108(1):41-8.
- Morales-Montor J, Larralde C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taeniocrassiceps*. *Parasitology.* 2005;131(Pt 3):287-94.
- Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology.* 2002; 124:657–62.
- Ostle B. *Estadística Aplicada*. 1ª edición, México DF, 1973: Limusa-Wiley.
- Peralta RH, Espíndola NM, Pardini AX, Iha AH, Moura H, Barr JR, Vaz AJ, Peralta JM. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Exp Parasitol.* 2010;124(3):295-300.
- Prabhakaran V, Rajshekhar V, Murrell KD, Oommen A. Conformation-sensitive immunoassays improve the serodiagnosis of solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(6): 570-577.
- Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noel W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJM, De Baetselier P, Ghassabeh GH. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J. Leukoc.* 2005; 77(3):321-7
- Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. *Arch Neurol.* 1992; 49(6): 633-636.

- Recker M, Buckee CO, Serazin A, Kyes S, Pinches R, Christodoulou Z, Springer AL, Gupta S, Newbold CI. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* malaria involves a highly structured switching pattern. *PLoS Pathog.* 2011; 7(3): e1001306. doi:10.1371/journal.ppat.1001306.
- Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, Pretell EJ, Brandt J, Lescano AG, *et al.* Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 2009; 199(9):1345-52.
- Rodriguez-Sosa, M.; Satoskar, A.R.; Calderon, R.; Gomez-Garcia, L.; Saavedra, R.; Bojalil, R.; Terrazas, L.I. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect. Immun.* 2002,70,3656-3664.
- Rópolo AS, Touz MC. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *ScientificWorldJournal.* 2010; 10:2019-31.
- Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4439-44.
- Sato MO, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. *J Infect Dis.* 2006; 194(12):1783-90.
- Scheel CM, Khan A, Hancock K, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VC; Cysticercosis Working Group in Peru. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(4):771-6.
- Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos MN, *et al.* Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol.* 1995; 60(1-2):53-67.

- Sciutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunol.* 2007; 29(12):621-36.
- Sciutto E, Fragoso G, de Aluja AS, Hernández M, Rosas G, Larralde C. Vaccines against cisticercosis. *Curr Top Med Chem.* 2008; 8(5):415-23.
- Sciutto E, Fragoso G, Diaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res.* 1991;77(3):243-6.
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lactette JP, Sotelo J, de Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection.* 2000;2(15): 1875-1890
- Sciutto E, Fragoso G, Larralde C. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunol.* 2011;33(1):79-80. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01257.x.
- Sciutto E, Martínez JJ, Huerta M, Avila R, Fragoso G, Villalobos N, de Aluja A, Larralde C. Familial clustering of *Taenia solium* cisticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet Parasitol.* 2003; 116(3):223-239
- Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos NM, Hernández M, José MV, Beltrán C, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol.* 1998; 79(4):299-313.
- Shukla N, Husain N, Jyotsna, Gupta S, Husain M. Comparisons between scolex and membrane antigens of *Cysticercus fasciolaris* and *Cysticercus cellulosae* larvae for immunodiagnosis of neurocysticercosis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41(6):529-24.
- Sikasunge CS, Johansen MV, Phiri IK, Willingham AL 3rd, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol.* 2009; 160(3-4):242-50.

- Suzuki LA, Arruda GC, Quagliato EM, Rossi QL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(2):152-5.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. 2011;28(10):2731-9.
- Terrazas LI. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. Curr Top Med Chem. 2008, 8(5):383-92.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 1998;84(1):74-81.
- Vargas MG, Saldierna U, Navarro FR, Acevedo HA, Flisser A y de Aluja AS (1986), "Localización del cisticerco de la *Taenia solium* en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria", Veterinaria México 17:275-280 en IV. Cisticercosis Porcina en México. de Aluja AS. Cistimex UNAM México. URL: <http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1.html#capitulo4>.
- Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, Ferreira AW. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. Am J Trop Med Hyg. 1997;57(3):354-7.
- Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Sciutto E, Larralde C, Fragoso G. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. Int J Parasitol. 2003;33(13):1479-85
- Villa, O.F. and Kuhn, R.E. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and

downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 1996, 112, (Pt 6): 561-570.

- Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A, Larralde C. Analysis of Antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J Parasitol.* 1962; 68(1):39-47.

## Artículos publicados

A1- Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: the case of IgG response in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis.

A2- Protein and antigen diversity in the vesicular fluid of *Taenia solium* cysticerci dissected from naturally infected pigs

A3- Budding of *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals.

A4- Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to focus on the challenge

A5- Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis.





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Immunological Methods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jim](http://www.elsevier.com/locate/jim)

## Research paper

Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: The case of IgG response in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis

Pedro Ostoa-Saloma\*, Marcela Esquivel-Velázquez, Pedro Ostoa-Jacobo, Carlos Larralde

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria; México 044510, D.F., México

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 11 July 2009

Received in revised form 18 September 2009

Accepted 22 September 2009

Available online 1 October 2009

## Keywords:

Image analysis

2D immunoblot

Cysticercosis

*Taenia crassiceps*

## ABSTRACT

A procedure is described to measure the diversity and enrich the meaning and usefulness of the information contained in 2D immunoblot images of the reaction between a complex mixture of parasite antigens and the complex set of antibodies usually present in the sera of infected individual hosts. The procedure and results are illustrated by the experimental infection of 30 mice (three strains, both sexes, 5 mice in each strain  $\times$  sex combination) with *Taenia crassiceps* cysticerci, thirty days after the challenge. The exercise revealed a significant positive correlation of parasite loads with the hosts' IgG response, in association with their genetic background and less clearly with their sex, all in the midst of a remarkable diversity of both response variables among individual mice. After superimposing a  $10 \times 10$  grid upon the 2D immunoblots some 10% of the positive grid-cells (those who had at least one spot) were positively correlated, suggesting shared epitopes between different antigen spots and/or similar factors controlling different antibody-producing cell clones. Also, a significant correlation was found between many of the positive grid-cells with high values of  $\sum$ parasites, but none with low. Thus, the procedure provided many clues for the selection of antigen spots useful to improve immunodiagnosis of cysticercosis and weakened the inclusion of any as vaccine candidate(s). However, some 16 antigen spots were shared almost exclusively by the resistant strains and could relate to protection. The procedure here illustrated may be used in other infections to assess and identify the relevance of antibodies in diagnosis and prevention, as well as provides a measurement of the expected diversity in the hosts' antibody response to the pathogen and of the possible relations between the individual responses towards different antigens contained in the mixture.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Bidimensional immunoblots (2D immunoblot) intensify the sensitivity of Western Blot in the detection of the different antigens and immunoglobulins participating in an antibody response of immunized subjects to complex antigen mixtures. However, 2D immunoblots are usually visually examined in search of rather gross similarities and differences with

control sera, thus discarding adjacent image features. The statistical confidence of such visual inferences is not measurable, nor it's richness exploitable for basic or applied considerations. Here we present in detail our strategy in analyzing 2D immunoblots, which outputs reliable statistical inferences concerning the relationship between the individual host parasite loads ( $\sum$ parasites) and the number of parasite antigens ( $\sum$ spots) detected by the host's serum IgG antibodies. As ways to illustrate the usefulness of more thorough analysis of 2D immunoblots, we used the convenient infection of mice with *Taenia crassiceps* to easily assess the individual hosts' variation in parasite loads with respect to other factors of the hosts, such as sex and genetic background, and/or reliably select the antigens best fit to

\* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM. AP 70228 CP.04510 México D.F., México. Tel.: +52 5 556223854; fax: +52 5 55503982.

E-mail address: [postoa@unam.mx](mailto:postoa@unam.mx) (P. Ostoa-Saloma).

use in immunodiagnosis or vaccination against cysticercosis. Thus, antigen detection by the host would be used as the criterion to identify the antigens to be sequenced, cloned, and eventually produced in massive quantities for their application. Accordingly, we devised a systematic statistical analysis of the 2D immunoblot images of the reactions of IgG antibodies from infected individual mice with the pooled antigens in the vesicular fluid of *T. crassiceps* cysticerci. Focus was placed in search of antigens significantly associated with low or high parasite loads, the insignia of sex and genetic background related mouse differences in restricting or promoting parasite growth in infected mice.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mice, parasites, and infection

Naïve adult male and female mice from C57BL/6J and C3HeB/FeJ (resistant) and BALB/c AnN (susceptible) strains were obtained from our animal facilities and intraperitoneally infected with disrupted *T. crassiceps* (Fragoso et al., 2008).

Thirty days after infection, the mice were anesthetized and euthanized according to the institutional guidelines in order to count in each individual mouse the number of cysticerci recovered by extensive washing of the peritoneal cavity. After centrifugation (14,000 rpm) of the clotted blood samples, the serum of each mouse was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Preparation of *T. crassiceps* antigens

Soluble antigens in the vesicular fluid of *T. crassiceps* cysticerci were collected by the procedure previously described (Toledo et al., 2001). Briefly, hundreds of cysticerci harvested from one infected donor female BALB/c AnN mouse were collected and extensively washed in ice-cold PBS containing 100 µg/ml antibiotics (penicillin/streptomycin). The cysticerci were then suspended in a minimal amount of distilled water and fractured by freeze–thawing in the presence of a proteinase-inhibitor cocktail (Amersham) and then centrifuged (25,000 rpm; 30 min;  $4^{\circ}\text{C}$ ). The Bradford assay (reagents from Bio-Rad, Hercules, California) was used to determine the protein concentration (2.2 mg/ml) of the recovered supernatant, which included the mixture of soluble *T. crassiceps* antigens (TcAg). Aliquots (50 µl) were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and discarded after use.

### 2.3. Two-dimensional electrophoresis and immunoblot

Thirty 2-D electrophoreses of TcAg were performed to permit each of the 30 sera to react individually with the TcAg in a subsequent immunoblot.

Isoelectric focusing was done by using a Protean IEF Cell (Bio-Rad). TcAg (120 µg) was mixed with rehydration buffer containing 6 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 0–4% (w/v) DTT, 0–5% IPG buffer and 0–0.02% (w/v) bromophenol blue (all reagents were from Bio-Rad). The samples were loaded onto IPG strips (pHi: 3–10; Bio-Rad) by using a rehydration/equilibration tray and were electro-focused for a total of 10,000 V-h. The second-dimension electrophoresis was performed on Ready Gel precast 10–20% SDS-PAGE gels (160 × 160 × 1 mm) with constant current (25 mA).

The separated proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membranes (20 V; 1 h) by using a Trans-Blot SD Semy Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad); manufacturer's instructions were followed. Each membrane was blocked with 5% skimmed milk powder in PBS containing .3% Tween 20, pH 7.4 (PBS-T) (16h;  $4^{\circ}\text{C}$ ) and then probed with 1/1000 dilution of a serum in fresh blocking solution (5h; room temperature). Bound antibodies were detected by incubation (1 h; room temperature) with HRP-conjugated second antibody (goat anti-IgG mouse; ZIMED), diluted 1/2500 in PBS-T. Detection of second antibody binding was made by incubating with DAB substrate (.5 mg/ml; 10–15 min). Exhaustive rinsing with PBS-T was performed between each step.

### 2.4. Image analysis

The resulting thirty 2D immunoblot images were analyzed by three methods: by visually assessed contrasts among them; by counting the total number of unique spots ( $\sum$  spots); and by counting the total spot-positive grid-cells ( $\sum^{+}$  Grid-Cell), the cells of a 10(MW) × 10(pHi) superimposed grid divisions containing at least one positive spot.

Immunoblots were scanned by using an HP Scanjet 3800 scanner at a resolution level of 1200 DPI. The TIF images were then transformed to the Format 1sc required for analysis by PD Quest (Bio-Rad) and then were transferred to Adobe Photoshop for spot counting, for identification of coordinates of each spot in the immunoblot, and for the calculation of the perimeters of the spots and the location of the coordinates and of the centroids. All immunoblots were studied with the same settings of brightness, contrast, and color to minimize bias. To estimate technical variability of this imaging process, a subset of four randomly selected immunoblots was processed five times in the same manner. A variation of  $\pm 5\%$  in  $\sum$  spots per immunoblot was found. The average variability in the coordinates of the four most prominent spots (i.e., internal controls) located in the center and extreme regions of the immunoblots for MW was 1.8 kDa; for IEF, .02 pH units. The total number of spots counted in the processed image for each mouse was checked for counting error to ensure that no spot was counted twice.

### 2.5. Statistical analysis

The program SPSS 15 was used for statistical analysis. Multivariate ANOVA was used to study the effects of three independent variables (Strains, 3 levels; Sex, 2 levels; Individual Mice, 5 mice per each of the 6 different strain × sex combinations (total mice = 30)), upon two dependent variables ( $\sum$  parasites: numerical and/or categorical (low, medium, high) and total antigen–antibody spots per mouse ( $\sum$  spots: numerical). Linear correlation between  $\sum$  parasites and  $\sum$  spots of each individual mouse was analyzed by Pearson's correlation coefficient. To probe deeper on the images' features, all images were partitioned by a quadratic grid dividing the immunoblot in 10 × 10 equidistant columns (pHi) and rows (MW, kDa). Each grid-cell contained either zero, one or more antigens, regardless of the number of antigens in each grid-cell we attached to the grid-cell the value of 1 ( $^{+}$ Grid-Cell), and 0 if there were none, so as to produce an array of 0s and 1s to score the reactivity of grid-

cells as a binomial variable. Thus, the number and identity of each mouse scoring in each cell was collected for analysis as well as the correlations between each +Grid-Cell with categories of  $\sum$ parasites (low < 11, medium = 11–50, and high > 50) and among each other by way of  $\chi^2$  Kruskal–Wallis non-parametric tests. To measure the diversity in the collection of all individual images required the construction of an Average Image, defined as the squared sum of the number of antigen–antibody spots in each +Grid-Cell of all images, divided by 30, the total number of images. The sum of the squared distances between the numbers of spots in each positive grid-cell of each individual image to that of the Average Image was taken as the measure of that image's contribution to the overall diversity (i.e., Variance). Image diversities were then tested by ANOVA to study the sources of their variation (Strains, Sex, and Individual Mice), their form of distribution and their correlation with categories of  $\sum$ parasites. The statistically significant correlations that occurred between +Grid-Cell in the 30 images, or in some subsets thereof, were interpreted as Networks, in which nodes correspond to the +Grid-Cell involved, connectors to the correlation itself and connections to twice the number of connectors. The ratio of  $\sum$ connections/ $\sum$ spots in each Network was interpreted as the Networks' Connectivity Index (CI). Statistical tests were considered significant at  $P < .05$  and very significant at  $P < .01$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Visual analysis

Table 1 shows all  $\sum$ parasites and  $\sum$ spots of individual infected mice, while Fig. 1 displays all the 30 2D immunoblots. From visual inspection alone it is clear that all infected mice developed the infection but to different degrees (BALB/c AnN being the most permissive strain) and also that all mice detected many antigens in the parasites' vesicular fluid. It is also apparent that none of the mice has equal  $\sum$ parasites, that no images are identical in  $\sum$ spots, and that there are considerable variations in both response variables associated with the Strain of mice, possibly with their Sex, and even between the mice within the same Strain  $\times$  Sex combination. The statistical validity of such inferences is not visually measurable, nor is it immediately apparent which of the antigen(s) would be more appropriate neither for immunodiagnosis nor as a candidate to include in a vaccine preparation.

#### 3.2. Numerical analyses

##### 3.2.1. Of $\sum$ parasites

The statistical analysis by ANOVA shown in Table 2 demonstrates that, as planned,  $\sum$ parasites is significantly associated with Strains (BALB/c AnN being the most permissive) and somewhat weakly with Sex when all Strains are considered ( $P = .059$ ), excepting BALB/c AnN, in which female mice carry significantly higher parasite loads than males ( $P = .046$ ), as is also indicated by the significant (Strain  $\times$  Sex) first order interaction ( $P = .000$ ). The above results were expected from previous experience (Fragoso et al., 2008) and were in fact sought-after in the experimental design as a way to induce diversity in parasite loads to enable

its relations with the hosts' antibody response. The huge Error Variance in  $\sum$ parasites (84,488.800 Table 2) cannot be ascribed to technical error in counting visible cysticerci, it rather describes the uniqueness of each individual host–parasite interaction, possibly varying in the hosts' state of permissiveness at the time of infection (i.e., concomitant infections; social hierarchy and the stress involved (Banerjee et al., 1999; Dréau et al., 2000); endocrine status, especially of females at the time of infection (Vargas-Villavicencio et al., 2005) and/or in the possible differences in each of the inoculated larvae's innate capacity to establish and reproduce in the intermediary host. (Everhart et al., 2004).

##### 3.2.2. Of $\sum$ spots

Table 2 also shows that  $\sum$ spots is significantly associated with Strains (BALB/c AnN being the most responsive) ( $P = .048$ ) and not with Sex ( $P = .481$ ). The individual variation in  $\sum$ spots was also huge, even between the mice within the same Strain  $\times$  Sex combination. These results immediately suggest that the procedure of analysis of a 2D immunoblot, at this level of discrimination between particular spots, is capable of discerning diminutive differences in antigen perception among the individual infected mice. The huge estimate of Error Variance in  $\sum$ spots ( $V_e = 19,208.000$  Table 2) may come from several sources ( $V_e = V_{\text{technical}} + V_{\text{mice}} + V_{\text{parasites}}$ ). Provided that  $V_{\text{technical}}$  is kept at a minimum or at least measured, the remaining variance indicates microdiversity among the inbred mice of the Strains employed and from within each of the Strain  $\times$  Sex combination, or among the inoculated larvae, respectively. This is a major asset of this procedure of analysis since these levels of microdiversity are usually put aside as technical error or assumed to be minimal, when they are really quite measurable and perhaps important to understand the various outcomes of many infections and the one used here.  $V_{\text{mice}}$  in inbred strains may have different origins: a) physiological (i.e., differences in endocrine rhythms may have potential reproductive impact upon parasite growth (Escobedo et al., 2004), especially in female mice (Arteaga-Silva et al., 2009) differences in social hierarchy and the stress derived thereof have been shown among inbred mice living in laboratory conditions to impact parasite growth (Bollinger et al., 2009); b) genetic (there is ample evidence of significant differences in between pretty similar strains of mice (Fragoso et al., 2008); and/or c) immunological (i.e., the IgG repertoire is based on episodes of somatic mutation of B lymphocytes (Tonegawa, 1988). That this procedure of analysis has the potential robustness to detect these subtle contributions to the diversity of the hosts' perception of a parasite is worth remarking.

As for the purpose of antigen selection for immunodiagnosis the study of the frequency of each particular spot allowed the identification of the minimal number of different spots necessary to detect a given percent of the 30 mice. The sum total of spots was 1673, of which 1132 (67%) were spots that differed in their blot coordinates. The most spot-clustered area of the 2D immunoblots was that enclosed between MW = 11.3–59.0 kDa and pHi = 4.2–7.0, where 84% of all spots and 100% of the mice were located. Of all the spots, 765 were spotted by a single mouse each, 243 by 2 mice, 90 by 3 mice, 22 by 4 mice, 9 by 5 mice, 2 by six mice and only 1 by 7 mice.

**Table 1**

Parasite loads ( $\Sigma$ parasites), sums of spots ( $\Sigma$ spots) and Image Variance of each individual female or male mouse from strains of different genetic background and susceptibility to cysticercosis (BALB/c AnN, susceptible; C3HeB/FeJ and C57BL/6J, resistant).

Strain	Mouse #	Females			Mouse #	Males			<i>P</i> spots ♀ vs ♂	<i>P</i> parasites ♀ vs ♂	<i>P</i> variances ♀ vs ♂
		$\Sigma$ parasites	$\Sigma$ spots	Image Variance		$\Sigma$ parasites	$\Sigma$ spots	Image Variance			
BALB/c AnN (susceptible)	1	300	51	1118	6	50	1010	126.4	.05	.05	.05
	2	200	68	233.0	7	180	750	214.7			
	3	500	66	216.1	8	0	78.0	199.9			
	4	260	45	113.4	9	100	70.0	273.2			
	5	200	63	144.8	10	8	77.0	103.2			
Average std. dev.		292.0	58.6	163.8		67.6	80.2	183.5			
		123.8	10.1	57.3		74.4	12.0	68.9			
C3HeB/FeJ (resistant)	11	11	85	318.2	16	2	13.0	78.6	.13	.41	.41
	12	0	67	162.8	17	5	140	98.8			
	13	4	59	1402	18	13	17.0	59.3			
	14	20	68	269.0	19	3	104.0	272.3			
	15	11	135	499.6	20	0	91.0	198.8			
Average std. dev.		9.2	82.8	278.0		4.6	47.8	141.6			
		7.7	30.7	144.1		4.0	45.6	90.7			
C57BL/6J (resistant)	21	0	13	117.6	26	10	250	1103	.62	.91	.91
	22	0	10	80.5	27	0	37.0	174.0			
	23	0	10	107.0	28	1	17.0	78.5			
	24	26	89	281.1	29	16	49.0	147.6			
	25	13	61	126.8	30	14	150	78.4			
Average std. dev.		7.8	36.6	142.6		8.2	28.6	117.7			
		11.6	36.4	79.3		7.4	14.3	42.4			
Column average		103	59	195		27	52.2	147.6			
Column std. devs.		154	33	112		50	34.4	70.8			
<i>P</i> spots, strains	Bc-C3H		.16		Bc-C3H		.22				
	Bc-C57		.32		Bc-C57		.01				
	C3H-C57		.06		C3H-C57		.38				
<i>P</i> parasites strains	Bc-C3H		.01		Bc-C3H		.14				
	Bc-C57		.01		Bc-C57		.22				
	C3H-C57		.65		C3H-C57		.82				

Note the strain and sex associated variability as well as that of individual mice, even within the same strain/sex combinations.

Several combinations, each of nine different spots, managed to include 100% of the mice (Fig. 2), thus providing an ample spectrum of potentially useful and different immunodiagnostic preparations.

In search of vaccine candidates in the complex set of spots, a linear correlation between  $\Sigma$ parasites and  $\Sigma$ spots of each individual mouse was analyzed by Pearson's correlation coefficient and found to be positive, but barely bordered statistical significance ( $P=.06$ ), a finding congruent with the general impression that cysticerci are rather impervious to IgG antibodies (Escobedo et al., 2004; White et al., 1997). This point was further strengthened by finding that most spots scored in the high and medium categories of  $\Sigma$ parasites (Fig. 3). Also, multivariate ANOVA indicated that  $\Sigma$ parasites and  $\Sigma$ spots of individual mice were strongly related ( $P<.01$ ) to their strain's genetic background, while sex differences in  $\Sigma$ spots were only significant in BALB/c AnN, the most parasite permissive and antibody responding strain: another indication that IgG antibodies are either irrelevant or may actually interfere with parasite destruction by other mechanisms which the more restrictive strains seem to utilize. Thus, investing in the synthesis of IgG antibodies would therefore seem costly to the energy budget of the host's immune system, if not even protective of the parasite by possibly shielding vulnerable antigen targets from more effective immunological effector mechanisms (Terrazas et al., 1999; Alvarez et al., 2002; Pérez-Torres et al., 2002; Kapila et al., 2003; Del Rey et al., 2006) and not a promising tool in searching for candidate antigens to

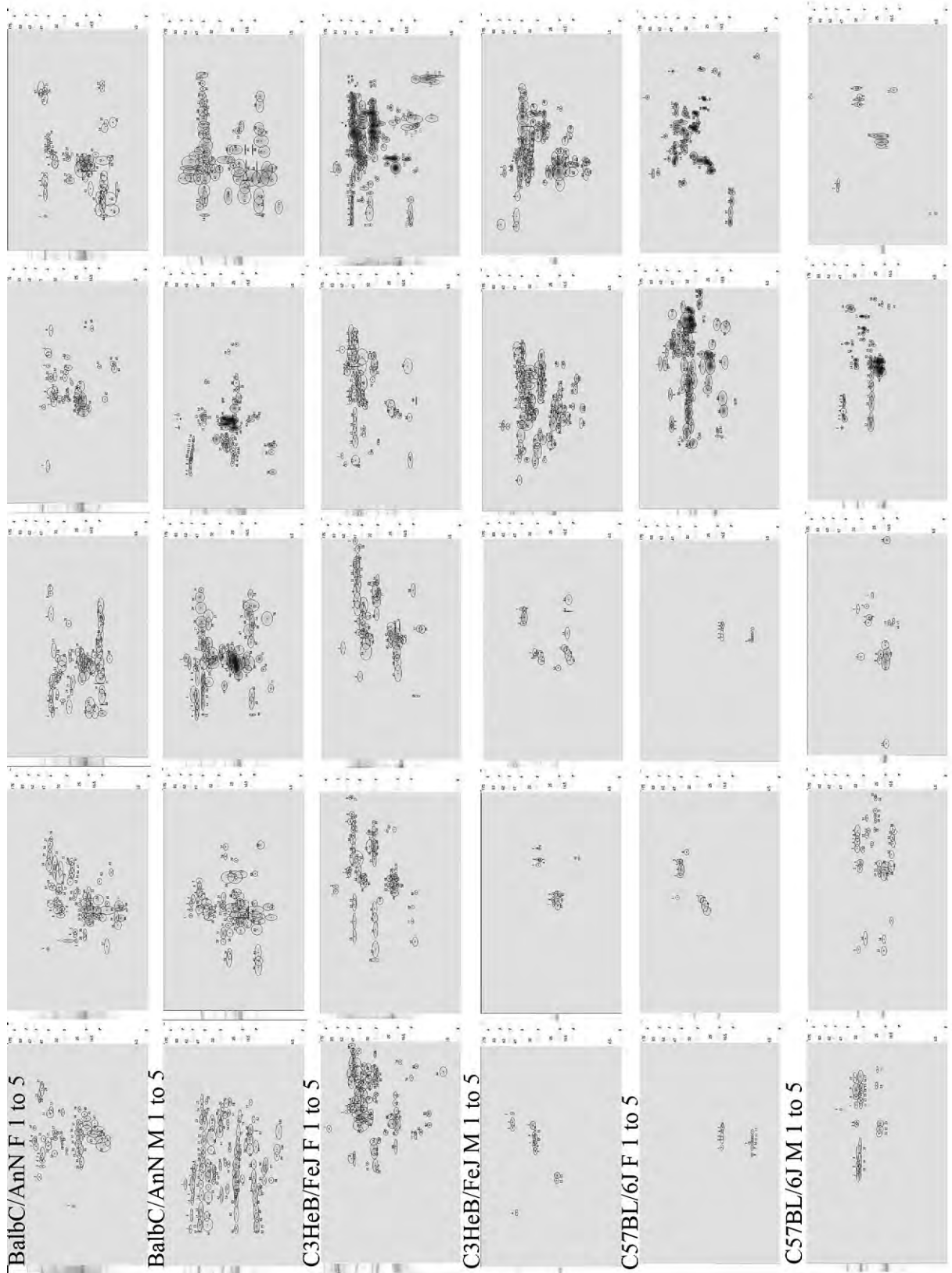
include in an eventual vaccine. Perhaps similar studies detecting other Igs, like those involved in TH1 responses, like IgG1 and IgG2a, or IgE, may fare better.

As a first approximation to numerically measure the Image Diversity of Spots in this experiment, the variance of each individual image with respect to the Average Image was calculated. ANOVA revealed that no significant contributions to the total Image Variance came from the strains' genetic background or sex but most to individual mice. Consequently, no significant correlation of Image Diversity was found with Strains and Sex, nor with categories of  $\Sigma$ parasites. There was however a significant linear correlation of individual Image Diversity with individual  $\Sigma$ spots but not with  $\Sigma$ parasites.

### 3.3. Analysis of <sup>+</sup>Grid-Cells

The quadratic division of immunoblots into 100 Grid-Cells (Fig. 4) was employed to reduce the number of detected antigen-antibody reactions by pooling the antigen-antibody spots within a single Grid-Cell's wider margins of both MW and pHi coordinates. The location and frequency of <sup>+</sup>Grid-Cells (those with at least one spot) allowed the identification of mice that scored at least once in each grid-cell.

The correlation between  $\Sigma$ parasites with the <sup>+</sup>Grid-Cells was then tested by paired  $\chi^2$  correlation between all of the 77 <sup>+</sup>Grid-Cells of the 2D immunoblots with three categories of  $\Sigma$ parasites (low < 11, medium = 11–50, and high > 50). Significant correlation was found between <sup>+</sup>Grid-Cells with high



**Table 2**Multivariate ANOVA statistics of the data shown in Table 1, with Strains and Sex as independent variables and  $\Sigma$ parasites and  $\Sigma$ spots as dependent variables.

Tests of between-subjects effects						
Source	Dependent variable	Type III sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Corrected model	Load	323,977.900 <sup>a</sup>	5	64,795.580	18.406	.000
	Shared spots	.890 <sup>b</sup>	5	.178	2.369	.070
	Unique spots	4653.500 <sup>c</sup>	5	930.700	5.814	.001
	Total spots	12,523.367 <sup>d</sup>	5	2504.673	3.130	.026
	Variance	80,720.567 <sup>e</sup>	5	16,144.113	2.146	.094
Intercept	Load	126,360.300	1	126,360.300	35.894	.000
	Shared spots	58.095	1	58.095	773.465	.000
	Unique spots	19,507.500	1	19,507.500	121.858	.000
	Total spots	93,297.633	1	93,297.633	116.573	.000
	Variance	879,625.633	1	879,625.633	116.915	.000
Strain	Load	198,036.200	2	99,018.100	28.127	.000
	Shared spots	.694	2	.347	4.619	.020
	Unique spots	2089.400	2	1044.700	6.526	.005
	Total spots	8134.467	2	4067.233	5.082	.014
	Variance	31,685.267	2	15,842.633	2.106	.144
Sex	Load	43,548.300	1	43,548.300	12.370	.002
	Shared spots	.052	1	.052	.696	.412
	Unique spots	140.833	1	140.833	.880	.358
	Total spots	381.633	1	381.633	.477	.496
	Variance	16,756.033	1	16,756.033	2.227	.149
Strain $\times$ Sex	Load	82,393.400	2	41,196.700	11.702	.000
	Shared spots	.144	2	.072	.956	.399
	Unique spots	2423.267	2	1211.633	7.569	.003
	Total spots	4007.267	2	2003.633	2.503	.103
	Variance	32,279.267	2	16,139.633	2.145	.139
Error	Load	84,488.800	24	3520.367		
	Shared spots	1.803	24	.075		
	Unique spots	3842.000	24	160.083		
	Total spots	19,208.000	24	800.333		
	Variance	180,566.800	24	7523.617		
Total	Load	534,827.000	30			
	Shared spots	60.787	30			
	Unique spots	28003.000	30			
	Total spots	125,029.000	30			
	Variance	1,140,913.000	30			
Corrected total	Load	408,466.700	29			
	Shared spots	2.692	29			
	Unique spots	8495.500	29			
	Total spots	31,731.367	29			
	Variance	261,287.367	29			

Note the very significant contribution of Strains to the variance of both independent variables, the significance of Sex to  $\Sigma$ parasite and its insignificant contribution to  $\Sigma$ spots, which was limited to that within the BALB/c AnN strain. Also note that the Error MS/Total MS for  $\Sigma$ spots is 3.8 times greater than  $\Sigma$ parasites. Note that discarding all spots spotted by single mice significantly reduces Error MS for  $\Sigma$ spots but results in similar conclusions as to the factors' contributions to variance.

<sup>a</sup>  $R$  squared = .793 (adjusted  $R$  squared = .750).

<sup>b</sup>  $R$  squared = .330 (adjusted  $R$  squared = .191).

<sup>c</sup>  $R$  squared = .548 (adjusted  $R$  squared = .454).

<sup>d</sup>  $R$  squared = .395 (adjusted  $R$  squared = .269).

<sup>e</sup>  $R$  squared = .309 (adjusted  $R$  squared = .165).

categories of  $\Sigma$ parasites (Fig. 3) but not with low categories of  $\Sigma$ parasites. Most significant <sup>+</sup>Grid-Cells are mapped in the zone named Erratic in Fig. 3.

To test the validity of the assumption that <sup>+</sup>Grid-Cells were independent response variables, the correlations existing among the 77 <sup>+</sup>Grid-Cells were calculated by  $\chi^2$  Kruskal–Wallis non-parametric tests. Of all the 2964 different comparisons, 302 (10%) had very significant ( $P < .01$ ) positive (293) or negative (9) correlations: a frequency that greatly exceeds that expected from the cutoff points of significance ( $P < .05$ –.01). Most of the correlating <sup>+</sup>Grid-Cells (69.5%)

mapped in the central region of the 2D immunoblots, where most of the particular spots were located, strengthening the notion that most of the many spots involved are really slightly different versions of fewer antigens, either because of true small chemical differences (i.e., in glycosylation) or because of the sharing of cross-reactive epitopes between different antigens.

The set of statistically significant positive and negative correlations between the 77 <sup>+</sup>Grid-Cells was used to construct a network of considerable complexity using the thirty images, with <sup>+</sup>Grid-Cells acting as nodes, correlations as connectors,

**Fig. 1.** Display of the processed 30 mice 2D immunoblot digitalized images, ordered according to strain and sex (files) and individuals (columns). Image diversity is apparent to the naked eye and seems to differ with strain, sex and individual mice.

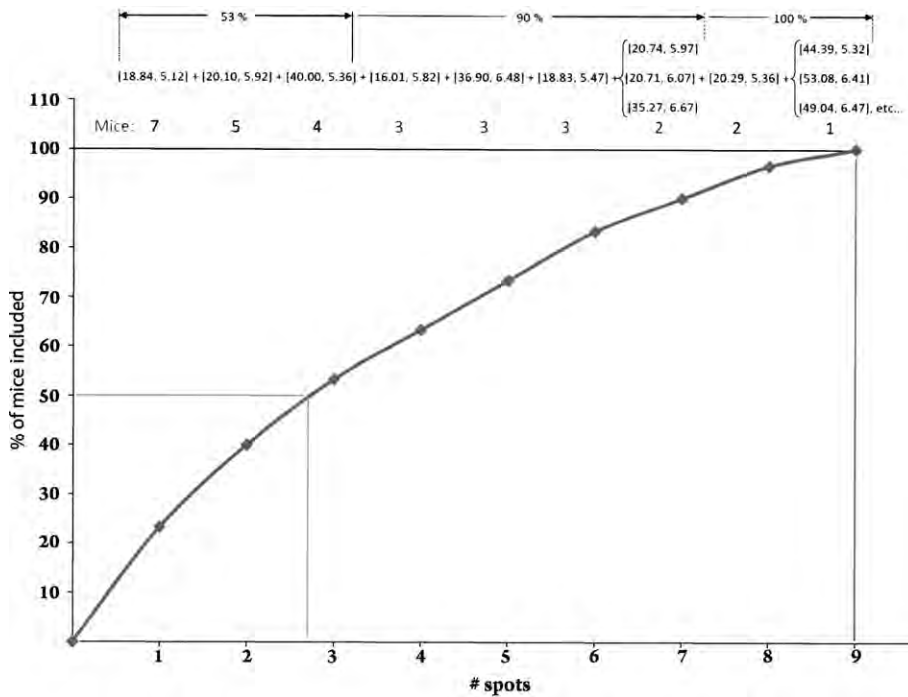


Fig. 2. Plot of the number of different spots to be included in a set of the parasite antigens against their expected sensitivity to detect infected mice. The grey line indicates the number of spots ( $\approx 3$  spots) that would detect 50% of infected mice and the black line, the number of spots that would detect 100% of infected mice (9 spots).

connections twice the number of connectors, and the network's connectivity as its Connectivity Index ( $CI = (\sum \text{connectors}) / (\sum \text{spots})$ ) Table 3. CIs are a novel and intriguing immunological response variable capable of identifying correlations in the host's response to different antigens, possibly rising from shared epitopes between them or from protein micro-poly-

morphism and/or from positive or negative interactions in a presumptive network of antibody-producing B cell clones as recently suggested by a theoretical immunological network (Marengo et al., 2003; Chich et al., 2007; Ribeiro et al., 2007). The # of connections of each single +Grid-Cell (twice the number of correlations of that cell) and the % of connections in

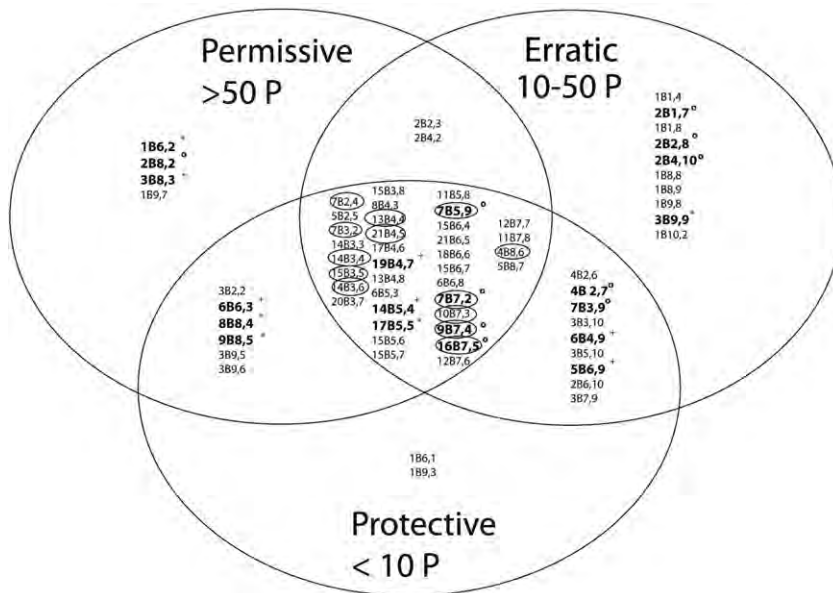


Fig. 3. Venn diagram of the distribution of positive grid-cells and of significantly correlated positive grid-cells in the three categories of  $\sum$  parasites. Positive grid-cells showing significant correlations are circled. (\*:  $P < .05$ ; +:  $.05 < P < .1$ ; °:  $.1 < P < .2$ ).

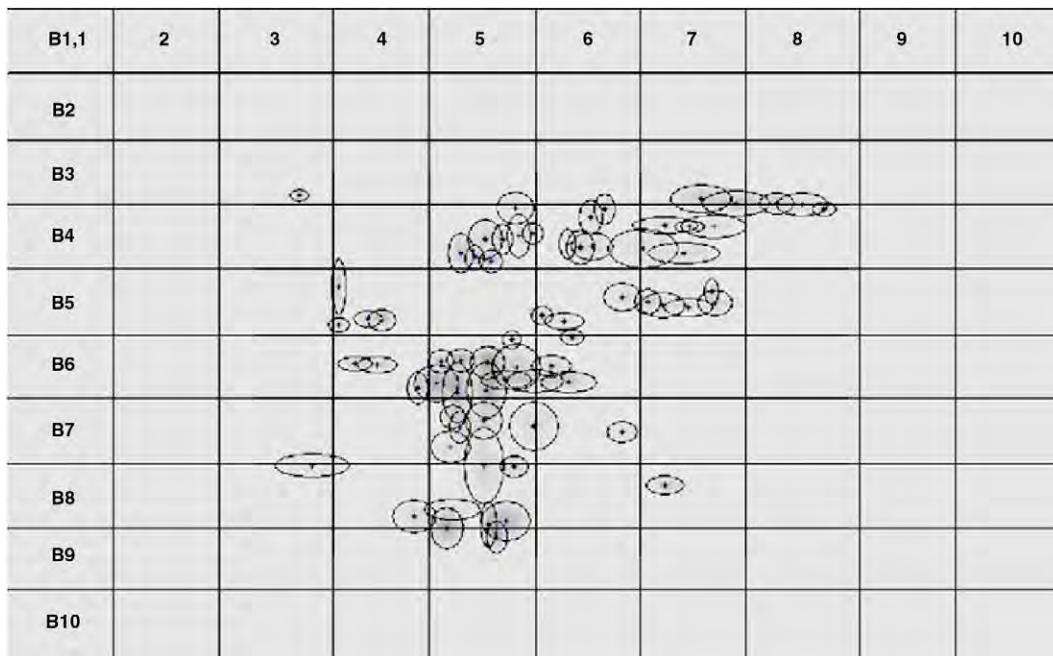


Fig. 4. Quadratic grid dividing as example, one immunoblot in 10×10 equidistant columns.

the network, showed a distribution which shyly pointed to a power law: 29% of spot-positive grid-cells accounting for 50% of the connections. Also, smaller networks of correlated +Grid-Cells were built with data including only mice from each strain or sex. The structures of such smaller networks were also diverse in the identity of the +Grid-Cells connected, in the number of total connectors and in the number of hubs included in each network. The classification of such smaller networks according to their CI's did correlate with Strains of mice (the restrictive genetic background of C57BL/6J and C3HeB/FeJ strains having the higher number of connectors per unit spot) but not with categories of  $\Sigma$  parasites. The networks' CI of C57BL/6J (.81), C3HeB/FeJ (.47) and BALB/c AnN (.37)], is congruent with respect to the strains' permissiveness for growth of *T. crassiceps* cysticerci (Fragoso et al., 1996; Toledo et al., 2001; Fragoso et al., 2008).

The lack of correlation between networks' CI with categories of  $\Sigma$  parasites strengthens the point that genetic background of mice is the major innate determinant of differences in parasite loads of infected mice and is not strongly dependent in IgG antibody synthesis.

**Table 3**  
Estimation of the Connectivity Index (CI).

	Susceptible	Resistant	
	BALB/c AnN	C3HeB/FeJ	C57BL/6J
	$\Sigma$ PL:1798	$\Sigma$ PL: 69	$\Sigma$ PL80
$\Sigma$ connections	259	313	267
$\Sigma$ spots	694	653	326
CI: $\Sigma$ connections/ $\Sigma$ spots	.37	.47	.81

The susceptible strain has minor CI with respect to the resistants.  $\Sigma$ PL:  $\Sigma$ parasite load.

In conclusion, we have described and illustrated a powerful procedure to numerically analyze the rich 2D immunoblot image, which outputs a number of valid statistical inferences, some practical and others novel which may deeply probe into the magnitude and causes of the individual diversity in the hypothetical relations between the antigen-antibody reactions and the susceptibility/resistance of the host to a foreign pathogen.

### Acknowledgments

Financial support was provided by Grant # IN226507-3 (C.L. and P.O.S), from PAPIIT, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México and project # 103151 (POJ) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The authors thank Veronica Yakoleff for editing the English version of the manuscript.

### References

Alvarez, J.I., Londoño, D.P., Alvarez, A.L., Trujillo, J., Jaramillo, M.M., Restrepo, B.I., 2002. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis. *J. Comp. Pathol.* 127, 186.

Arteaga-Silva, M., Vargas-Villavicencio, J.A., Viguera-Villaseñor, R.M., Rodríguez-Dorantes, M., Morales-Montor, J., 2009. *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice. *J. Acta Trop.* 109, 141.

Banerjee, S.K., Aviles, H., Fox, M.T., Monroy, F.P., 1999. Cold stress-induced modulation of cell immunity during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Parasitol.* 85, 442.

Bollinger, T., Bollinger, A., Skrum, L., Dimitrov, S., Lange, T., Solbach, W., 2009. Sleep-dependent activity of T cells and regulatory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 155, 231.

Chich, J.F., David, O., Villers, F., Schaeffer, B., Lutowski, D., Huet, S., 2007. Statistics for proteomics: experimental design and 2-DE differential analysis. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 849, 261.



- Del Rey, A., Roggero, E., Randolph, A., Mahuad, C., McCann, S., Rettori, V., Besedovsky, H.O., 2006. IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16039.
- Dréau, D., Foster, M., Morton, D.S., Fowler, N., Kinney, K., Sonnenfeld, G., 2000. Immune alterations in three mouse strains following 2-deoxy-D-glucose administration. *Physiol. Behav.* 70, 513.
- Escobedo, G., Larralde, C., Chavarria, A., Cerbón, M.A., Morales-Montor, J., 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* 90, 1235.
- Everhart, M.E., Kuhn, R.E., Zelmer, D.A., 2004. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/c mice. *J. Parasitol.* 90, 79.
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Govezensky, T., Sciutto, E., 1996. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* 112, 119.
- Fragoso, G., Meneses, G., Sciutto, E., Fleury, A., Larralde, C., 2008. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J. Parasitol.* 94, 551.
- Kapila, K., Sahai, K., Verma, K., 2003. Semi-quantitative analysis of soft-tissue reactions in fine needle aspirates from tissue cysticercosis. *Cytopathology* 14, 208.
- Marengo, E., Robotti, E., Gianotti, V., Righetti, P.G., Cecconi, D., Domenici, E., 2003. A new integrated statistical approach to the diagnostic use of two-dimensional maps. *Electrophoresis* 24, 225.
- Pérez-Torres, A., Ustarroz, M., Constantino, F., Villalobos, N., de Aluja, A.S., 2002. *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol. Res.* 88, 150.
- Ribeiro, L.C., Dickman, R., Bernardes, A.T., Vaz, N.M., 2007. Dynamic stability in random and scale-free B-lymphocyte networks. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* 75, 31911.
- Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F., Larralde, C., 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* 85, 135.
- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, F., Hernández, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C., Sciutto, E., 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* 69, 1766.
- Tonegawa, S., 1988. Somatic generation of immune diversity. *Biosci. Rep.* 8, 3.
- Vargas-Villavicencio, J.A., Larralde, C., De León-Nava, M.A., Morales-Montor, J., 2005. Regulation of the immune response to cestode infection by progesterone is due to its metabolism to estradiol. *Microbes Infect.* 7, 485.
- White Jr., A.C., Robinson, P., Kuhn, R., 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem. Immunol.* 66, 209.

Research Paper

## Protein and Antigen Diversity in the Vesicular Fluid of *Taenia Solium* Cysticerci Dissected from Naturally Infected Pigs

Marcela Esquivel-Velázquez, Carlos Larralde, Julio Morales and Pedro Ostoa-Saloma 

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, A.P. 70228, México D.F, 04510, México.

✉ Corresponding author: Pedro Ostoa-Saloma, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, Universidad Nacional Autónoma de México. AP 70228, CP 04510. México D.F., México. Tel.: +52 55 56228941. E-mail address: postoa@unam.mx

© Ivyspring International Publisher. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>). Reproduction is permitted for personal, noncommercial use, provided that the article is in whole, unmodified, and properly cited.

Received: 2011.09.01; Accepted: 2011.10.01; Published: 2011.10.25

### Abstract

Cysticercosis caused by *Taenia solium* is a health threat for humans and pigs living in developing countries, for which there is neither a flawless immunodiagnostic test nor a totally effective vaccine. Suspecting of individual diversity of hosts and parasites as possible sources of the variations of the parasite loads among cysticercotic animals and of the limited success of such immunological applications as well as, we explored and measured both in nine cases of naturally acquired porcine cysticercosis. For this purpose, 2-Dimensional IgG immunoblots were performed by reacting the sera of each cysticercotic pig with the antigens contained in the vesicular fluid (VF) of their own cysticerci. We found an unexpectedly large diversity among the proteins and antigens contained in each of the nine VFs. Also diverse were the serum IgG antibody responses of the nine pigs, as none of their 2D- immunoblot images exhibited the same number of spots and resembled each other in only 6.3% to 65.3% of their features. So large an individual immunological diversity of the cysticercal antigens and of the infected pigs' IgG antibody response should be taken into account in the design of immunological tools for diagnosis and prevention of cysticercosis and should also be considered as a possibly significant source of diversity in *Taenia solium*'s infectiveness and pathogenicity.

Key words: cysticercosis, *Taenia solium*, 2D-immunoblots, proteome

### Introduction

Living organisms are unique [1]. Even among members of a same species, individual differences can be found at several levels, from their external appearance to their genomic makeup. Proliferation, diversification and selection are the main driving forces of nature responsible for individual differences. In the context of infection and immunity, these differences contribute in making some individuals susceptible and others resistant to infection, although to different extents and manners. However, in biological experiments, "noise" (ie an unresolved mixture of experimental and biological fluctuations and significant

biological variability) is classically considered a "nuisance" caused by uncontrolled variables and is usually tried to be technically minimized or circumvented by statistical processing of the data. More rarely do biological studies focus on the interpretation of biological variation, because of the difficulties in distinguishing between technical sources from biological ones and from chance alone.

Previous work of our group found in *Taenia crassiceps* cysticercosis a very large variation in the immunological IgG responses of individual mice to the parasite's antigens which we demonstrated was

attributable to differences in the genetic background, sex and individual variation among the infected mice, as well as to variation among the cysticerci contained in each inoculum [2].

Such results in experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis compelled us to look more carefully into the immunological relationship between *T. solium* cysticerci and their porcine hosts, as a possible source of variation of parasite intensity in cysticercotic pigs [3,4], as well as a feasible explanation for the limited success of immunological diagnosis and prevention of porcine cysticercosis [5-8].

In this study we focused our recently developed system of immunoblot image analysis [2] on the variation in the vesicular fluid's (VF's) protein and antigen contents collected from parasites from different naturally infected cysticercotic pigs, as well as in their serum IgG antibodies when displayed by 2D- immunoblots.

## Materials and Methods

### Animals and parasites

All pigs used for this study (7 females and 2 males of 1-3 years of age) had naturally acquired cysticercosis in their skeletal muscles, as confirmed by macro- and microscopic examination, and all came from geographically separate endemic rural villages of similar economical and social profiles in the States of Morelos and Guerrero, Mexico. Blood samples were obtained from the pigs prior to their sacrifice in accordance with the standards established by the Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México [9]. Their sera were then prepared by centrifugation of their clotted blood samples, aliquoted (1 ml each) and frozen at -20°C until use.

### Preparation of *Taenia solium* proteins (VF<sub>i</sub>)

Cysticerci were dissected from the skeletal muscles of each infected pig removing the host capsule very carefully to avoid rupture of the vesicle. All cysticerci collected from the same pig had the same size and appearance, although these characteristics changed among parasites obtained from different pigs. The vesicular fluid (VF) of the parasites was collected individually by puncturing each cysticercus with a scalpel blade and placed in microcentrifuge tubes containing proteinase-inhibitor cocktail (Amersham). A pool of vesicular fluids (VF<sub>i</sub>) was constructed from each pig by mixing equal volumes (5-10 µL) of each VF from 15 individual cysticerci

within the same pig. The individual VF and VF<sub>i</sub> were frozen and stored at -20°C until used.

### Two-dimensional electrophoreses and immunoblots of VF<sub>i</sub> preparations

Briefly, 2D- electrophoresis was performed for each one of the VF<sub>i</sub> preparations. Western Blots were done using the sera from each pig and allowing them to react with the 2D- separated proteins from its corresponding VF<sub>i</sub>. All experiments were performed by duplicate or triplicate to check for their reproducibility. Those antigen spots (protein spots recognized by serum IgGs) that were not present in the two or three replicas of each VF<sub>i</sub> were excluded from the study.

Isoelectrofocusing was performed using a Protean IEF Cell (BIO-RAD). VF<sub>i</sub> (35 µg of protein) in each of the nine preparations was mixed with rehydration buffer containing 6M urea, 2% (w/v) CHAPS, 0.8% (w/v) DTT, 0.8% IPG Buffer and 0.002% (w/v) Bromophenol Blue (all reagents from BIO-RAD). The preparations' samples were loaded onto IPG Strips (pI 3-10 NL, GE Healthcare) using a rehydration/equilibration tray and the IPG strips were then left to rehydrate for 12 hours at room temperature before isoelectric focusing. Isoelectrofocusing was performed for a total of 10,000 Vhrs in three steps: 1) 250 V for 20 min; 2) 4000 V for 2 h; 3) 4000 V until 10,000 Vhrs were reached. The strips were then equilibrated with 0.5% w/v DTT and then with 2.5% w/v iodoacetamide in fresh equilibration buffer (6M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 2% w/v SDS, 20% v/v glycerol) for 10 min each under constant rocking. The second-dimension electrophoresis was performed in a 5% stacking/12% separating gel in denaturing conditions with constant current (25 mA). The 2D- separated proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membranes using a Trans-Blot SD Semy Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD; 20 V, 1h). To confirm the transference of proteins, membranes were reversible-stained using the MEM-CODE Reversible Stain Kit (PIERCE) followed by blocking with 5% (w/v) skimmed milk powder (Svelty) in PBS+0.3% Tween 20 pH 7.4 (PBS-T) for 16 h at 4°C in constant rocking. Then the membranes were incubated with 1:1000 diluted serum of the corresponding pig in fresh blocking solution (5h, room temperature, constant rocking) followed by four 20 mL washes with PBS-T for 10 min each. Bound antibodies were detected by incubation with rabbit anti-pig IgG (H+L; ZYMED) diluted 1:2500 in PBS-T and incubated for 1 h at room temperature and five washes of 20 mL of PBS-T for 10 min each in order to eliminate unbound antibodies. Detection of second antibody binding was made with DAB substrate (SIGMA; 0.1 mg/ml in

PBS-T+ 0.015% peroxide) for 5 min at room temperature and the reaction was stopped by rinsing the membranes three times with tap water.

### Image analysis

For the total protein analysis the 2D- reversible-stained membranes were scanned. For the analysis of the antigens the 2D- immunoblots were scanned. In both cases a HP Scanjet G4050 scanner was used at a resolution level of 300 dpi in TIF format. The digitalized images were then analyzed with the PdQuest™ software (Bio-Rad) for the detection of spots. All images were studied with the same settings of brightness, contrast and color to minimize bias.

### Statistical analysis

The statistical analysis of the 2D images was made using the IBM® SPSS® Statistics Version 19. Univariate ANOVA was used to study the effect of one independent variable (sex, 2 levels) upon one dependent variable ( $\Sigma$  spots). To further analyze the 2D-protein images and the 2D-immunoblots, the images were divided by a Grid of 10x10 equidistant columns (pI) and rows (MW, kDa) [10] (Figure 1). To each of the 100 Grid-Cells, a value of one or zero was assigned according to whether there was at least one

spot inside the Grid-Cell (1 or positive Grid-Cell) or none (0 or negative Grid-Cell). A SPSS database was then constructed with this binary notation [2]. The positive or negative correlations among Grid-Cells were then estimated by way of a Pearson Correlation. Similarity matrices were computed by Distance Similarity Measure using the Dice Measure.  $\chi^2$  non-parametric tests were performed to correlate positive Grid-Cells with host sex. Phylogenetical trees were constructed using the Mega5 Software [11] with the data from the similarity matrices. Statistical tests were considered significantly different at  $P \leq 0.05$  and very significant at  $P < 0.01$ .

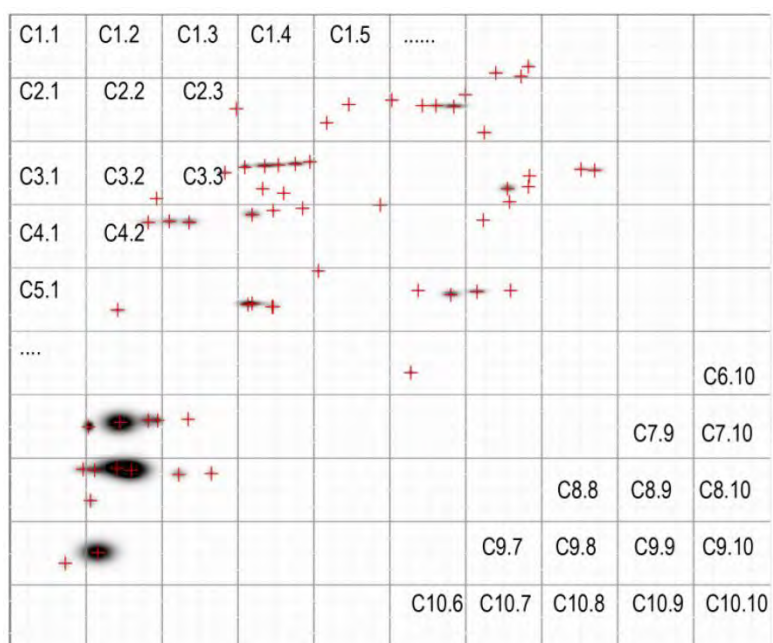
## Results

### 2D- VF<sub>i</sub> protein and immunoblot images

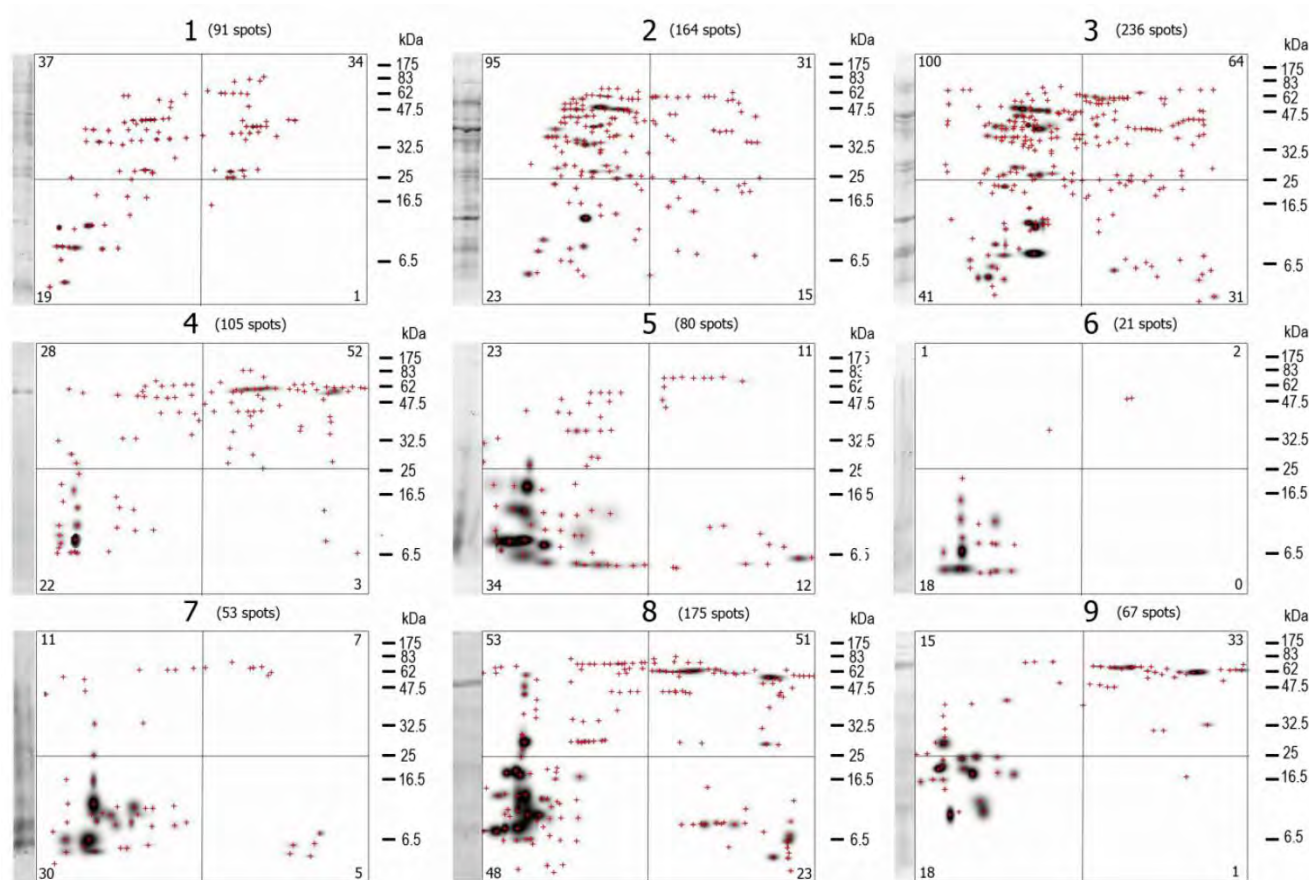
The images of the 2D- separated proteins in the VF<sub>i</sub> differed greatly from one pig to another, as visual analysis reveals (Figure 2). The  $\Sigma$  of *protein spots* was also different among the nine VF<sub>i</sub> (Table 1). There were many individual protein spots shared between the different VF<sub>i</sub>, but not a single one was found in all the nine.

**Table 1.** Sex,  $\Sigma$  spots, Positive Grid-Cells and image variance for the 2D- protein images and the 2D- immunoblots from the nine pigs. From the  $\Sigma$  *protein spots*, only a fraction of them were immunorecognized ( $\Sigma$  *antigen spots*) which is also reflected in the numbers of Positive Grid-Cells in 2D- protein images compared with 2D-immunoblot images. The variance of the 2D-protein images is higher, as well, than the variance of 2D-immunoblots in every case.

Pig	Sex	Characteristics	Age (years)	Infection level	Origin	$\Sigma$ total spots	$\Sigma$ recognized spots	Positive Grid-Cells Total proteins	Positive Grid-Cells in immunoblot	Variance 2-D proteins	Variance 2-D immunoblots
1	♀	Pregnant (8 wks), very aggressive	1	Slightly infected	Morelos	91	60	36	28	158.9	89.7
2	♂	-----	2	Moderately infected	Morelos	164	86	44	27	408.9	259.5
3	♂	-----	1.5	Moderately infected	Morelos	236	91	56	37	801.8	294.5
4	♀	Non pregnant	2	Moderately infected	Morelos	105	20	38	11	167.3	47.5
5	♀	Well fed, 2 months of having given birth	1	Slightly infected	Morelos	80	34	35	20	118.7	57.9
6	♀	Moderate state of malnutrition	1	Highly infected	Morelos	21	7	13	5	200.5	64.5
7	♀	-----	2	Moderately infected	Guerrero	53	22	31	17	166.5	61.0
8	♀	Castrated	3	Moderately infected	Morelos	175	99	52	35	349.0	248.5
9	♀	Non-pregnant	2	Moderately infected	Morelos	67	18	30	10	173.5	62.4



**Figure 1.** Example of the division of a 2D-immunoblot with a 10x10 Grid and the numbering of each Grid-Cell is presented. The same was done for the 2D-protein images.

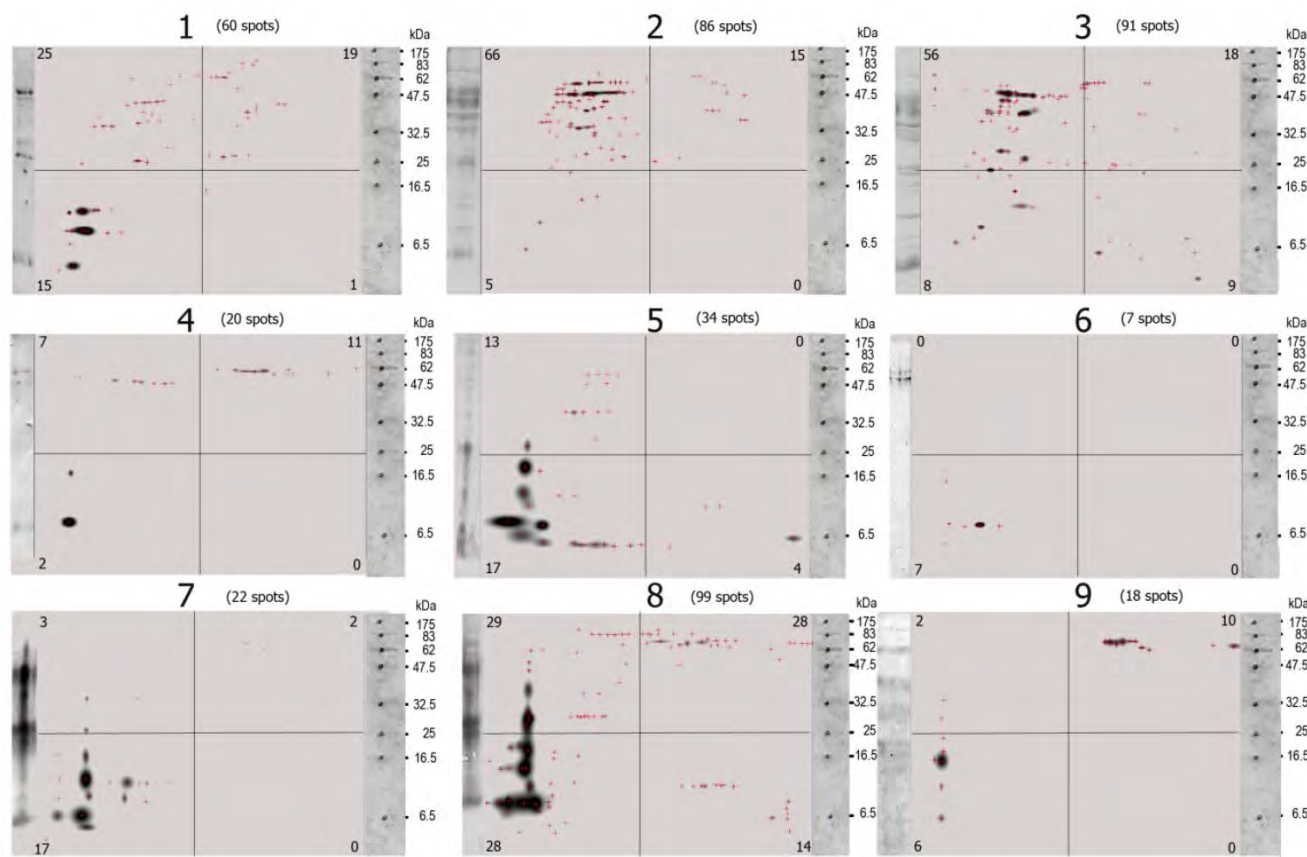


**Figure 2.** The PdQuest processed images (master images) of the nine  $VF_i$  pools separated by 2D- electrophoresis are shown here. Each image corresponds to cysticerici from a different infected pig and each crosshair represents an individual spot. The masters images are divided in 4 parts, the number in the corners of each quadrangle are the number of protein spots inside it. The total number of spots ( $\Sigma$  protein spots) is indicated at the top of each image. Note the similitude and differences among images. Visually there seem to be spots shared by several images. Note also the different number of protein spots in each image. Crosshairs represent spots. The first lane of each image correspond to the 1D-separated proteins.

### Σ antigen spots analysis

A visual analysis of the 2D- immunoblots suffices to prove that none of the immunoblots are identical and that differences among them are large (Figure 3), although some spots (antigen-antibody complexes) seem to be present in more than one VF<sub>i</sub>. The first feature analyzed of the 2D- immunoblots was the

total number of antigen spots ( $\Sigma$  antigen spots) (Table 1). Not a single immunoblot had the same  $\Sigma$  antigen spots. The differences in the  $\Sigma$  antigen spots were not associated to the sex of the pigs (Table 2) but to the individual pigs. Not a single antigen spot of the nine VF<sub>i</sub> was found to be recognized by the serum IgGs of all the nine pigs.



**Figure 3.** The master images of the PdQuested 2D- immunoblots are shown here. The masters images are divided in 4 parts, the number in the corners of each quadrangle are the number of protein spots inside it. The total number of spots ( $\Sigma$  antigen spots) is indicated at the top of each image. Visually, the diversity of the images is evident. Note also the differences in the number of antigen spots among images and among images' quadrangles. Crosshairs represent individual spots. The first lane of each image correspond to the WB of the ID-separated antigens.

**Table 2.** Univariate ANOVA statistics with Sex as independent variable and  $\Sigma$  spots as dependent variable. (Tests of Between-Subjects Effects).

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4102.865a	1	4102.865	4.655	.068
Intercept	24556.198	1	24556.198	27.862	.001
Sex	4102.865	1	4102.865	4.655	.068
Error	6169.357	7	881.337		
Total	31491.000	9			
Corrected Total	10272.222	8			

a. R Squared = .399 (Adjusted R Squared = .314)

### Positive Grid-Cells analysis

As it occurred for the  $\Sigma$  antigen spots, none of the 2D- immunoblots had the same positive Grid-Cells pattern or the same number of positive Grid-Cells (Table 1). The 2D-immunoblot from pig #6 had only five positive Grid-Cells and was the one with the fewer positive Grid-Cells, while pig #3 had the most positive Grid-Cells with 37. If including the 100 Grid-Cells of the nine pigs, 87 of them were positive in the 2D- protein images, and from them 68 were positive in 2D-immunoblots (68/87=78%). A single Grid-Cell which was positive in all the nine pigs' 2D-immunoblots was not found but there was a Grid-Cell positive in eight of the nine 2D- immunoblots and in the nine 2D- protein images. This Grid-Cell comprised 13 different spots within the range 7.65-8.21 for pI and 5.79-8.59 kDa for Molecular Weight. From these 13 protein spots, nine were immunorecognized by at least one serum and from these nine; only five were recognized by more than one serum, but none by the eight sera that resulted positive for that Grid Cell in 2D-immunoblots. Thus showing that not all pigs' sera recognize the same protein spots within the same Grid-Cells or the same number of antigen spots. The antigen spot within this Grid-Cell which was most frequently recognized, it was so by four of the eight sera. There were another 13 Grid-Cells which were positive in more than 50% of the 2D-immunoblots. From these, two Grid-Cells were positive in seven 2D-immunoblots (Grid-Cell 72: 7.65-8.21 pI and 8.59-12.75 kDa MW; Grid-Cell 81: 8.21-8.78 and 7.79-8.59 kDa MW), but as in the previous case, from the protein spots within these Grid-Cells, none was recognized by the seven sera. The most frequently recognized antigen spot was in Grid-Cell 72 which was recognized by five sera (7.94 pI, 10.68 kDa MW). It should be noticed that there were 24 Grid-Cells (24%) which were positive in only a single serum, representing antigens which are immunorecognized only by single pigs. Figure 4B compiles the nine pigs' positive Grid-Cells and the regions of the 2D-immunoblot in which they mapped. Notice that the most recognized Grid-Cells localize in the left and upper regions of the 2D- immunoblot, which correlates with the regions in which most of the proteins were found in the 2D- protein images (Figure 4C). Consequently, for 100% positive serological immunodiagnosis by 2D- immunoblots of the nine pigs

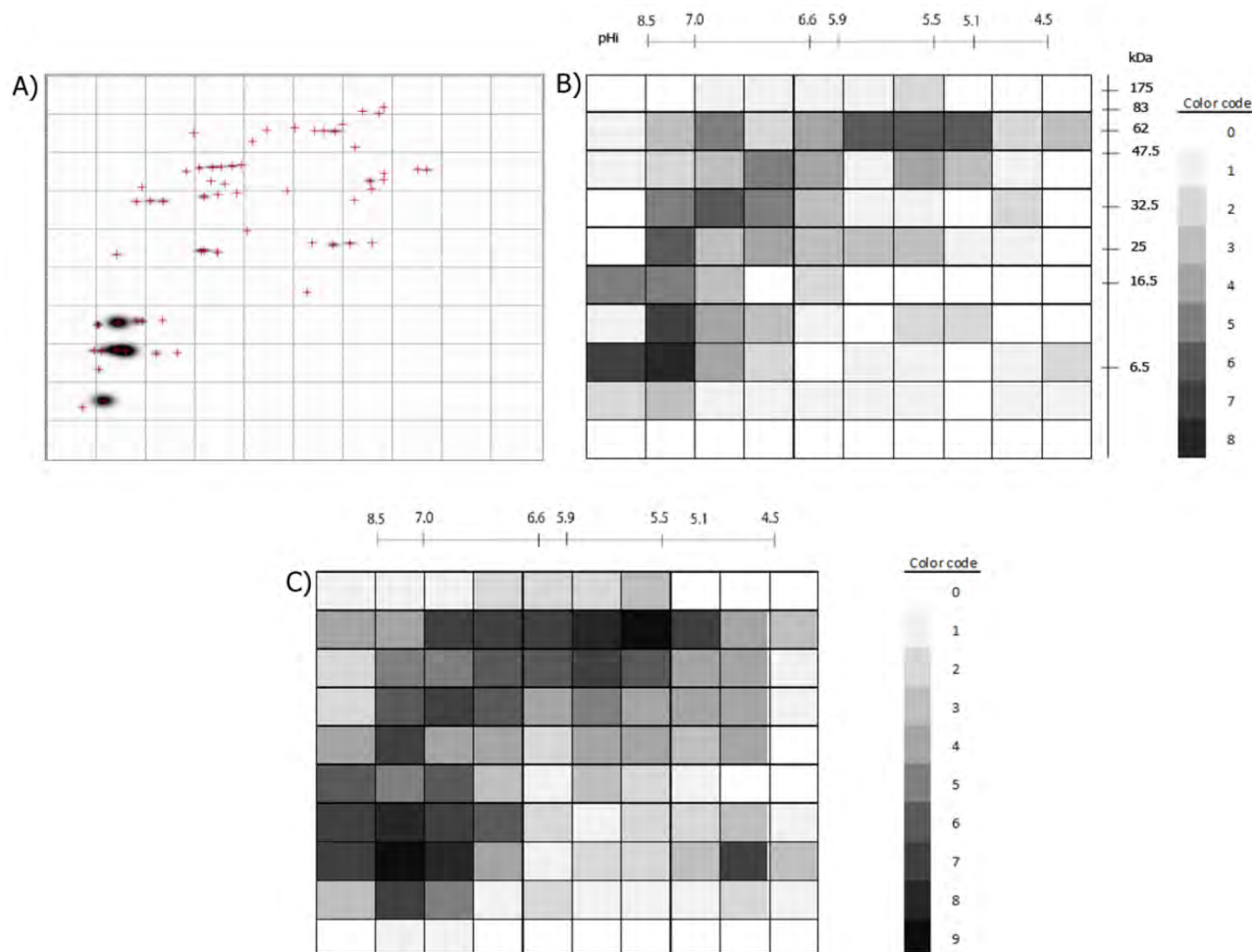
used here it would be necessary to include at least two positive Grid-Cells (Grid-Cell 82: 7.65 - 8.21 pI and 5.79 - 8.59 KDa MW; and any other of these 10 Grid-Cells: 22,23,26-30,34,61 and 81 [eg Grid-Cell 81: 8.21 - 8.78 pI and 5.79 - 8.59 KDa MW]) or at least five different antigen spots (8.13 pI, 8.03 kDa MW; 7.85 pI, 8.03 kDa MW; 8.15 pI, 6.64 kDa MW; 7.99 pI, 5.95 kDa MW; 8.31 pI, 7.81 kDa MW).

Dividing the protein and antigen 2D-images with a 10x10 Grid allowed the estimation of similarities among the images of the nine VF<sub>i</sub> taking into account the position in the 2D- images where spots clustered. For this purpose, a similarity matrix was constructed using the database of the positive and negative Grid-Cells. This matrix showed that the similarities of the 2D- protein images ranged between 28-80% (diversity = 72- 20%), while the similarities of 2D- immunoblots ranged between 6.3% and 65.6% (diversity = 93.7- 34.4%), thus revealing the great diversity of the images obtained. The most similar images were the 2D- immunoblots obtained from pigs #2 and #3 (similarity = 65.6%; diversity = 34.4%), followed by pigs #1 and #2, (similarity = 65.5%; diversity = 34.4 %) and the least similar and more diverse were the ones from pigs #2 and #6 (similarity = 6.3%; diversity = 93.7%) (Figure 5), which correlated with the higher and lowest similarities found among the 2D-protein images (Figure 6).

To assess if there were positive Grid-Cells that correlated with a particular sex, a paired  $\chi^2$  test was performed between all the 68 positive Grid-Cells of the 2D- immunoblots with the two categories of sex (male and female). Only one Grid-Cell correlated significantly with sex ( $p=0.028$ ). This Grid-Cell (4.75 - 5.09 pI and 28.05 - 41.61 MW) was positive in all the males and none of the females, pointing to an antigen (5.05 pI, 39.94 kDa MW) that may be recognized preferentially by one sex over the other.

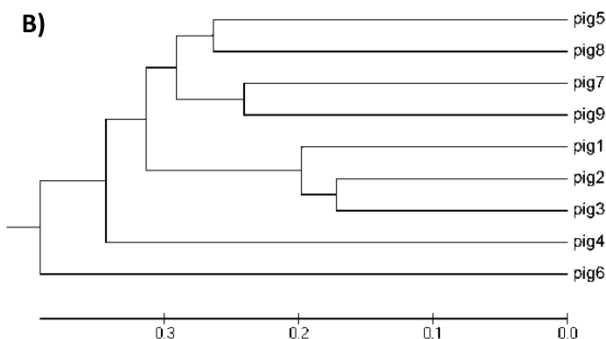
The correlation of the 2D- Immunoblot Grid-Cells among themselves showed a total of 4950 different correlations from which 151 were significant (3.05% - 141 positive and 10 negative): 49 (41 positive, 8 negative) were significant ( $p<0.05$ ) and 102 (100 positive, 2 negative) were very significant ( $p<0.001$ ).

The variances of each 2D- protein and 2D- immunoblot images were calculated to be greater in the 2D- protein images than in the 2D- immunoblots (Table 1).



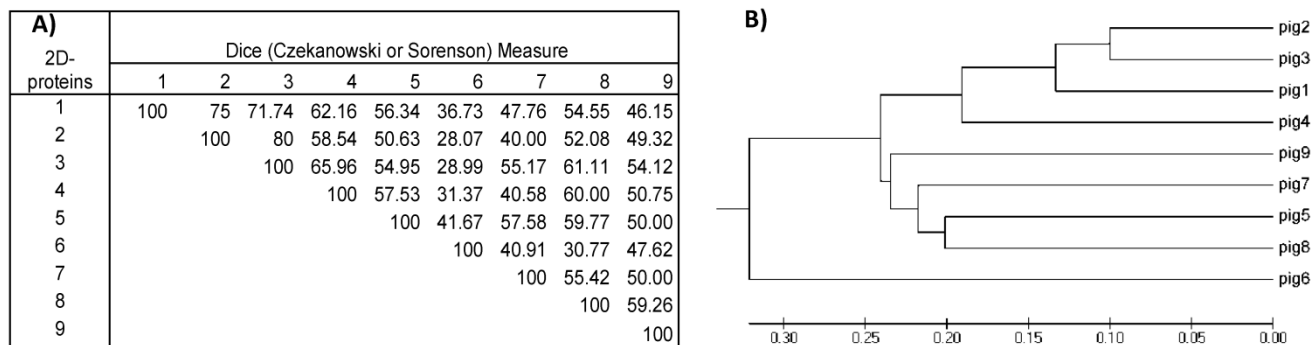
**Figure 4.** A) Example of a processed immunoblot divided by a 10x10 grid. B) The 100 Grid-Cells generated for the 2D-immunoblots are shown. The positive Grid-cells are colored with different intensities, accordingly to if they were recognized by one or more of the nine sera. The color code to the right shows the intensity assigned to each value (number of 2D- immunoblots in which the Grid-Cell was positive). C) Positive Grid-Cells in the 2D- protein images. The color code indicates the numerical value represented by different intensities of gray. Note that the darkest areas in B) correspond to the darkest areas in C) and that some dark areas in C) are less intense in B) or are not colored at all, as not all protein spots are antigenic.

A) 2D- immunoblots	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100	65.5	55.4	25.6	45.8	24.2	44.4	54	31.6
2		100	65.6	31.6	34	6.3	31.8	45.2	32.4
3			100	29.2	28.1	9.5	29.6	41.7	29.8
4				100	12.9	25	28.6	43.5	47.6
5					100	24	43.2	47.3	33.3
6						100	36.4	20	26.7
7							100	46.2	51.9
8								100	44.4
9									100



**Figure 5. A)** Similarity matrix computed for the nine 2D-immunoblot images. Values inside the matrix are the similarity percentages. **B)** Phylogenetic tree was constructed with the data from the similarity matrix. The 2D- immunoblots from the nine pigs are grouped together according to their resemblance. Note that immunoblots from pig #2 and #3 have the highest value in the similarity matrix (65.6%) and are also the most closely grouped in the phylogenetic tree.





**Figure 6. A)** Similarity matrix computed for the nine 2D-protein images. Values inside the matrix are the similarity percentages. **B)** Phylogenetic tree was constructed with the data from the similarity matrix. The 2D- protein images from the nine pigs are grouped together according to their resemblance. Note that, as for 2D-immunoblots, 2D-protein images from pig #2 and #3 have the highest value in the similarity matrix (80%) and are also the most closely grouped in the phylogenetic tree. Comparing this 2D-protein matrix with the 2D- immunoblot matrix from figure 5 in all cases (excepting one) resemblances among 2D-protein images are higher than those from 2D-immunoblots.

## Discussion

Herein, cysticerci isolated from different naturally infected pigs of rural Mexico were found to express different proteins and antigens in their VFs. The analysis of the 2D- protein images and of the 2D-immunoblots measured their diversity to be of considerable size. No single spot was present in all the 2D- protein images and none of the 2D- immunoblots had the same pattern. In fact, no single antigen spot was immunorecognized in all nine immunoblots. From the whole population of different proteins present in the VF<sub>i</sub>, only a fraction of them were immunorecognized in each VF<sub>i</sub> (from 19% to 65%).

The differences we found in the proteins and antigens expressed by cysticerci may be due to genetic differences among the parasites, variability of the host and/or a combination of both.

Studies of genetic diversity in *Taenia solium* have identified two major geographical regions: Asia and Africa/Latin America [12 -14]. Furthermore, genetic differences have been found among cysticerci collected from different pigs in the same locality and also in those from different localities within the same region and country [15, 16]. Moreover, detectable genetic variation was found between the cysticerci isolated from within the same pig, although the variation within was lower than that between pigs [16]: an indication that pigs are infected with eggs shed by a single tapeworm. In this respect it should be noticed that the pigs used herein were collected over a period of time (October 2007-July 2008) and came from different localities of Central Mexico, so it is likely that they were infected with eggs shed by different tapeworms. It is also possible that the differences in the

proteins and antigens the cysticerci express in each host at the time of their collection be due to the host itself, since rural pigs differ in many ways (genetic background, age, gender, immunological history, castration, pregnancy, nutritional state, stress condition, social position in the herd, etc), and the parasite has to adapt to the specific conditions it finds in each different host [17 -19].

From the whole  $\Sigma$  antigen spots that were found in 2D- immunoblots some of them were more frequently recognized than others. From these at least five would be necessary to serologically detect all the nine pigs used in this study, as previously stated. These five antigen spots agree in their low molecular weights (5.95 - 8.03 kDa) and their basic isoelectric points (7.85 - 8.31 pI). Two of these antigen spots had a molecular weight of  $\approx$ 8 kDa, being possible members of the 8kDa family of antigens previously described [20, 21], which have been used for serodiagnosis of cysticercosis. Interestingly, with these two antigen spots of 8 kDa five of the nine pigs (55.5%) can be detected. There is another antigen spot near 8 kDa (7.81 kDa) which is detected by three pigs' serum, two of which also detected one of the other 8 kDa antigens. This antigen spot may be a modified or truncated 8 kDa antigen, differing by little from the other 8 kDa antigen spots. Including this spot, 66.6% of the pigs can be serologically detected. Many authors [22-24] have focused their efforts to develop an immunodiagnostic test for cysticercosis using low molecular antigens (LMA), as these antigens constitute the subunits of larger immunogenic proteins. One of the characteristics of the 2D- electrophoresis is precisely the breakdown of large proteins into their individual subunits. The small changes in Isoelectric Points

among antigen spots with the same Molecular Weights account for changes in the glycosilation of presumably the same protein. The diversity found here among protein and antigenic content of different VF<sub>i</sub> probably be due to differences in the glycosilation patterns of the same protein backbones [25, 26] and/or to different protein backbones. This would explain why neither a single protein spot nor a single antigen spot was found to be shared by the nine 2D-protein and immunoblot images.

Parasite antigenic diversity has seldom been thoroughly studied in *Taenia solium*, there are only few reports of antigenic differences in *Taenia solium* cysticerci from different isolates [25 -27]. However, the contribution of its genetic diversity has been suspected as being responsible for the diversity of the clinical presentations of human neurocysticercosis [28, 29] and of porcine cysticercosis [3, 30]. This is a suspicion very much in line with studies in other parasites which have shown that genetic differences among them do have an effect on the immune response of their hosts. The case of *Trypanosoma cruzi*'s different genotypes eliciting different patterns of humoral immune responses [31] is an example.

The diversity in the protein repertoire of the VF<sub>i</sub> found in our study is congruently related to the diversity found in the immunological response of the studied pigs, as expressed by their serum IgG antibodies. The extent of these two diversities varied between pigs but protein diversities seemed to resemble more among themselves (53.39%) than did the pigs' immunological perception of them, as displayed by their serum IgG antibodies (43.02%). Because the variance of the images was greater in the 2D- protein images than in the 2D- immunoblots, it would seem reasonable to conclude that not all the proteins in the VF are antigenic for the host. Some of the protein contents of the VF<sub>i</sub> may be of host origin (complete or degradation products of proteins and Ig's), but in the 2D- immunoblots these contents are very unlikely to be recognized by the serum IgG's as it would imply a wide spectrum autoimmune disorder in the pig. The protein and antigen diversities found in the present study represent different moments of the infection in each host and results may vary over time.

Having found diversity among the infected pigs and the infecting cysticerci is not a great surprise since individual organisms are unique [1] and infection and immunity constitute one of the most prominent and decisive scenarios of species diversification when making some individuals susceptible and others resistant to infection.

The significant correlations found between 2D-immunoblot Grid-Cells showed the diversity of the

images as well. From the 4950 different correlations, only the 3% were significant. The biological meaning of these significant correlations is unknown but may be reflecting antigens that favor or block (in the case of negative correlations) the recognition of other antigens, implying that an immunological network may be involved in the way infected pigs recognize cysticerci as cysticercotic mice do with *T. crassiceps* [2]. If such network exists also in pigs and human, the study of the different interactions between nodes may bring some clues to better understand cysticercosis and may be especially useful in the field of vaccine design, as critical antigens can be selected in and out.

The combined host and parasite immunological diversities described here strengthen the existing hypothesis of the clinical and pathological diversities found in porcine and human *T. solium* cysticercosis by demonstrating there are indeed significant immunological differences among infected hosts and infecting cysticerci [28, 32, 33].

In more practical matters, cysticerci dissected from the skeletal muscles of cysticercotic pigs are extensively used worldwide as a source of antigens for immunodiagnostic tests [5, 22, 34 -36], vaccine design [7, 37] and pathophysiological studies of porcine and human cysticercosis [38 -41]. The diversity of the hosts' immune response and of the VF antigens of the cysticerci can explain why immunodiagnostic tests for cysticercosis usually first claim to have very high sensitivity/specificity scores but, as they are used more widely, their scores tend to lower values [42 -44]. This is so even in some immunotests using synthetic or recombinant proteins, especially if they were first selected on the basis of the antigens expressed by cysticerci dissected from different infected pigs. Rather, the great antigen diversity shown here should advise those interested in the search of new and/or better immunodiagnostic tests or vaccines, to critically select their antigen samples since not all parasites or all hosts will provide with the same results. The use of complex antigen mixtures, such as VFs, as a diagnostic tool in *T. solium* cysticercosis should be discouraged, while the use of purified antigens should be encouraged.

## Acknowledgements

Financial support was provided by Grant #IN204311-3 (P.O.S) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. M.E.V. is recipient of a doctoral scholarship from CONACYT (207061) for her PhD studies in the

“Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB)” at UNAM.

## Conflict of Interests

The authors have declared that no conflict of interest exists.

## References

1. Medawar PB. The Uniqueness of Individual. New York, USA: Basic Books; 1957.
2. Ostoa-Saloma P, Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Jacobo P, Larralde C. Strategies of statistical image analysis of 2D immunoblots: the case of IgG response in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Immunol Methods*. 2009; 351(1-2):46-54.
3. De Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernández M, Sciutto E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol*. 1996; 61(1-2):49-59.
4. Deckers N, Kanobana K, Silva M, Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, Dorny P. Serological responses in porcine cysticercosis: A link with the parasitological outcome of infection. *Int J Parasitol*. 2008; 38(10):1191-8.
5. Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos NM, Hernández M, José MV, Beltrán C, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol*. 1998; 79(4):299-313.
6. Lightowler MW. Eradication of *Taenia solium* Cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int J Parasitol*. 2010; 40(10): 1183-92.
7. Sciutto E, Fragoso G, de Aluja AS, Hernández M, Rosas G, Larralde C. Vaccines against cisticercosis. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8(5):415-23.
8. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cisticercosis. *Acta Trop*. 2003; 87(1):79-86.
9. de Aluja AS. Laboratory animals and official Mexican norms (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica De México*. 2002; 138(3): 295-298.
10. Marengo E, Robotti E, Gianotti V, Righetti PG, Cecconi D, Domenici E. A new integrated statistical approach to the diagnostic use of two-dimensional maps. *Electrophoresis*. 2003; 24(1-2):225-236.
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*; In Press.
12. Hancock K, Broughel DE, Moura INS, Khan A, Pieniazek NJ, Gonzalez AE, et al. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *Int J Parasitol*. 2001; 31:1601- 7.
13. Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. *Parasitology*. 2002; 124:657-62.
14. Ito A, Yamasaki H, Nakao M, Sako Y, Okamoto M, Sato MO, et al. Multiple genotypes of *Taenia solium*--ramifications for diagnosis, treatment and control. *Acta Trop*. 2003; 87(1):95-101.
15. Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopex-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, et al. Detection of Genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol*. 2003; 89:1250- 4.
16. Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes MdLR, Duarte-Escalante E, Vega R, de Aluja AS, Zúñiga G, Morales J, Larralde C, Sciutto E. Genetic diversity of *Taenia solium* form naturally infected pigs of central Mexico. *Vet Parasitol*. 2010; 168(1-2):130-135.
17. Recker M, Buckee CO, Serazin A, Kyes S, Pinches R, Christodoulou Z, Springer AL, Gupta S, Newbold CI. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum* malaria involves a highly structured switching pattern. *PLoS Pathog* 2011;7(3): e1001306.
18. Rópolo AS, Touz MC. A lesson in survival, by *Giardia lamblia*. *ScientificWorldJournal*. 2010; 10:2019-31.
19. Haag KL, Gottstein B, Ayala FJ. Taeniid history, natural selection and antigenic diversity: evolutionary theory meets helminthology. *Trends in Parasitol*. 2007; 24(2): 96-102.
20. Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, Tsang VC. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(6):2577-86.
21. Ferrer E, Bonay P, Foster-Cuevas M, González LM, Dávila I, Cortéz MM, et al. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. *Mol Biochem Parasitol*. 2007; 152(1): 90-100.
22. Lee EG, Bae YA, Kim SH, Díaz-Camacho SP, Nawa Y, Kong Y. Serodiagnostic reliability of single-step enriched low-molecular weight proteins of *Taenia solium* metacestode of American and Asian isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104(10): 676-683.
23. Atluri SRV, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Neurocysticercosis: immunodiagnosis using *Taenia solium* cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children. *Acta Trop* 2009; 110(1): 22-27.
24. Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol* 2000;38(12):4439-44.
25. Ito A, Nakao M, Okamoto M, Sako Y, Yamasaki H. Mitochondrial DNA of *Taenia solium*: From Basic to Applied Science. In: Singh G and Prabhakar S, ed. *Taenia solium* cysticercosis: From Basic to Clinical Science. Wallingford, United Kingdom: CABI; 2002: 47-55.
26. Sato MO, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, Ito A. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. *J Infect Dis*. 2006; 194(12):1783-90.
27. Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A, Larralde C. Analysis of Antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J Parasitol*. 1962; 68(1):39-47.
28. Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Sciutto E, Larralde C. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104(4):243-50.
29. Campbell G, Garcia HH, Nakao M, Ito A, Craig PS. Genetic variation in *Taenia solium*. *Parasitol Int*. 2006; 55: S121-6.
30. De Aluja AS. Cysticercosis in the pig. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8(5):368-74.
31. Dos Santos DM, Talvani A, Guedes PM, Machado-Coelho GL, de Lana M, Bahia MT. *Trypanosoma cruzi*: genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Exp Parasitol*. 2009; 121(1):8-14.
32. Sciutto E, Martínez JJ, Huerta M, Avila R, Fragoso G, Villalobos N, de Aluja A, Larralde C. Familial clustering of *Taenia solium* cisticercosis in their rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet Parasitol*. 2003; 116(3):223-239.
33. Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, et al. Population genetic analysis of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol*. 2003; 33:1479-85.

34. Shukla N, Husain N, Jyotsna, Gupta S, Husain M. Comparisons between scolex and membrane antigens of *Cysticercus fasciolaris* and *Cysticercus cellulosae* larvae for immunodiagnosis of neurocysticercosis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008; 41(6):529-24.
35. Atluri SRV, Singhi P, Khandelwal N, Malla N. Evaluation of excretory secretory and 10-30 kDa antigens of *Taenia solium* cysticerci by EITB assay for the diagnosis of neurocysticercosis. *Parasite Immunol.* 2009; 31(3):151-155.
36. Deckers N, Dorny P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Trends parasitol.* 2010; 26(3): 137-44.
37. Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos MN, et al. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol.* 1995; 60(1-2):53-67.
38. Rodriguez S, Dorny P, Tsang VC, Pretell EJ, Brandt J, Lescano AG, et al. Detection of *Taenia solium* antigens and anti-T. solium antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 2009; 199(9):1345-52.
39. Sciutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunol.* 2007; 29(12):621-36.
40. Sikasunge CS, Johansen MV, Phiri IK, Willingham AL 3rd, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol.* 2009; 160(3-4):242-50.
41. Montano SM, Villaran MV, Ylquimiche L, Figueroa JJ, Rodriguez S, Bautista CT, et al. Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. *Neurology.* 2005; 65(2):229-33.
42. Scheel CM, Khan A, Hancock K, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VC; Cysticercosis Working Group in Peru. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(4):771-6.
43. Prabhakaran V, Rajshekhar V, Murrell KD, Oommen A. Conformation-sensitive immunoassays improve the serodiagnosis of solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(6): 570-577.
44. Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. *Arch Neurol.* 1992; 49(6): 633-636.

## Research Article

# Budding of *Taenia crassiceps* Cysticerci In Vitro Is Promoted by Crowding in Addition to Hormonal, Stress, and Energy-Related Signals

**Pedro Ostoa-Saloma, Pedro Ostoa-Jacobo, Marcela Esquivel-Velázquez, Silvana Bazúa, and Carlos Larralde**

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, C.P. 04510, México D.F., Mexico*

Correspondence should be addressed to Pedro Ostoa-Saloma, postoa@unam.mx

Received 19 August 2009; Accepted 23 October 2009

Academic Editor: Jorge Morales-Montor

Copyright © 2010 Pedro Ostoa-Saloma et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Taenia crassiceps* cysticerci (cysts) reproduce by budding. The cysts' production of buds was measured in vitro to explore parasite and environmental-related factors involved in the extreme individual variation in parasite loads of inbred mice. Cysts were placed in in vitro culture for 10 days at initial parasite densities of 1, 5, 10 cysts/well in 1 ml of RPMI Medium 1640 without serum. Results showed that there is considerable intrinsic initial variation among inoculated cysts in their production of buds and that increasing parasite density (crowding) stimulates the overall production of buds and recruit into budding most of the cysts. Identical cultures were then subjected to various treatments such as heating and exposure to peroxide to induce stress, or to 17 $\beta$ -estradiol, insulin, glucose, or insulin+glucose to supplement putatively limiting hormonal and energy resources. All treatments increased budding but the parasites' strong budding response to crowding alone overshadows the other treatments.

## 1. Introduction

*Taenia crassiceps* is a cestode that, when adult, lives in the intestinal lumen of some carnivore species (i.e., fox) and in the subcutaneous connective tissue and pleural and peritoneal cavities of rodents (i.e., mice) in its metacestode (cysticercus) stage [1]. For experimental conditions, the infection with *T. crassiceps* is simply attained by an ip injection of a few cysticerci in laboratory mice. Once in the peritoneal cavity, the cysticerci reproduce asexually by budding [2], until reaching massive parasite loads in a matter of 3–6 months that weigh as much as the host [3]. Measuring parasite intensity in such conditions is an easy task requiring no more than a magnifying glass to count the number of parasites installed in the host at the time they are harvested by way of thoroughly washing the infected peritoneal cavity. Thus, Experimental murine intraperitoneal (ip) cysticercosis by *T. crassiceps* ORF strain (ExpMurIPTcrasCistiOrf) has been extensively used for

genetical, immunological, endocrinological, and behavioral studies of host-parasite relationships [3–7].

Notwithstanding its usefulness, ExpMurIPTcrasCistiOrf is plagued by unexplained great individual mouse variability in parasite loads and in IgG antibody responses, even within the same genetic strain and sex of the murine host and time of infection [8]. A number of factors from the individual host, the parasite, and the environment have been invoked as being involved in such variability [3]. The possible role of inherent variation in the putatively identical parasites composing the infecting inoculums has received less attention. There are two major sources of possible parasite variation between inoculums, one technical and the other biological. The technical sources are the number of infecting cysticerci in the inoculums, the time of infection studied, and the degree of injury suffered by the cysticerci upon their passage through the syringes' very tight caliber needles when squirted into the peritoneal cavities of the infected mice. The biological sources of unexplained variation are also plenty

and involve both host and parasite genetic and epigenetic physiological factors at the individual level [3].

To test the hypothesis of inherent budding variability among infecting cysticerci, without the participation of the host's responses, we counted the number of buds they produced in *in vitro* cultures in 1, 5, or 10 mL of RPMI Medium 1640 without fetal serum or added supplements, in isolated conditions (1 cyst/culture well), and in crowded conditions (5 and 10 cysts/well) or with various supplements during 10 days in the different culture conditions.

## 2. Material and Methods

**2.1. Parasite Collection.** The cysticerci employed came from two different BalbC/AnN female mice that had been infected ip 2 months before to develop a massive parasite load [3]. Harvesting the cysticerci implies killing the donor mice by etherization (in accordance with our institute's ethical procedure in dealing with experimental animals (at [http://www.biomedicas.unam.mx/CodEtico\\_archivos/Reglamento\\_Bioterio.pdf](http://www.biomedicas.unam.mx/CodEtico_archivos/Reglamento_Bioterio.pdf)) and immediately afterwards slitting its peritoneal cavity to release hundreds of cysticerci into a Petri dish containing phosphate-buffered saline (PBS) and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  antibiotic (penicillin/streptomycin) at room temperature. Typically, the collected cysticerci are presented in three phases: initial (no buds and transparent vesicle), larval (filled with buds and transparent vesicle) and final (no buds and opaque vesicle), [8]. A significant fraction of the harvested cysticerci (~10%–20%) is the subpopulation of tiny (0.1–0.3 mm) nonbudded motile and transparent cysticerci, from which 10 cysticerci are selected to constitute each of the inoculums with which to infect experimental mice. Such selection of cysticerci expected would reduce variability in the resulting parasite loads between infected mice; and it does so to some extent, but significant individual variation in parasite loads usually subsists and not rarely, depending on strain and sex of infected recipient mice, some of the challenged mice are totally spared from infection [4–9]. It is from this subpopulation of tiny nonbudded cysticerci that the cysticerci employed in this *in vitro* study of their budding process were selected.

**2.2. Parasite Culture.** Microscopically nonbudded cysts were employed in two experiments. The independent variables were the initial density of cysts cultured in each well (density = 1, 5, 10 cysts/well with 1 mL of medium/well; in a dish with 6 wells), the nature of supplements to the culture medium, and the days of culture (0 to 10) at 37 or 42°C with 5% CO<sub>2</sub>. The dependent variables were the number of buds found under light microscopy attached to each cyst (buds/cyst) in each well and the sum of all buds in each well ( $\sum$  buds). The culture medium employed was RPMI Medium 1640 without serum. The cysticerci came from two different donor mice and were cultured in the three density conditions without supplements in Experiment number 1 (from donor number 1) or were subjected to various treatments in Experiment number 2 (from donor number 2), such as heating (42°C) and peroxide (30 mM) to induce

TABLE 1: The final budding efficiency (final  $\sum\text{buds}/\sum\text{cysticerci}$ ) in Experiments 1 and 2 at each density.

Culture condition	number of buds/number of cysts		
	$d = 1$	$d = 5$	$d = 10$
Control 1	0.17	3	10.3
Control 2	3	3.7	5.9
Heat	4	2.6	3.9
$\beta$ -estradiol	6	6.1	4.5
Insulin	10	6.8	6.7
Glucose	6	5.8	5.9
Ins+Glu	6	5.4	7.9
Peroxide	5.5	5.1	5.1

stress in the cultured parasites, or supplemented with 17 $\beta$ -estradiol (30 nM), insulin (1.5 U/mL), glucose (56 mM), or insulin+glucose (same concentrations as when by themselves only) to provide with energy resources and restore putatively energy limiting conditions. The culture medium in the wells was changed by fresh medium every 24 hours for the first two days and every 36 hours thereafter.

**2.3. Statistics.** Statistical analysis was performed with SPSS a Student's *t*-test to study the significance of contrasts between the different densities. Statistical significance levels were set at  $P < .05$ .

## 3. Results and Discussion

Figure 1 shows that in Experiment number 1 the sum of buds produced in each well (budding) progressively increases with increasing parasite densities in a wave-like fashion more clearly visible at density = 10. It took 8 days for density = 1 to initiate budding and by only 1 of the 6 cysts, while it took 3 and 2 days for densities = 5 and 10, respectively, for most or all cysts to bud and 7 days for the higher densities to start a second wave of budding. The first line of Table 1 shows that in Experiment number 1 the final budding efficiency (final  $\sum\text{buds}/\sum\text{cysticerci}$ ) at each density increased from 0.17 to 3.00 to 10.3 for densities 1, 5, and 10, respectively. From these results it is clear that there is considerable initial variation in budding among cysts and that increasing parasite density increases the production of buds and reduces the proportion of nonbudding cysts.

Thus, initial differences in the distribution of “readiness to bud” among the cysts (as defined by the time it takes a resting cysticercus to start budding plus the time taken for a bud to become a cysticercus capable of budding) may well explain the variation of parasite loads in mice infected with apparently similar inoculums. To minimize variation in parasite loads users of ExpMurIPTcrasCistiOrf may try to presynchronize *in vitro* the cysts meant to be inoculated at 10 cysts/mL until most (80%) are already well into budding (>1 buds/cyst) before their selection and inoculation through a procedure nondisruptive of the cysts.

But now, the questions were how is crowding controlling the budding process? Are the differences in budding related

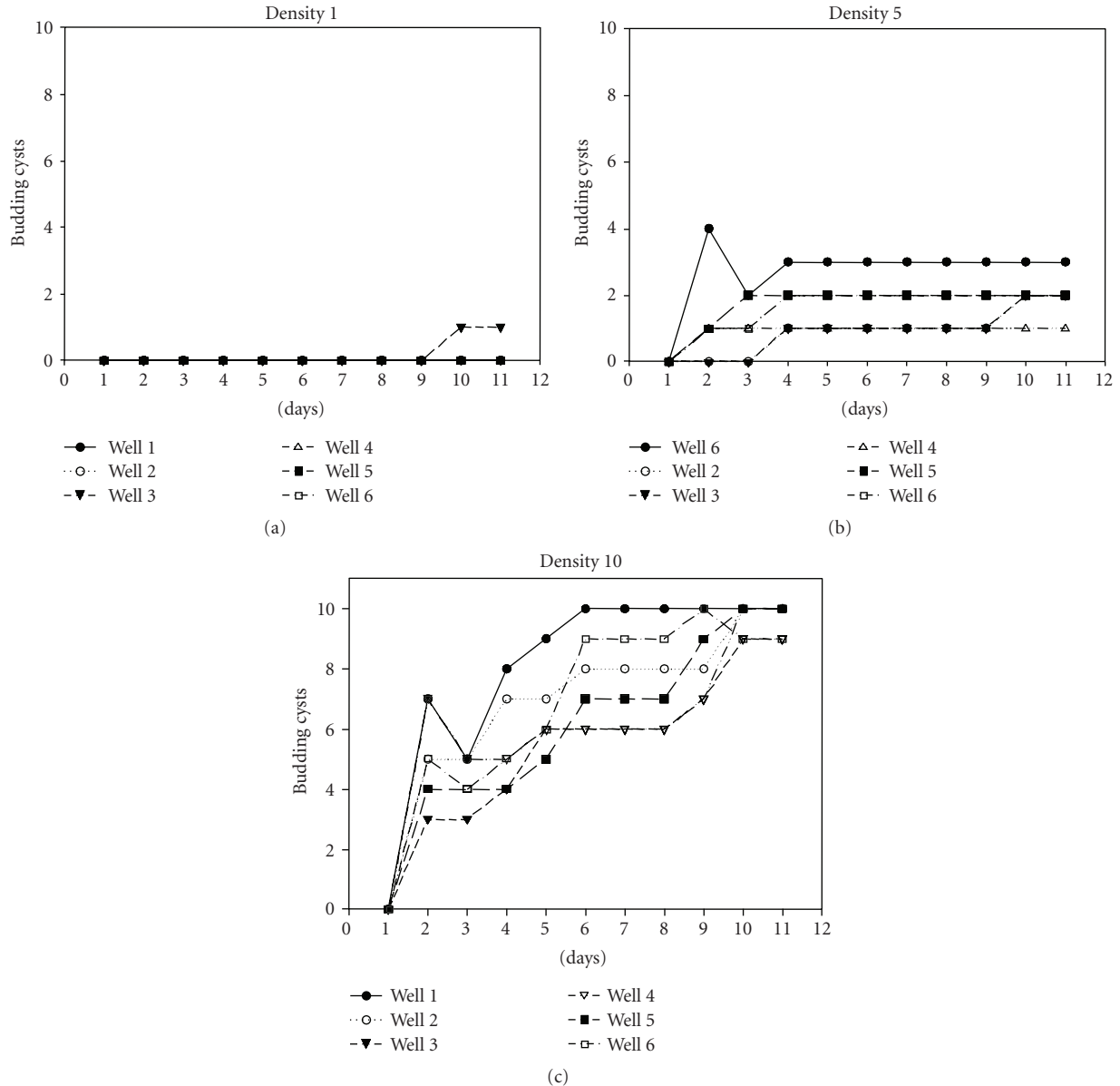


FIGURE 1: Sum of all buds in each well ( $\sum$  buds) of *Taenia crassiceps* cysticerci at three different parasite densities. The sum of buds produced in each well progressively increases with increasing parasite densities in a wave-like fashion

to and/or result from different responses to negative or positive pressures to bud existing in the over-crowded conditions in the peritoneal cavities of the donor mice and/or in the culture tubes? [10–14].

Experiment number 2 was designed to address those questions, bearing in mind that increasing density may decrease resource availability and lead the parasites to enter into stress. Accordingly, the cultured cysticerci from Donor number 2 were submitted to standard stress (heat and peroxide) or favorable conditions (addition of  $17\beta$ -estradiol, insulin, glucose, insulin+glucose) and cultured in vitro as done in Experiment number 1. Figure 2 shows the budding process at the different conditions from day 0 to day 10. Table I most clearly shows that the total number of buds/cyst

produced in vitro are increased about twofold with respect to unsupplemented control values at densities 1 and 5 but not at density 10, which is in fact reduced by the supplementations. The great difference between the control values of  $\sum$  buds/cyst in Experiments number 1 and number 2 (0.17 and 3.0, resp.) speaks of there being such differences between the harvested cysticerci from the two donor mice in the cysts’ “readiness to bud,” possibly depending on the state and terms of each host-parasite relationship established with the donor mice.

It is not surprising that the supplements stimulated budding at low parasite densities because the synthesis and the role of estradiol in stimulating cysts reproduction in vivo and in vitro have been well established [7, 15]

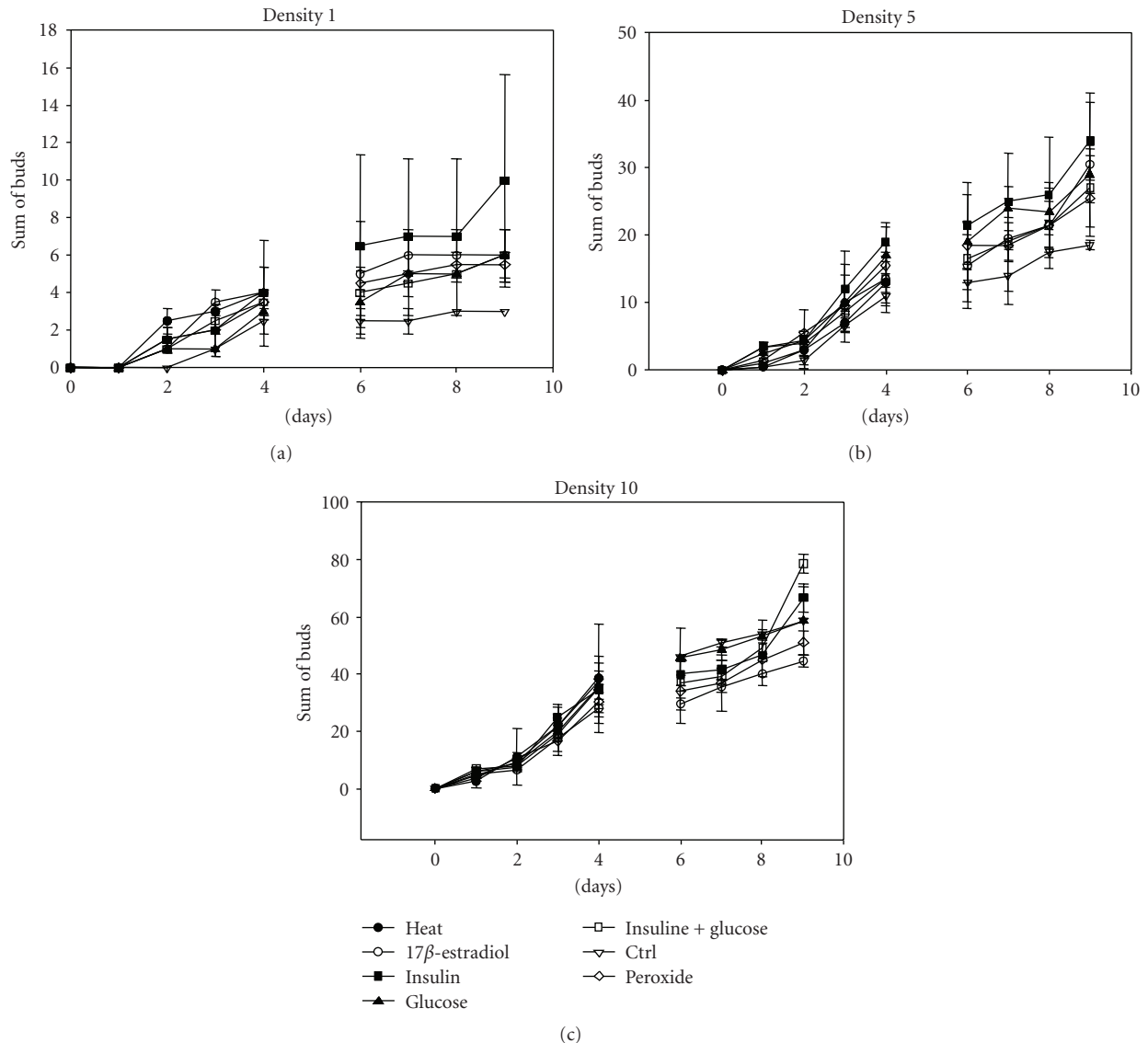


FIGURE 2: Budding process at the different conditions from day 0 to day 10. The cultured cysticerci from Donor number 2 were submitted to standard stressing (heat and peroxide) or favorable conditions (addition of 17 $\beta$ -estradiol, insulin, glucose, insulin+glucose) and cultured in vitro as done in Experiment number 1. The results presented are from one experiment with its duplicate for each density. The graphic expresses the average value plus standard deviations. In  $d = 1$  and  $d = 5$ , the budding in the presence of glucose and peroxide is significant. In  $d = 10$  the budding in the presence of estradiol and insuline+glucose is significant.

and so is also the role of heat [16]. Likewise, the insulin pathway has been shown to be present in a large variety of invertebrates, including the most primitive metazoan phyla (cnidaria and sponges), and to play a central role in cell division and differentiation [17]. As other possible chemical mediators, we suspect cytokine-like substances which influence reproduction and apoptosis of heterologous cell lines, which cysticerci seem capable of producing and secreting in vivo and in vitro [18–20]. TGF- $\beta$ , EGF, and insulin pathways are conserved in helminth parasites with receptor functions probably similar to those of invertebrate and vertebrate orthologs. Indeed, host-derived signals still present in the harvested cysts could have activated parasite receptors and modulated parasite development and differentiation [16, 21].

That crowding cysts at density = 10 *per se* promotes the highest budding efficiency is a novel finding which indicates that crowding is a powerful factor controlling the population of cysts. Possibly, crowding may act by the release of growth factors [19, 20] by the cysts most differentiated and ready to begin budding when placed in vitro, which then recruit those most laggard. Additionally, crowding may be mediated by adhesive molecules or membrane sensors sensitive to contact, as it has been previously reported by Haas et al. and Loverde et al., respectively [22, 23].

That the supplements did not improve, but rather lowered, the budding efficiency at density = 10 suggests that the capacity to bud has an upper limit. Such hysteresis in the system controlling budding could also explain the wave-like form in the dynamics of budding.



Overall, the results are congruent with the hypothesis that parasite inoculums composed of 1–10 apparently identical small nonbudded cysts would likely include a variety of cysts differing in their initial “readiness to bud” and thereby induce variation in parasite loads in infected mice at early times after infection when parasite loads are relatively low, followed by a progressive tendency towards uniformity at later times [13].

## Acknowledgments

Financial support was provided by Grant number IN226507-3 (C.L. and P.O.S), from PAPIIT, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, and Proyecto 103151 (POJ) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## References

- [1] R. S. Freeman, “Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda),” *Canadian Journal of Zoology*, vol. 40, pp. 969–990, 1962.
- [2] J. K. Smith, G. Esch, and R. Kuhn, “Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous orf strain,” *International Journal for Parasitology*, vol. 2, pp. 261–264, 1972.
- [3] C. Larralde, E. Sciotto, L. Huerta, et al., “Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility,” *Acta Leidensia*, vol. 57, no. 2, pp. 131–134, 1989.
- [4] E. Sciotto, G. Fragoso, M. L. Diaz, et al., “Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility,” *Parasitology Research*, vol. 77, no. 3, pp. 243–246, 1991.
- [5] A. Padilla, T. Govezensky, E. Sciotto, et al., “Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*,” *Journal of Parasitology*, vol. 87, no. 3, pp. 591–599, 2001.
- [6] B. Gourbal, A. Lacroix, and C. Gabrion, “Behavioural dominance and *Taenia crassiceps* parasitism in BALB/c male mice,” *Parasitology Research*, vol. 88, no. 10, pp. 912–917, 2002.
- [7] J. Morales-Montor and C. Larralde, “The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*,” *Parasitology*, vol. 131, no. 3, pp. 287–294, 2005.
- [8] G. Fragoso, G. Meneses, E. Sciotto, A. Fleury, and C. Larralde, “Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines,” *Journal of Parasitology*, vol. 94, no. 2, pp. 551–553, 2008.
- [9] G. Fragoso, E. Lamoyi, A. Mellor, C. Lomeli, T. Govezensky, and E. Sciotto, “Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis,” *Parasitology*, vol. 112, no. 1, pp. 119–124, 1996.
- [10] L. S. Roberts, “The influence of population density on patterns and physiology of growth in *Hymenolepis diminuta* (Cestoda:Cyclophyllidea) in the definitive host,” *Experimental Parasitology*, vol. 11, no. 4, pp. 332–371, 1961.
- [11] E. T. Zavras and L. S. Roberts, “Developmental physiology of cestodes: characterization of putative crowding factors in *Hymenolepis diminuta*,” *Journal of Parasitology*, vol. 70, no. 6, pp. 937–944, 1984.
- [12] R. L. Cook and L. S. Roberts, “In vivo effects of putative crowding factors on development of *Hymenolepis diminuta*,” *Journal of Parasitology*, vol. 77, no. 1, pp. 21–25, 1991.
- [13] L. S. Roberts, “The crowding effect revisited,” *Journal of Parasitology*, vol. 86, no. 2, pp. 209–211, 2000.
- [14] C. P. Read, “The “crowding effect” in tapeworm infections,” *Journal of Parasitology*, vol. 86, no. 2, pp. 206–208, 2000.
- [15] M. C. Romano, R. A. Valdéz, A. L. Cartas, Y. Gómez, and C. Larralde, “Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 85, no. 2–5, pp. 221–225, 2003.
- [16] L. Vargas-Parada, C. F. Solís, and J. P. Laclette, “Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda),” *Parasitology*, vol. 122, no. 5, pp. 583–588, 2001.
- [17] C. Dissous, N. Khayath, J. Vicogne, and M. Capron, “Growth factor receptors in helminth parasites: signalling and host-parasite relationships,” *FEBS Letters*, vol. 580, no. 12, pp. 2968–2975, 2006.
- [18] S. López-Briones, E. Sciotto, J. L. Ventura, A. Zentella, and G. Fragoso, “CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*,” *Parasitology Research*, vol. 90, no. 2, pp. 157–163, 2003.
- [19] K. M. O’Connell and M. T. Rogan, “Apoptosis in human Jurkat T cells after culture with live *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro,” *Parasitology*, vol. 120, no. 6, pp. 649–655, 2000.
- [20] K. Brehm and M. Spiliotis, “The influence of host hormones and cytokines on *Echinococcus multilocularis* signalling and development,” *Parasite*, vol. 15, no. 3, pp. 286–290, 2008.
- [21] G. Escobedo, M. C. Romano, and J. Morales-Montor, “Differential in vitro effects of insulin on *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci,” *Journal of Helminthology*, vol. 24, pp. 1–10, 2009.
- [22] W. Haas, S. Haeberlein, S. Behring, and E. Zoppelli, “*Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae,” *Experimental Parasitology*, vol. 120, no. 1, pp. 94–97, 2008.
- [23] P. T. LoVerde, A. Osman, and A. Hinck, “*Schistosoma mansoni*: TGF- $\beta$  signaling pathways,” *Experimental Parasitology*, vol. 117, no. 3, pp. 304–317, 2007.

## Review Article

# Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to Focus on the Challenge

**M. Esquivel-Velázquez, P. Ostoa-Saloma, J. Morales-Montor,  
R. Hernández-Bello, and C. Larralde**

*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
A.P. 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México City, DF, Mexico*

Correspondence should be addressed to C. Larralde, larralde@servidor.unam.mx

Received 1 June 2011; Revised 22 August 2011; Accepted 23 August 2011

Academic Editor: Luis I. Terrazas

Copyright © 2011 M. Esquivel-Velázquez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Neurocysticercosis (NCC) is a disease of the central nervous system that is considered a public health problem in endemic areas. The definitive diagnosis of this disease is made using a combination of tools that include imaging of the brain and immunodiagnostic tests, but the facilities for performing them are usually not available in endemic areas. The immunodiagnosis of NCC is a useful tool that can provide important information on whether a patient is infected or not, but it presents many drawbacks as not all infected patients can be detected. These tests rely on purified or semipurified antigens that are sometimes difficult to prepare. Recent efforts have focused on the production of recombinant or synthetic antigens for the immunodiagnosis of NCC and interesting studies propose the use of new elements as nanobodies for diagnostic purposes. However, an immunodiagnostic test that can be considered as “gold standard” has not been developed so far. The complex nature of cysticercotic disease and the simplicity of common immunological assumptions involved explain the low scores and reproducibility of immunotests in the diagnosis of NCC. Here, the most important efforts for developing an immunodiagnostic test of NCC are listed and discussed. A more punctilious strategy based on the design of panels of confirmed positive and negative samples, the use of blind tests, and a worldwide effort is proposed in order to develop an immunodiagnostic test that can provide comparable results. The identification of a set of specific and representative antigens of *T. solium* and a thorough compilation of the many forms of antibody response of humans to the many forms of *T. solium* disease are also stressed as necessary.

## 1. Introduction

Neurocysticercosis (NCC) is a disease caused by the metacystode or larval form of the tapeworm *Taenia solium* when it lodges in the central nervous system (CNS) and is endemic of the Andean area of South America, Brazil, Central America and Mexico; China, the Indian subcontinent, and South-East Asia; sub-Saharan Africa [1–3]. It is considered a public health problem as it is the main cause of late-onset epilepsy [4] and it is also the most important parasitic disease of the nervous system [3, 5, 6]. Cysticerci may also locate elsewhere in skeletal muscles, heart, eyes, diaphragm, tongue, and subcutaneous tissues, causing a condition simply referred to as cysticercosis.

NCC is a disease difficult to diagnose based on the clinical picture as it presents a variety of nonspecific symptoms and in 50% of the cases none [7]. The symptoms differ according to the location of the cysts in the brain (parenchymal or ventricular) and the number and the state of the parasites (vesicular, degenerating, or calcified) [5, 8–12]. The severe forms of NCC seriously impair the patients' health and may lead to death. Medical diagnosis of NCC is impossible on clinical data alone. The definitive diagnose is made using a combination of methods including images of the cysts in the brain (by computed tomography or magnetic resonance imaging) and immunological methods (detection of specific antibodies or antigens). As this is a disease frequently associated to poverty [3, 13, 14], the availability and high

costs of neuroimages or sophisticated immunological assays in endemic areas limit the diagnostic capacity [15]. An effective immunodiagnosis of NCC would be the most practical way to facilitate medical diagnosis for millions of poor people in endemic countries and it would also supply sero-epidemiological studies with a low-cost indicator of prevalence of infection. In addition, a positive immune test would raise the clinical suspicion of early nonsymptomatic NCC which, if confirmed, would allow offering early treatment. Interesting advances in immunodiagnostic assays for NCC have been made during the past few years, involving the use of synthetic or recombinant antigens [16–29] and some efforts have been done to detect specific antigens or antibodies in noninvasive ways for the patient [30–33]. Most reports initially claim very high specificity/sensitivity scores, sometimes even as high as 100/100%. Enthusiasm soon calms as the methods are applied by different laboratories, in larger numbers of cases and in various epidemiological scenarios of the disease [31, 34–37].

Immunodiagnosis of NCC can be done by two ways: by identifying antibodies against cysticercal antigens, or by identifying parasite's antigens directly. Here is a review of the recent studies made in the area of immunodiagnosis of NCC and the methods used in each case are discussed.

## 2. Biological Factors Involved in Neurocysticercosis

Host factors as age, gender, or race are involved in the severity of NCC (Figure 1). Age has an effect upon the number of cysticercal lesions and on the state of the cysticerci in the brain (vesicular, colloidal): while vesicular cysticerci increase with aging, colloidal cysticerci diminish without representing an increment on severity of NCC [38]. Sexual dimorphism has been reported in many parasitic infections as malaria, schistosomiasis, tripanosomiasis, toxoplasmosis, and cysticercosis [39]. The effect of sex hormones upon the immune system is evident, for example, in *T. solium* cysticercosis, the prevalence of naturally infected pigs almost doubles in castrated or pregnant pigs [40]. In general, females generate more robust humoral and cell-mediated immune responses than males, but males present a stronger inflammatory response to infectious organisms [41]. In NCC, females present increased levels of IL5/IL6/IL10 in cerebrospinal fluid (CSF) [42] as well as a higher leukocyte counts than men [38] and more frequently present severe NCC [43] which may have a relation with the location of the cysts in the brain and with higher inflammatory profiles in female [44]. Furthermore, females present higher immunoglobulin levels than men to different antigenic challenges [45] and in seroepidemiological surveys females show the highest anticysticerci response [46].

The genetic differences between different populations also play a role in infectious diseases [47–49], especially on terms of susceptibility to disease as in the case of malaria [50]. In NCC, some antigens from the HLA complex have been involved in the relative risk for developing parenchymal NCC [51], but studies of this type are scarce. A study identi-

fying genes responsible for the pleomorphic presentation of the disease has not been done, but the effect of the genetic background upon the development of this particular disease is clear between subjects from different endemic areas, as is the case of India in which single cysticercotic granuloma (SCG) is the most frequent presentation of NCC while in Latin America it is not [35, 52].

Furthermore, genetic variability of the parasite itself has been described. Genetic variability of cysticerci has been found at different levels, from the global level (which identified two genotypes: Asia and Africa/Latin America) [53–57]) to the regional and the community level [58].

With all these factors involved, it is hard to find a single immunodiagnostic test that can detect all true NCC cases and that can work worldwide.

## 3. Problems, Advances, and Perspectives in the Immunodiagnosis of Neurocysticercosis

Historically, tests developed to diagnose NCC either by detecting specific antibodies or antigens have shown that not all cases could be detected (false negatives) and many other cases are detected as positive (false positives) when they are not. The first case is related to the number, state, and location of the cysticerci in the brain and involves patients with degenerating, dead, or single cysticerci. The second case involves patients with parasitic diseases closely related to cysticercosis (as echinococcosis or hymenolepiasis), patients exposed to the parasite but that did not become infected, patients with cysticercosis outside the central nervous system and patients who once were infected but resolved the infection without consequences. Additionally, almost half of NCC cases are asymptomatic [12] and the symptomatic cases present a variety of unspecific symptoms as chronic epilepsy and headaches as the most common [8].

Immunodiagnostic tests for NCC initially claim to have very good sensitivity/specificity scores, but as they are being tested by other groups, in larger number of cases and in areas with different degrees of endemicity the scores are lower [31, 37, 52]. Also the scores lower because many immunodiagnostic tests rely on purified or semipurified antigens and the procedure of purification is complex and frequently require technical expertise. This question, coupled with differences in the selection of the NCC patients and the control groups, provokes large variations within and between tests and low reproducibility between laboratories. The need to find new antigens for immunodiagnosis of NCC which can improve the diagnostic capacity of actual tests persists. These new antigens have to be tested by various laboratories to prove that the sensitivity/specificity maintains between tests putting special attention on the selection of NCC patients and controls so the results can be compared. Some efforts have been done in recent years to try to make a more uniform immunodiagnostic test [20, 24] and to make comparable the results from different tests between laboratories [16, 26, 59, 60].

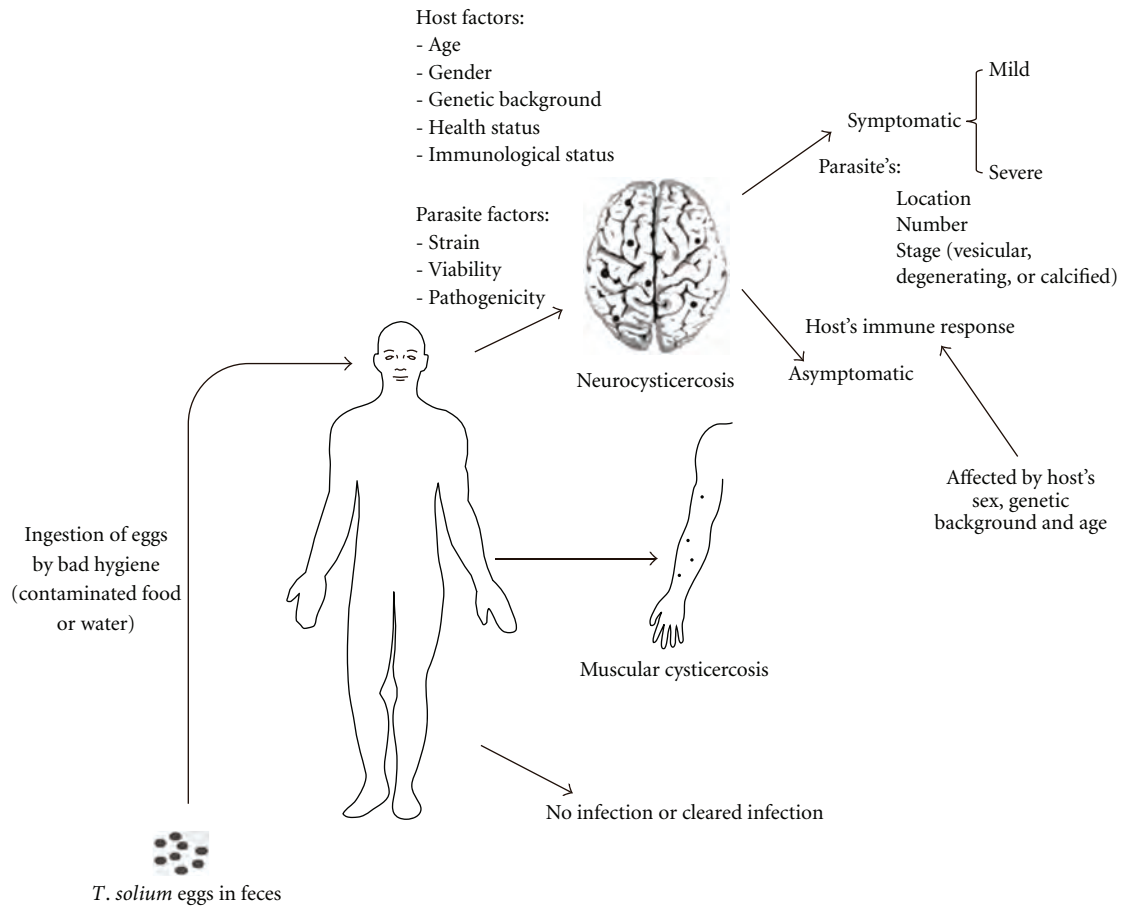


FIGURE 1: Factors involved in NCC. The development of NCC depends on many factors from either the host or the parasite. The factors affecting the immune response of the host are particularly important for the immunodiagnosis of NCC as they may affect the results between individuals.

#### 4. Detection of Antigens or Antibodies for the Immunodiagnosis of NCC

Immunodiagnostic tests can be divided in two major groups: the ones that use an antigenic mixture or single antigens to try to find antibodies against them; and the ones that use specific antibodies to find specific antigens in the samples.

Looking for antibodies against cysticercal antigens can be done using a variety of samples from the human body: serum, CSF, urine, saliva, and so forth, but a major disadvantage of this approach is that false positives can result as antibodies do not necessarily indicate an active infection with viable metacystodes but a resolved one or exposure to the parasite [61]. Another disadvantage is that cross-reactivity may occur with other parasitic diseases, most commonly *Echinococcus granulosus* [25, 62–67], although cross-reactivity has also been reported with other diseases as hymenolepiasis, fascioliasis [62], toxoplasmosis [67, 68], malaria [67], amoebiasis [67], syphilis [68], hepatitis B [68], toxocariasis [62], cerebral tuberculosis [37, 67], mononucleosis [68], among others [25, 37, 65], which may be due to the selection of bad characterized samples and not necessarily to the fact that patients are infected with something else

than *T. solium*. However, the search for antibodies in samples has the advantage that mixtures of antigens can be used (as parasite extracts or semipurified antigens) while the search for antigens needs to have specific antibodies against the desired antigens but can indicate an active infection [15, 69]. When looking for antibodies against parasite antigens, the most frequently used samples are serum or CSF and the most common immunoglobulin is IgG as it is the predominant antibody detected in NCC, although IgA, IgE, and IgM can also be detected but have little value in diagnosis [13, 70], though they can be used for follow-up, as NCC patients show undetectable levels of IgG4, IgM, and IgA antibodies in saliva after drug treatment, while antibodies in serum persist longer regardless of the subtype [33].

#### 5. Antigens Used for Immunodiagnosis of NC

Multiple antigens have been used for the immunodiagnosis of cysticercosis, among them are low molecular mass (LMM) antigens [31], excretory/secretory (ES) [30, 31, 71–74], crude soluble extract (CSE) [31, 68], total saline extract [59], antigen B [75, 76], lentil lectin glycoproteins (LLGPs) [52],

vesicular fluid (VF) [68, 77], membrane and scolex extracts [68], somatic antigens [74], recombinant proteins [16–18, 20, 21, 25–28], and synthetic peptides [19, 24, 29]. The source of these antigens has been commonly *Taenia solium* (the parasite responsible for NCC) but related species as *Taenia crassiceps* [5, 24, 68, 77–79], *Taenia saginata* [59, 80], or *Taenia taeniformis* [81] have also been used as antigen sources; and among the multiple methods used to date for the immunodiagnosis of NCC complement fixation, agglutination, radioimmunoassays, ELISA and Western Blot (WB) can be counted [34, 77, 80, 82, 83]. Some of these methods are too old, but have the advantage of being cheap, so they could be used with new antigens and yield different results.

Most commonly for the immunodiagnosis of NCC, serum or CSF samples are used with some advantages and disadvantages for each one. For instance, it is proposed that the detection of antigens or antibodies in CSF is better than in serum because there is a release of parasite antigens directly to it or local production of antibodies, but it is more difficult and dangerous to obtain than serum and requires special facilities. However, WB with LLGPs (LLGP-WB, considered by many to be the most reliable method for serologically detecting NCC) both samples have no significant differences in performance, although antigen detection by ELISA is better in CSF than in serum, but this test is less sensitive than LLGP-WB [69].

LLGP-WB [84] has a sensitivity of >90% and a specificity of 100% [2]. This assay involves the separation of 7 glycoprotein antigens (50, 42–39, 24, 21, 18, 14, and 13 kDa) by SDS-PAGE and its recognition in an immunoblot by serum of CSF antibodies. However, in recent studies mainly in Indian patients where almost two thirds of the NCC patients have an SCG [35, 52], LLGPs have shown to be less sensitive than for multiple cysticerci. In these cases, sensitivity has been reported to range between 50 and 80% and specificity between 94 and 100% [22, 35, 85, 86]. Also this test has been shown to be less sensitive in children than in adults and the pattern of protein recognition also differed in these age groups (children tend to recognize the higher molecular mass proteins while adults tend to recognize LMM with serum or CSF antibodies) [87] probably due to the time of infection and the antigenic stimuli. The most common bands identified by serum antibodies are, along with the 18 and 14 kDa, the 29 kDa for SCG and the 31 kDa for multiple lesions [35]. In Latin American NCC patients, where multiple lesions are more common than SCG, the most common recognized bands were 39–42 kDa and 21 kDa [60]. So there seems to be differences not only in the amount of antibodies produced between SCG and multiple lesions [88, 89], but also in the antigens recognized by these antibodies. To try to improve the diagnosis of SCG patients, LLGPs have been unfolded and reduced trying unmask epitopes that may detect antibodies in these SCG patients and resulted that the unfolding of the diagnostic proteins with urea exhibited the maximum antibody binding and in this conformation 46% of the patients with SCG that were serologically negative became positive [35].

Problems like this one, or the difficulty to differentiate between NCC and cysticercosis elsewhere have lead to the search of new antigens and methods to immunodiagnose NCC. Antigenic extracts from *Taenia solium* cysticerci have been reevaluated [31, 68, 90], as well as antigens from other related species as *Taenia taeniformis* [81], *Taenia saginata* [59, 80] or *Taenia crassiceps* [5, 24, 68, 77–79], which have been useful for identifying new protein candidates for the immunodiagnosis of NCC and also have shown drawbacks as the propensity to cross-reactions which has lead to tests with low specificity. However, the use of related species as the ones mentioned above provide an alternative source of parasitic antigens as there are difficulties to obtain *Taenia solium* cysticerci from a natural infected source, even in areas of high endemicity [78, 91]. However, the use of parasitic extracts present many drawbacks that need to be considered if intended for immunodiagnosis as the variation between isolates and differences in the methods of extraction by different laboratories, which leads to poor reproducibility and invalid comparisons between results.

## 6. Advances in the Methods for Immunodiagnosis of NC

New methods for the immunodiagnostic of NCC have also been developed involving the reevaluation of common methods with new antigens (e.g., ELISA or WB), or the use of different samples as urine or saliva [30, 31, 33], as they have the advantage that they are very simple to obtain and do not cause any harm to the patient. They are also convenient to assay in endemic areas as facilities to obtain CSF or serum samples are not frequently present [92]. However with these samples not very good results have been obtained in terms of sensitivity or specificity, especially with patients with SCG, and the methods need to be validated with well-defined positive and negative NCC samples and with samples from other parasitic diseases. In the case of urine, sensitivity has been reported to be of 92% which decreased to 62.5% for SCG patients when antigens were detected with monoclonal antibody-ELISA [32]. Results were not very good for antibody detection either by ELISA or LLGP-WB in urine, with reported sensitivities ranging from 44 to 76% and specificities from 33 to 66%, despite the antigen used (ES, LMM, or CSE) [30, 31]. Saliva has been tested for the detection of antibodies against CSE or antigen B (composed by 2 immunologically identical polypeptides prepared by collagen-binding method [75, 76]) with no much better results for any of the immunoglobulins tested (IgG, IgG1, IgG4, IgM, and IgA), although it was shown that IgG4 in saliva could be a useful tool for patients' follow-up after treatment [33]. Nonetheless, these and other studies lack the appropriate controls (well-defined positive and negative samples, and well-defined samples of patients with other infections to assess cross-reactions). Another method that has emerged for the diagnosis of NCC, although it is not immunologically very interesting, is the amplification by PCR of *T. solium* DNA present in the CSF of NCC patients, with a high reported sensitivity of 96.7% [93], though

control samples from patients with other parasitic infections were not included. Other methods for the immunodiagnosis of NCC have also been tried in an attempt to substitute the LLGP-WB assay as its performance is expensive and requires technical expertise. Among these methods is the dot blot which is easier to perform and has shown to have sensibility and specificity similar to ELISA [64, 67, 90, 94].

In addition, there have been efforts to try to correlate the result in an immunodiagnostic test with the location and state of the cysticerci in the brain. An example is the detection of the antigen HP10 in CSF, which correlates with the location of the cysticerci in the brain: when located in the subarachnoidal space or the ventricles, HP10 could be detected, but when located in the parenchyma HP10 could not be detected; and when cysts were damaged, HP10 levels were reduced significantly [15]. Also high antigen levels in CSF suggest the presence of subarachnoid NCC [69]. Many studies have reported tests that can differentiate live from dead cysticerci by the detection of excretory/secretory (ES) antigens in CSF or serum [71–74], or by the detection of antibodies against a 10 kDa protein from the vesicular fluid of *Taenia solium* [17, 25]. These studies support the idea that infected hosts produce antibodies of different specificities as the cysticercus develops, degenerates, and dies because the antigens released by the parasite in each state are different [72].

Many of the most recent efforts in the field of immunodiagnosis of NCC have centered in the production of recombinant proteins or synthetic peptides that could provide a reliable source of antigens without depending on obtaining cysts from naturally infected hosts. The advantage of these antigens is that they would make comparable results between and within laboratories as there is no need to purify cysticercal antigens. However, synthesized or recombinant proteins do not have the same glycosylation pattern as those obtained directly from the parasite (recombinant proteins) or do not have any glycosylation at all (chemically synthesized proteins). This often affects the sensibility of the produced protein, which is frequently assessed with sera that were positive to the native protein, but rarely with different patients' sera to assess if the produced protein could detect more cases than the native one [16, 19–21]. A sensitivity of 95% means that the produced protein can detect 95% of the cases that the native protein detected, though that does not represent a real improvement in immunodiagnosis of NCC unless it can also detect cases that the native protein could not.

The principal protein targets to produce or synthesize are the components of the LLGP-WB that are recognized by NCC patients, and several of them have been already synthesized and tested preliminarily. For instance, from the members of the 8 kDa family, Ts18var1 has been produced in insect cells [16] as well as TsRs1, Ts18var1, and Ts18 Var3 [20]; the 14 and 18 kDa proteins produced by recombination [27]; Ts14, Ts18var1, TSRS1, and TSRS2var1 by chemical synthesis [29], and full-length Ts18 and Ts14 by chemical ligation [19], Ag1V1/Ag2 by recombination [26] as well as Ts8B1, Ts8B2, Ts8B3 [18], Ts14 [27] and a 10 kDa protein [17, 25]; GP50, which is not a member of the

8 kDa family but it is part of the LLGPs, was produced by recombination in bacteria and in a baculovirus expression system [16, 21]. Other proteins outside those from LLGPs that have also been produced or synthesized include T24 (integral membrane protein that does not bind to lentil lectin) produced in a drosophila cell line [22]; HP6-Tsag (oncospheral adhesion protein of *Taenia saginata*) in bacteria and baculovirus systems with similar specificities between the systems (93–95%), but higher sensitivity for the inactive cases by the baculovirus protein (48–64%) [95]; peptide NC-1 selected by phage-display [23]; peptides KETc12, 410, and 413 synthesized from a cDNA library of *T. crassiceps* [24], and recombinant TS24 and Es33 [28]. The methods of production are varied, as well as the results and the ways to evaluate the produced protein, some giving very good sensitivities but in other cases, the native protein is much better than the produced one.

Finally a very interesting approach for the diagnosis of cysticercosis in pigs has been developed. This approach involves the production of nanobodies (camelid-derived single-domain antibody fragments) by recombination after immunizing dromedaries with cysticercal antigens its evaluation for serodiagnosing cysticercosis in pigs. The selected nanobodies had the advantage that did not cross-react with other closely-related parasitic diseases as *Taenia hydatigena*, *Taenia saginata*, *Taenia crassiceps*, or *Trichinella spiralis*, although cross-reactivity with other parasites as *Echinococcus granulosus* was not assessed. Nanobodies are heavy-chain-only antibodies that recognize antigens as firmly as normal antibodies do but are about one tenth their size [96]. This characteristic allows them to often recognize epitopes that are not readily accessible to conventional antibodies [97]. Nanobodies have been used also in the diagnosis of trypanosomiasis [98] or malaria [99], but mostly there are being directed to treat more efficiently autoimmune diseases or cancer than commercial conventional antibody therapies [100]. Nanobodies have beneficial production and stability properties [97] which, along with their antigen-recognition characteristics, make them a promising tool for the diagnosis and treatment of many diseases in which NCC may be included, and this approach should be translated to the NCC field as it may provide an assay with higher sensitivity, especially for diagnosing SCG patients which are often negative in conventional tests, by recognizing epitopes that are not recognized by conventional antibodies.

Despite all these efforts and alternatives, a definitive immunodiagnostic test for NCC has not been achieved. The need to account with a more reproducible and sensitive immunodiagnostic test than the actual ones remains, and some studies have focused on this issue by synthesizing antigens from LLGPs used in WB and other antigens, but still there is the need to find new antigens that can detect those cases that are negative in LLGP-WB like SCG cases. Different protein expression systems have been tried to overcome the problem of requiring a natural source of antigens and the difficulties of purifying cysticercal antigens, but the produced proteins lack the natural glycosylation pattern and show diminished sensitivity than the native proteins. New approaches to diagnose NCC should be explored, as

the use of nanobodies that could result very interesting in detecting difficult cases. Developing an immunodiagnostic test that could detect 100% of the true NCC cases and exclude 100% of the true negative cases has been difficult, especially considering biological factors that are involved and the many forms of cysticercosis as differences in the genetics of the host and of the parasite, and there is still much to do to improve the current tests. The biological factors, especially those related to genetic differences of the host or the parasite, that affect NCC may explain why a particular immunodiagnostic test first reports very high sensitivity and specificity scores that then lower as it is being applied in different regions and by different laboratories; and these factors could also make impossible the development of a single immunodiagnostic test, but local tests that can detect cases in a certain endemic area can be developed.

Special attention should be paid in the cases selected to evaluate new tests so results can be compared with other tests, especially in the cases selected as controls (healthy individuals and with other parasitic diseases) as these are responsible for the specificity reported and an adequate selection can assure that results can be compared between tests. Also, attention should be put in including different subsets of NCC clinical types, as these differences affect the amount of antibodies or antigens that can be detected. Extraparenchymal forms of NCC are associated with higher circulating antigen levels and more reactive antibody bands in LLGP-WB than intraparenchymal forms [69, 101–104]. These differences can affect the estimation of the performance of newly developed tests, so attention should be put in the number of cases of each sub-type that are included.

A plausible approach to identify antigens that can be useful for the serodiagnosis of NCC is the separation in 2 dimensions of cysticercal antigens and their recognition by hosts' immunoglobulins. This method can give us useful information about the differences in recognition of the parasite's antigens by different hosts (immunological diversity) and about the antigens that are recognized by many or all infected hosts (if there are any) to select antigens for use in an immunodiagnostic test to detect true positive cases.

Finally, the following proposals for improving the actual immunodiagnostic tests are made.

**6.1. Proposals for Improvement.** (1) *T. solium* disease is present in many countries around the world and many research groups are working to develop an immunodiagnostic test that can detect all NCC individuals although so far that goal has not been accomplished. Cooperation is necessary to concert a worldwide effort to carefully design a research plan concordant with the complexities of *T. solium* disease, and to develop and test in the short term with a minimal number of options from which to select the most proficient immunodiagnosis of NCC the possibility to be put to immediate production and general use while further research for improvement continues.

(2) Clearing the problem of antigen cross-reactivity and species representation is necessary to succeed in developing

an immunodiagnostic test for NCC. Purification of antigen(s) or epitopes critically certified to be exclusive of *T. solium* and present in all members of a representative sample of parasite specimens of an endemic site is mandatory. Some likely candidates have been proposed [105], although further research is necessary to determine if they fulfill the conditions mentioned above. A way of avoiding the high costs and demanding technical skills involved in the purification of natural antigens is the use of those present in phage display peptide libraries [23] or the production of recombinant or chemically synthesized antigens [106]. Antigens present in only *T. solium* but not in other *Taenia* species would constitute the candidate antigen preparation (CAP).

(3) It is also necessary to study and characterize the presumed wide spectrum of humans' antibody production in *T. solium* disease in order to calibrate the candidate antigen preparation that would include all infected individuals. Western Blots using CAP in reaction with representative samples of all subsets of infected individuals (regardless of whether the parasite had established or not) if possible, or at least of confirmed cysticercosis and NCC samples, would provide the images necessary to construct all immunological profiles of the infected individuals. Computer-assisted image analysis of WB and cluster analysis could address this problem. The set of CAP that reacts with all or most infected individuals in which the parasite was established would constitute the definitive antigen preparation (DAP).

(4) Rather than attempting to develop ways to distinguish each of the different subsets of NCC disease, efforts in immunodiagnosis could focus on improving diagnosis of NCC (to include all NCC and NCC + cysticercosis samples and exclude cysticercosis, taeniosis, and infected but not established samples), while for the prevalence of *T. solium* disease, in whatever its form, it should only clearly distinguish members of the infected (established or not) from the not infected.

Three are the classes of *T. solium* disease that matter the most and perhaps require different strategies: the contact case, the NCC case (whether it is only NCC or NCC + cysticercosis elsewhere), and the tapeworm carrier. For this purpose, it is indispensable to construct representative and certified negative and positive control panels of the samples CSF, serum, and feces from each geographic area upon their reaction with DAP. Certification of the members of cysticercosis elsewhere and of the noninfected individuals is complicated by its need of whole-body scans in search of cysticerci located elsewhere of CNS. Additional negative control samples from a culturally and historically certified community or geographic area without *T. solium* disease and low in infectious diseases in general would be useful to establish the cut-off values for immunotesting with DAP.

(5) Once the problem of antigen specificity and representation is solved, there should be no major problem to Immunodiagnose NCC in the CSF of a symptomatic neurological patient nor of an intestinal tapeworm in the feces, preferably by antigen detection (this is to distinguish cysticercosis located elsewhere and live from dead cysticerci in the CNS because antibodies could persist after the death of the parasite for unknown periods of time).

(6) However there would remain serious problems to tackle for serology, the most accessible sample useful for the detection of early nonsymptomatic NCC cases in the general population and for epidemiological studies of *T. solium* disease prevalence. The major problem for serology in unambiguously detecting asymptomatic NCC cases is the potential location elsewhere of the parasite (cysticercosis elsewhere or taeniosis) that produces false-positive results or the low reactivity of patients with few live cysticerci or with dead cysticerci (NCC or elsewhere) that produces false-negative results. Adding to positive serology a marker of CNS damage [107, 108] as a sign of CNS involvement could help in discriminating NCC from other forms of *T. solium* disease.

The development of an effective and definitive immunodiagnostic test for NCC is possible, but a series of considerations and evaluations need to be addressed first as stated above, and a worldwide effort is required to develop a test that could be effective everywhere. Nonetheless, the effort is necessary and the result would be very useful to help eradicate this disease.

## Acknowledgments

Financial support was provided by Grant no. IN204311-3 (P. Ostoa-Saloma) from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPITT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. M. Esquivel-Velázquez is recipient of a doctoral scholarship from CONACYT (207061) for her PhD studies in the “Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB)” at UNAM.

## References

- [1] H. H. García, A. E. Gonzalez, C. A. W. Evans, and R. H. Gilman, “*Taenia solium* cysticercosis,” *The Lancet*, vol. 362, no. 9383, pp. 547–556, 2003.
- [2] A. C. White, “Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 24, no. 2, pp. 101–115, 1997.
- [3] World Health Organization (WHO), “Control of neurocysticercosis,” in *Proceedings of the 55th World Health Assembly*, April 2002, Provisional Agenda Item 13.18.
- [4] B. O. Colli, N. Martelli, J. A. A. Júnior et al., “Cysticercosis of the central nervous system. I. Surgical treatment of cerebral cysticercosis: a 23 years experience in the Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto Medical School,” *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 52, no. 2, pp. 166–186, 1994.
- [5] R. H. S. Peralta, A. J. Vaz, A. Pardini et al., “Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis,” *Acta Tropica*, vol. 83, no. 2, pp. 159–168, 2002.
- [6] V. Rajshekhar, G. Chacko, R. P. Haran, M. J. Chandy, and S. M. Chandi, “Clinicoradiological and pathological correlations in patients with solitary cysticercus granuloma and epilepsy: focus on presence of the parasite and oedema formation,” *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 59, no. 3, pp. 284–286, 1995.
- [7] A. Fleury, J. Morales, R. J. Bobes et al., “An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community,” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 100, no. 6, pp. 551–558, 2006.
- [8] A. Fleury, M. Hernández, G. Fragoso, R. M. E. Parkhouse, L. J. S. Harrison, and E. Sciuotto, “Detection of secreted cysticercal antigen: a useful tool in the diagnosis of inflammatory neurocysticercosis,” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 97, no. 5, pp. 542–546, 2003.
- [9] H. H. Garcia and O. H. Del Brutto, “Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease,” *The Lancet Neurology*, vol. 4, no. 10, pp. 653–661, 2005.
- [10] P. Salgado, R. Rojas, and J. Sotelo, “Cysticercosis: clinical classification based on imaging studies,” *Archives of Internal Medicine*, vol. 157, no. 17, pp. 1991–1997, 1997.
- [11] E. Sciuotto, G. Fragoso, A. Fleury et al., “*Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions,” *Microbes and Infection*, vol. 2, no. 15, pp. 1875–1890, 2000.
- [12] J. Sotelo and A. Flisser, “Neurocysticercosis. Practical treatment guidelines,” *CNS Drugs*, vol. 7, no. 1, pp. 17–25, 1997.
- [13] A. Carpio, “Diagnostic criteria for human cysticercosis,” *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 161, no. 2, pp. 185–188, 1998.
- [14] E. Sarti, P. M. Schantz, A. Plancarte et al., “Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico,” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 88, no. 1, pp. 49–52, 1994.
- [15] R. J. Bobes, M. Hernández, C. Márquez et al., “Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up,” *Tropical Medicine and International Health*, vol. 11, no. 6, pp. 943–950, 2006.
- [16] E. C. Bueno, C. M. Scheel, A. J. Vaz et al., “Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay,” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 3, pp. 278–283, 2005.
- [17] J. Y. Chung, Y. Y. Bahk, S. Huh, S. Y. Kong, Y. Kong, and S. Y. Cho, “A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 4, pp. 1307–1315, 1999.
- [18] E. Ferrer, P. Bonay, M. Foster-Cuevas et al., “Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 152, no. 1, pp. 90–100, 2007.
- [19] R. M. Greene, K. Hancock, P. P. Wilkins, and V. C. W. Tsang, “*Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens,” *Journal of Parasitology*, vol. 86, no. 5, pp. 1001–1007, 2000.
- [20] K. Hancock, A. Khan, F. B. Williams et al., “Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 6, pp. 2577–2586, 2003.
- [21] K. Hancock, S. Patabhi, R. M. Greene et al., “Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 133, no. 1, pp. 115–124, 2004.
- [22] K. Hancock, S. Patabhi, F. W. Whitfield et al., “Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic



- for cysticercosis," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 147, no. 1, pp. 109–117, 2006.
- [23] R. C. R. Hell, P. Amim, H. M. de Andrade et al., "Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display," *Clinical Immunology*, vol. 131, no. 1, pp. 129–138, 2009.
- [24] M. Hernández, C. Beltrán, E. García et al., "Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides," *Immunology Letters*, vol. 71, no. 1, pp. 13–17, 2000.
- [25] E. G. Lee, M. Y. Lee, J. Y. Chung et al., "Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-kDa antigen in the serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 99, no. 12, pp. 919–926, 2005.
- [26] M. O. Sato, Y. Sako, M. Nakao, H. Yamasaki, K. Nakaya, and A. Ito, "Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 12, pp. 1783–1790, 2006.
- [27] M. R. M. da Silva, A. A. M. Maia, N. M. Espíndola, L. D. R. Machado, A. J. Vaz, and F. Henrique-Silva, "Recombinant expression of *Taenia solium* TS14 antigen and its utilization for immunodiagnosis of neurocysticercosis," *Acta Tropica*, vol. 100, no. 3, pp. 192–198, 2006.
- [28] L. Salim, A. Ang, S. Handali, and V. C. W. Tsang, "Seroepidemiologic survey of cysticercosis-taeniasis in four central highland districts of Papua, Indonesia," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 80, no. 3, pp. 384–388, 2009.
- [29] C. M. Scheel, A. Khan, K. Hancock et al., "Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-KD proteins: comparison of assay formats," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 73, no. 4, pp. 771–776, 2005.
- [30] S. R. V. Atluri, P. Singhi, N. Khandelwal, and N. Malla, "Evaluation of excretory secretory and 10–30 kDa antigens of *Taenia solium* cysticerci by EITB assay for the diagnosis of neurocysticercosis: brief definitive report," *Parasite Immunology*, vol. 31, no. 3, pp. 151–155, 2009.
- [31] S. R. V. Atluri, P. Singhi, N. Khandelwal, and N. Malla, "Neurocysticercosis immunodiagnosis using *Taenia solium* cysticerci crude soluble extract, excretory secretory and lower molecular mass antigens in serum and urine samples of Indian children," *Acta Tropica*, vol. 110, no. 1, pp. 22–27, 2009.
- [32] Y. Castillo, S. Rodriguez, H. H. García et al., "Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 80, no. 3, pp. 379–383, 2009.
- [33] N. Malla, R. Kaur, N. K. Ganguly, I. M. Sawhney, and R. C. Mahajan, "Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis," *Nepal Medical College Journal*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2005.
- [34] A. Flisser and T. W. Gyorkos, "Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniasis in México," *Parasite Immunology*, vol. 29, no. 12, pp. 637–649, 2007.
- [35] V. Prabhakaran, V. Rajshankar, K. D. Murrell, and A. Oommen, "Conformation-sensitive immunoassays improve the serodiagnosis of solitary cysticercus granuloma in Indian patients," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 101, no. 6, pp. 570–577, 2007.
- [36] M. Ramos-Kuri, R. M. Montoya, A. Padilla et al., "Immunodiagnosis of neurocysticercosis: disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients," *Archives of Neurology*, vol. 49, no. 6, pp. 633–636, 1992.
- [37] S. J. Furrows, J. McCroddan, W. J. Blish, and P. Chiodini, "Lack of specificity of a single positive 50-kDa band in the electroimmunotransfer blot (EITB) assay for cysticercosis," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, no. 5, pp. 459–462, 2006.
- [38] A. Fleury, A. Dessein, P. M. Preux et al., "Symptomatic human neurocysticercosis: age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity," *Journal of Neurology*, vol. 251, no. 7, pp. 830–837, 2004.
- [39] J. Morales-Montor, A. Chavarria, M. A. De León et al., "Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm," *Journal of Parasitology*, vol. 90, no. 3, pp. 531–546, 2004.
- [40] J. Morales-Montor, S. Baig, C. Hallal-Calleros, and R. T. Damian, "*Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis," *Experimental Parasitology*, vol. 100, no. 4, pp. 209–216, 2002.
- [41] I. Marriott and Y. M. Huet-Hudson, "Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms," *Immunologic Research*, vol. 34, no. 3, pp. 177–192, 2006.
- [42] A. Chavarría, A. Fleury, E. García, C. Márquez, G. Frago, and E. Sciuotto, "Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles," *Clinical Immunology*, vol. 116, no. 3, pp. 271–278, 2005.
- [43] O. H. Del Brutto, E. Garcia, O. Talamas, and J. Sotelo, "Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis," *Archives of Internal Medicine*, vol. 148, no. 3, pp. 544–546, 1988.
- [44] A. Fleury, T. Gomez, I. Alvarez et al., "High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico," *Neuroepidemiology*, vol. 22, no. 2, pp. 139–145, 2003.
- [45] D. Verthelyi, "Sex hormones as immunomodulators in health and disease," *International Immunopharmacology*, vol. 1, no. 6, pp. 983–993, 2001.
- [46] S. Khurana, A. Aggarwal, and N. Malla, "Prevalence of anti-cysticercus antibodies in slum, rural and urban populations in and around Union Territory, Chandigarh," *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, vol. 49, no. 1, pp. 51–53, 2006.
- [47] M. Tibayrenc, "Human genetic diversity and the epidemiology of parasitic and other transmissible diseases," *Advances in Parasitology*, vol. 64, pp. 377–462, 2007.
- [48] C. Alves, T. Souza, I. Meyer, M. B. P. Toralles, and C. Brites, "Immunogenetics and infectious diseases: special reference to the major histocompatibility complex," *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 10, no. 2, pp. 122–131, 2006.
- [49] S. C. Shafir, F. J. Sorvillo, and L. Smith, "Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in African-Americans," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 22, no. 1, pp. 37–45, 2009.
- [50] F. Verra, P. Avellino, G. Bancone, V. Mangano, and D. Modiano, "Genetic epidemiology of susceptibility to malaria: not only academic exercises," *Parassitologia*, vol. 50, no. 1–2, pp. 147–150, 2008.
- [51] O. H. Del Brutto, G. Granados, O. Talamas, J. Sotelo, and C. Gorodezky, "Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, C, DR, and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis," *Human Biology*, vol. 63, no. 1, pp. 85–93, 1991.

- [52] G. Singh, "Neurocysticercosis in South-Central America and the Indian subcontinent. A comparative evaluation," *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 55, no. 3, pp. 349–356, 1997.
- [53] R. Vega, D. Piñero, B. Ramanankandrasana et al., "Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: Implications for clinical profile diversity and immunological technology," *International Journal for Parasitology*, vol. 33, no. 13, pp. 1479–1485, 2003.
- [54] K. Hancock, D. E. Broughel, I. N. S. Moura et al., "Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia," *International Journal for Parasitology*, vol. 31, no. 14, pp. 1601–1607, 2001.
- [55] M. Nakao, M. Okamoto, Y. Sako, H. Yamasaki, K. Nakaya, and A. Ito, "A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide," *Parasitology*, vol. 124, no. 6, pp. 657–662, 2002.
- [56] P. Maravilla, V. Souza, A. Valera et al., "Detection of Genetic Variation in *Taenia solium*," *Journal of Parasitology*, vol. 89, no. 6, pp. 1250–1254, 2003.
- [57] G. Campbell, H. H. Garcia, M. Nakao, A. Ito, and P. S. Craig, "Genetic variation in *Taenia solium*," *Parasitology International*, vol. 55, supplement, pp. S121–S126, 2006.
- [58] R. J. Bobes, G. Fragoso, M. D. R. Reyes-Montes et al., "Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico," *Veterinary Parasitology*, vol. 168, no. 1–2, pp. 130–135, 2010.
- [59] H. B. Oliveira, G. A. MacHado, M. D. R. F. Gonçalves-Pires, L. P. Moura, and J. M. Costa-Cruz, "Saline extract of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid," *Parasitology Research*, vol. 105, no. 1, pp. 169–174, 2009.
- [60] J. V. Proaño-Narvaez, A. Meza-Lucas, O. Mata-Ruiz, R. C. García-Jerónimo, and D. Correa, "Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 6, pp. 2115–2118, 2002.
- [61] H. H. Garcia, A. E. Gonzalez, R. H. Gilman et al., "Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions—a major contributor to high seroprevalence," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 65, no. 1, pp. 31–32, 2001.
- [62] P. Dekumyoy, J. Waikagul, S. Vanijanonta et al., "Cysticercosis: IgG-ELISA evaluations of peak1 antigen and < 30 kDa antigen of delipidized extract of *Taenia solium* metacestodes," *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol. 35, no. 1, pp. 1–9, 2004.
- [63] B. Gottstein, V. C. W. Tsang, and P. M. Schantz, "Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 35, no. 2, pp. 308–313, 1986.
- [64] E. Hernandez-Cruz, J. J. González-Cabriales, C. Ordaz-Pichardo, N. I. De La Cruz-Hernández, and G. H. Flores-Gutiérrez, "Development of an immunobinding dot-blot assay as an alternative for the serodiagnosis of human cysticercosis," *Journal of Helminthology*, vol. 83, no. 4, pp. 333–337, 2009.
- [65] M. M. I. Ishida, G. Rubinsky-Elefant, A. W. Ferreira, S. Hoshino-Shimizu, and A. J. Vaz, "Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals," *Acta Tropica*, vol. 89, no. 1, pp. 73–84, 2003.
- [66] N. M. Espindola, A. H. Iha, I. Fernandes et al., "Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 7, pp. 3178–3184, 2005.
- [67] J. Mandal, P. D. Singhi, N. Khandelwal, and N. Malla, "Evaluation of lower molecular mass (20–24 kDa) *Taenia solium* cysticercus antigen fraction by ELISA and dot blot for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children," *Parasitology Research*, vol. 102, no. 5, pp. 1097–1101, 2008.
- [68] G. C. Arruda, A. D. T. Da Silva, E. M. A. B. Quagliato, M. A. Maretti, and C. L. Rossi, "Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 10, no. 10, pp. 1005–1012, 2005.
- [69] S. Rodriguez, P. Dorny, V. C. W. Tsang et al., "Detection of *Taenia solium* antigens and anti-*T. solium* antibodies in paired serum and cerebrospinal fluid samples from patients with intraparenchymal or extraparenchymal neurocysticercosis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 199, no. 9, pp. 1345–1352, 2009.
- [70] E. C. Bueno, A. J. Vaz, L. Machado, and J. A. Livramento, "Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens," *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 58, no. 1, pp. 18–24, 2000.
- [71] H. H. Garcia, R. M. E. Parkhouse, R. H. Gilman et al., "Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 94, no. 6, pp. 673–676, 2000.
- [72] J. A. Lopez, E. Garcia, I. M. Cortes, J. Sotelo, P. Tato, and J. L. Molinari, "Neurocysticercosis: relationship between the developmental stage of metacestode present and the titre of specific IgG in the cerebrospinal fluid," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 98, no. 6, pp. 569–579, 2004.
- [73] J. L. Molinari, E. Garcia-Mendoza, Y. De la Garza, J. A. Ramirez, J. Sotelo, and P. Tato, "Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 66, no. 6, pp. 777–781, 2002.
- [74] P. S. Sahu, S. C. Parija, S. K. Narayan, and D. Kumar, "Evaluation of an IgG-ELISA strategy using *Taenia solium* metacestode somatic and excretory-secretory antigens for diagnosis of neurocysticercosis revealing biological stage of the larvae," *Acta Tropica*, vol. 110, no. 1, pp. 38–45, 2009.
- [75] J. S. Grewal, S. Kaur, G. Bhatti, N. K. Ganguly, R. C. Mahajan, and N. Malla, "Kinetics of humoral and cellular immune responses in experimental cysticercosis in pigs infected with *Taenia solium*," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 111, pp. 43–49, 2000.
- [76] J. P. Lacleste, A. Alagon, K. Willms, and A. Torre-Blanco, "Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen," *Journal of Parasitology*, vol. 76, no. 2, pp. 273–275, 1990.
- [77] E. C. Bueno, M. Snege, A. J. Vaz, and P. G. Leser, "Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci," *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 8, no. 6, pp. 1140–1144, 2001.

- [78] E. C. Bueno, A. J. Vaz, L. Machado, J. A. Livramento, and S. R. Mielle, "Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 1, pp. 146–151, 2000.
- [79] M. M. I. Ishida, R. H. S. Peralta, J. A. Livramento, S. Hoshino-Shimizu, J. M. Peralta, and A. J. Vaz, "Serodiagnosis of neurocysticercosis in patients with epileptic seizure using ELISA and immunoblot assay," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 48, no. 6, pp. 343–346, 2006.
- [80] H. B. Oliveira, G. A. Machado, D. D. Cabral, and J. M. Costa-Cruz, "Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis," *Parasitology Research*, vol. 101, no. 4, pp. 1007–1013, 2007.
- [81] N. Shukla, N. Husain, Jyotsna, S. Gupta, and M. Husain, "Comparisons between scolex and membrane antigens of *Cysticercus fasciolaris* and *Cysticercus cellulosae* larvae for immunodiagnosis of neurocysticercosis," *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 41, no. 6, pp. 519–524, 2008.
- [82] B. Espinoza, G. Ruiz-Palacios, and A. Tovar, "Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 24, no. 4, pp. 536–541, 1986.
- [83] E. Garcia, G. Ordonez, and J. Sotelo, "Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, no. 12, pp. 3324–3325, 1995.
- [84] V. C. W. Tsang, J. A. Brand, and A. E. Boyer, "An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*)," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 159, no. 1, pp. 50–59, 1989.
- [85] O. H. Del Brutto, R. Santibanez, C. A. Noboa, R. Aguirre, E. Diaz, and T. A. Alarcon, "Epilepsy due to neurocysticercosis: analysis of 203 patients," *Neurology*, vol. 42, no. 2, pp. 389–392, 1992.
- [86] V. Prabhakaran, V. Rajshekhkar, K. D. Murrell, and A. Oommen, "*Taenia solium* metacestode glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 98, no. 8, pp. 478–484, 2004.
- [87] F. Aguilar-Rebolledo, A. Meza-Lucas, J. Torres et al., "Evaluation of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of neurocysticercosis in children," *Journal of Child Neurology*, vol. 17, no. 6, pp. 416–420, 2002.
- [88] E. Santamaría, A. Plancarte, and A. S. De Aluja, "The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of establishment," *Journal of Parasitology*, vol. 88, no. 1, pp. 69–73, 2002.
- [89] A. C. White and H. H. Garcia, "Recent developments in the epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention of neurocysticercosis," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 1, no. 5, pp. 434–440, 1999.
- [90] J. Mandal, P. D. Singhi, N. Khandelwal, and N. Malla, "Evaluation of ELISA and dot blots for the serodiagnosis of neurocysticercosis, in children found to have single or multiple enhancing lesions in computerized tomographic scans of the brain," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 100, no. 1, pp. 39–48, 2006.
- [91] M. K. Katti and E. C. Bueno, "Are alternative sources of parasitic (cysticercal) antigens necessary for diagnosis of neurocysticercosis?" *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 9, pp. 3524–3525, 2000.
- [92] M. Feldman, A. Plancarte, M. Sandoval, M. Wilson, and A. Flisser, "Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 84, no. 4, pp. 559–562, 1990.
- [93] C. R. Almeida, E. P. Ojopi, C. M. Nunes et al., "*Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis," *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, vol. 256, no. 5, pp. 307–310, 2006.
- [94] A. Plancarte, M. Fexas, and A. Flisser, "Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis," *International Journal for Parasitology*, vol. 24, no. 5, pp. 733–738, 1994.
- [95] E. Ferrer, L. M. González, J. Á. Martínez-Escribano et al., "Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis," *Parasitology Research*, vol. 101, no. 3, pp. 517–525, 2007.
- [96] W. W. Gibbs, "Nanobodies," *Scientific American*, vol. 293, no. 2, pp. 78–83, 2005.
- [97] N. Deckers, D. Saerens, K. Kanobana et al., "Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis," *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 5, pp. 625–633, 2009.
- [98] L. Ratier, M. Urrutia, G. Paris, L. Zarebski, A. C. Frasch, and F. A. Goldbaum, "Relevance of the diversity among members of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family analyzed with camelids single-domain antibodies," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 10, Article ID e3524, 2008.
- [99] K. A. Henderson, V. A. Streltsov, A. M. Coley et al., "Structure of an IgNAR-AMA1 complex: targeting a conserved hydrophobic cleft broadens malarial strain recognition," *Structure*, vol. 15, no. 11, pp. 1452–1466, 2007.
- [100] J. Wesolowski, V. Alzogaray, J. Reyelt et al., "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity," *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 198, no. 3, pp. 157–174, 2009.
- [101] T. Corona, D. Pascoe, and D. Gonzalez-Barranco, "Anti-cysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis," *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 49, no. 9, pp. 1044–1049, 1986.
- [102] I. N. Mohammad, D. C. Heiner, B. L. Miller, M. A. Goldberg, and I. G. Kagan, "Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 20, no. 4, pp. 775–779, 1984.
- [103] N. Rosas, J. Sotelo, and D. Nieto, "ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis," *Archives of Neurology*, vol. 43, no. 4, pp. 353–356, 1986.
- [104] D. Zini, V. J.R. Farrell, and A. A. Wadee, "The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis," *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 53, no. 8, pp. 656–661, 1990.
- [105] E. G. Lee, Y. A. Bae, S. H. Kim, S. P. Díaz-Camacho, Y. Nawa, and Y. Kong, "Serodiagnostic reliability of single-step

- enriched low-molecular weight proteins of *Taenia solium* metacestode of American and Asian isolates," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 104, no. 10, pp. 676–683, 2010.
- [106] S. Handali, M. Klarman, A. N. Gaspard et al., "Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, no. 1, pp. 68–72, 2010.
- [107] T. Schmitz, U. Felderhoff-Mueser, M. Sifringer, F. Groenendaal, S. Kampmann, and A. Heep, "Expression of soluble Fas in the cerebrospinal fluid of preterm infants with posthemorrhagic hydrocephalus and cystic white matter damage," *Journal of Perinatal Medicine*, vol. 39, no. 1, pp. 83–88, 2011.
- [108] R. L. Hayes, G. Robinson, U. Muller, and K. K. Wang, "Translation of neurological biomarkers to clinically relevant platforms," *Methods in Molecular Biology*, vol. 566, pp. 303–313, 2009.

## Review Article

## Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis

E. A. GARCÍA-ZEPEDA, A. ROJAS-LÓPEZ, M. ESQUIVEL-VELÁZQUEZ &amp; P. OSTOA-SALOMA

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México

## SUMMARY

*Amoebiasis is caused by the protozoa Entamoeba histolytica and persists as one of the leading parasitic diseases affecting millions worldwide. This parasite invades the intestinal mucosa, causing amoebic colitis and ulcers. It may also spread to other organs, mainly the liver, causing amoebic liver abscess (ALA). Current research efforts have focused on the development of specific diagnostic tests and animal models searching for a better understanding of the complex pathophysiology of this disease. Analysis of the inflammatory immune response during intestinal amoebiasis in both human disease and animal murine models has revealed an important regulatory role for chemokines and cytokines. Recruitment and activation of inflammatory cells can also be modulated by specific protease-mediated cleavage of cytokines and by secreted amoebic factors such as amoebapores and monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF). Unlike intestinal amoebiasis, analysis of the immune response in ALA has mainly been done in the hamster model. This has limited our information regarding the immune response during this phase of the disease. However, even with these limitations, several Th1/2 cytokines, such as IL-6 and IL-4, and regulatory cytokines, like IL-10 and TGF $\beta$ , have been associated to the development of this disease.*

**Keywords** amoebiasis, chemokines, cytokines, Entamoeba histolytica

## INTRODUCTION

Amoebiasis is caused by infection with the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. It has been estimated that 40–100 000 people die worldwide, every year due to this disease. In a recent survey, 1.3 million cases of intestinal amoebiasis were reported in Mexico. Although this data did not distinguish between infection by *E. histolytica* or *E. dispar*, the results are consistent with serologic studies that show that at least 8% of the population have been infected with the parasite (1).

Despite that several animal models have been developed and tested, none of them has provided a complete panorama of the immunological mechanisms involved in the invasion and establishment of the parasite, although some interesting clues have been obtained regarding the complexity of this parasitic disease.

This review is focused on the current knowledge about cytokines and chemokines produced during the amoebic infection and their possible participation in the regulation of the inflammatory response.

## INTESTINAL AMOEBIASIS

Intestinal amoebiasis is the most common disease caused by *E. histolytica*. It is characterized by invasion of the intestinal mucosa, which causes ulcerative colitis. *Entamoeba histolytica* is capable of invading other organs such as the liver where it may cause hepatic abscess.

Upon invasion of the intestinal mucosa, *E. histolytica* trophozoites have to subvert a thick layer of highly glycosylated mucins which cover the intestinal epithelium (110–160 nm). Trophozoites interact with this layer through their adhesion molecules, of which the N-acetyl-D-galactosamine (Gal-GalNAc)-specific lectin is the most important (2). *In vitro* experiments using human epithelial cells and leucocytes have shown that the contact of the trophozoite with the host cell through the Gal-GalNAc lectin induces cell apoptosis.

Correspondence: Pedro Ostoa-Saloma, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México D.F. 04510, México (e-mail: postoa@servidor.unam.mx).

Received: 26 February 2007

Accepted for publication: 17 September 2007

The trophozoite gains access to the epithelium by proteolysis of mucins such as MUC2, the main mucin that covers the colonic epithelium (3). This makes it more susceptible to the damaging effects of other secreted molecules such as proteases and amoebapores, structurally and functionally similar to granulysin and NK-lysin. Amoebapores may induce epithelial and leucocyte necrosis during parasite invasion (4). A number of parasite-derived proteases have been identified as capable of degradation of extracellular matrix components and disruption of cellular monolayers *in vitro* (5).

As the parasite invasion process develops, the epithelium responds by mounting a protective inflammatory response. However, as epithelial cell lysis occurs, pro-inflammatory cytokines such as pro-IL-1 $\alpha$  are released. This cytokine is cleaved to its active form by cysteine proteases, some of them being of parasite origin (6). A series of regulatory events may occur at this stage. These may include the interaction of surface and soluble parasite-derived molecules (7–9) with the host cell, causing the release of epithelium cytokines/chemokines such as CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL3, CCL5, IL-6, granulocyte/macrophage colony stimulating factor, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . In addition, release of intracellular mediators such as cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase, all mediated by the NF- $\kappa$ B transcription factor activation. Altogether, cytokines and chemokines induce glandular hyperplasia and migration of leucocytes to the submucosa, contributing to the inflammatory process. Indeed, histological analyses of human biopsies have shown a mild infiltration of neutrophils, accompanied by hyperplastic lymphoid aggregates with macrophages and dendritic cells in the submucosa at the beginning of the ulceration process. However, an increment in the number of neutrophils, plasma cell, eosinophils, macrophages and T cells is observed as the infection progresses (10).

Since neutrophils predominantly recruit to the submucosa during infection with *E. histolytica*, the role of these cells in the resolution of the infection and the development of pathology has been broadly investigated. Human neutrophils activated with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-4 are able to kill trophozoites *in vitro* (11). However, *in vivo* experiments have shown that neutrophils are not capable of killing the parasite, probably because parasite superoxide dismutases and oxidoreductases are produced, which may inhibit the neutrophil respiratory burst (12).

Furthermore, neutrophil depletion in murine models of infection resulted in the presence of more severe ulceration of susceptible as compared to resistant strains (13,14), while in low susceptible models of infection, the absence of neutrophils allowed the formation of granulomas. Nevertheless, these mice resolved the infection similarly to their counterpart wild-type animals. Even though these cells are

involved in parasite destruction, other innate immune mechanisms are probably also associated with resistance to the infection.

The exact role of macrophages during the immune response to *E. histolytica* is not fully understood. Human monocytes as well as murine peritoneal, spleen and bone marrow-derived macrophages can kill the trophozoite, after cytokine stimulation (15). However, in a gerbil model of intracaecal infection, peripheral monocytes showed increased cytotoxic responses compared to macrophages isolated from mesenteric lymph nodes (16).

Furthermore, cell motility is essential for *E. histolytica* to invade host tissues, and this movement could be directed by chemotaxis of host molecules to amoeba such as TNF- $\alpha$ , which attracts trophozoites *in vitro* (17). Thus, amoebic trophozoites could evade the immune response by taking advantage of the immune response mounted against them.

TNF is a cytokine secreted by macrophages and enterocytes. It is also a major component involved in the amplification of the immune inflammatory response to *E. histolytica* (18). *In vitro* studies have shown that TNF- $\alpha$  induces nitric oxide (NO) production by macrophages, which is cytotoxic for *E. histolytica*. IFN- $\gamma$  may activate macrophages for TNF- $\alpha$  and NO production in response to live amoeba and amoebic proteins (19). The contribution of IFN- $\gamma$  to immunity against amoebiasis was assessed in a 3-year prospective study of 2- to 5-year-old children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. Production of IFN- $\gamma$  is correlated with the nutritional status and predict future susceptibility to symptomatic amoebiasis (20).

The role of T cells during amoebic colitis has been investigated by using different animal models of infection. In the C3H/HeJ susceptible mouse strain, depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes resulted in a reduction of mastocyte infiltration to the submucosa and a diminished secretion of IL-4 and IL-13. Consequently, a reduction in parasite burden was observed. In this model, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes may participate in the regulation of the inflammatory response through IL-4 secretion, even in the absence of other factors like IL-10 and TGF- $\beta$  (21). In contrast, *E. histolytica*-infected combined immunodeficient (SCID) mice developed lesions and resolved the infection similar to the wild-type strain (17).

IL-10 has been identified as a regulator of intestinal homeostasis in response to orally acquired pathogens (22). During an infection with *E. histolytica*, low IL-10 production has been observed in susceptible mice as well as in human epithelial cell lines (6,20,22). Hamano *et al.* (23) analyzed the role of IL-10 in amoebiasis bone marrow chimaeric mice. Unexpectedly, the resistance to infection in this model depended on the production of IL-10 by

nonhematopoietic cells rather than immune cells. Furthermore, *E. histolytica* infection in IL-10-deficient mice was achieved even with a resistant background (C57BL/6). Two probable mechanisms have been proposed to explain this IL-10-induced resistance. The first mechanism depends on the effect of IL-10 as an anti-inflammatory cytokine on epithelial cells and leucocytes recruited to the site of infection. The second involves the participation of IL-10 in the stimulation of mucin production by goblet cells in the epithelium (24). Thus, resistance may depend on the stimulation of homeostatic anti-inflammatory functions in the epithelium by IL-10, preventing the adherence of the trophozoite to the epithelium and an exacerbated immune response.

Parasite secreted products probably regulate macrophage-mediated responses to *E. histolytica* trophozoites (25). It has been shown that the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *E. histolytica* in axenic culture induces an increase in human monocytes cytokine production (both pro-inflammatory: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6 and IFN- $\gamma$ ; and anti-inflammatory: IL-10). IL-10 could orchestrate an anti-inflammatory pattern of cytokines and contribute to the scarce inflammation found in advanced lesions of invasive amoebiasis (26,27). In addition, MLIF is capable of reducing the expression of the CCL1 and CCL4 chemokines and their CCR1 receptor in human monocytic cells. It also has an inhibitory effect on the respiratory burst in macrophages and neutrophils, but not in eosinophils. Nevertheless, it is not clear if MLIF plays a role in human amoebiasis as it has not yet been identified in human amoebic colitis.

Other secreted products such as proteases may also play an important role in modulating the inflammatory process by affecting the biological functions of the cytokine/chemokine network. The proteolysis of the chemokines CCL2 and CCL13 by EhCP2, a cysteine protease has been reported to reduce the migration of monocytes and eosinophils. Interestingly, the proteolysis of CXCL8 chemokine has an opposite effect, since the cleaved chemokine caused an increment in neutrophil migration (28). In addition, EhCP5, another cysteine protease, is capable of inactivating both premature and mature IL-18 by proteolytic cleavage. This protease-mediated regulation of the inflammatory immune response could be part of the complex mechanisms employed by *E. histolytica* to successfully establish within the host. As a result, these proteases have become a therapeutic target for amoebiasis treatment.

But only a combination of evasive mechanisms involving both cellular and humoral responses, as well as secreted parasite products, may be required to allow persistence of *E. histolytica* in the gut. However, their exact function and contribution to the establishment of extra-intestinal disease, is still under investigation.

## AMOEBIC LIVER ABSCESS

Amoebic liver abscess (ALA) is an inflammatory lesion of the liver with a variety of clinical presentations. The complete life cycle of *E. histolytica* has not been reproduced in laboratory animals, but experimental ALA in hamsters and gerbils resemble human ALA, and untreated animals die as a consequence of tissue damage (29). In hamsters, an intense acute inflammatory reaction, characterized by the presence of viable *E. histolytica* trophozoites and abundant polymorphonuclear cells with some eosinophils, are seen during early establishment of *E. histolytica* in the liver (30–32). Moreover, in humans, the striking regeneration of the liver that follows successful treatment is probably related to these unusual inflammatory features (33). Th1-driven responses appear to be responsible for the outcome and the protective immunity in resolved invasive amoebiasis (34). Like other parasites (35), *E. histolytica* could orchestrate a polarized Th phenotype convenient to an invasive effort in predisposed individuals (36). IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  expression levels are significantly higher in humans with symptoms for amoebiasis (intestinal or ALA) in comparison to healthy controls. Interestingly, patients without symptoms but infected with *Entamoeba* sp. showed no difference in these cytokine levels in comparison with the control group. These cytokines (IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$ ) might have the potential to suppress cellular immune responses, resulting in a symptomatic infection (37).

In animal models of ALA, hepatic lesions can be provoked by direct inoculation of trophozoites into the liver of rabbits, hamsters or gerbils (38). During amoebiasis, suppression of the lymphoproliferative responses (both T and B cells) and cytokine production appear to be systemic. In gerbils, at day 20 of ALA (acute phase), levels of IL-2 appear significantly diminished when stimulating spleen cells with Con A compared to uninfected controls. As IL-2 plays a role in T cell activation and proliferation, the suppression of this cytokine production may contribute to the establishment of infection (39).

In contrast, while acute hepatic amoebiasis in gerbils is accompanied by transient immunosuppression, late infection and resistance to re-infection is associated with high IL-2 levels but low IL-4 and TNF- $\alpha$  expression (40).

Although innate and acquired immunity were classically considered to be self-governing entities, recent advances in understanding of Toll-like receptors signalling, cytokine function and complement activation have identified a network of regulators that direct a shift from innate to acquired immunity (41). One such factor is the inflammatory cytokine IL-6, which through differential control of leucocyte recruitment, activation and apoptosis has recently emerged as a regulator of this immunological switch. The generation of IL-6 knockout (KO) mice in 1994 lent a unique opportunity

to test directly the functions of IL-6 *in vivo* (42,43). IL-6-deficient mice developed normally but failed to control microbial infections and were defective in the production of T cell-dependent antibodies (44,45). IL-6-deficient mice were also compromised in their acute-phase responses to tissue injury (46). A series of *in vivo* studies indicated that IL-6 influences T cell polarization (47–49). However IL-6 does not act universally for the induction of a Th1- or Th2-type response. Interleukin 6 may favour IL-2 production and promote the development of a Th1 cell-mediated murine colitis (50). But, IL-6 is also known to suppress IL-12-mediated T cell polarization and to direct Th2 differentiation of naive T cells into IL-4-secreting cells (51).

Over the years, IL-6 has been assigned both pro- and anti-inflammatory characteristics (52,53). IL-6 could be defined as a resolution factor that balances pro- and anti-inflammatory immunological responses due to its ability to orchestrate the transition from innate to acquired immunity. Appropriate control of this immunological switch is essential in the successful resolution of any inflammatory episode, and IL-6 activity appears to be critical in the effective management of acute inflammation (54–57).

Low levels of IL-6 were identified in supernatant fluids of activated lymphocytes exposed to 220 kDa *E. histolytica* membrane-adhesion lectin of healthy adult Mexican mestizos who had long before recovered from ALA, as compared to healthy controls. Additionally, IL-5, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels were also lower in patients, but IL-2, IL-4 and IL-10 levels were similar in both groups (58). Therefore, a down-regulated IL-6 cytokine production may enhance ALA development (59).

## PERSPECTIVES

Updated studies in mice have not rendered conclusive data on the cellular and humoral factors which mediate resistance to *E. histolytica* infection. Thus, the cellular and molecular basis of immunity in naturally resistant species needs to be further explored for a more conclusive understanding of susceptibility and resistance to *E. histolytica* infection. If depressed IL-6 production plays a permissive role in the development of ALA, then IL-6 KO mice should be particularly sensitive to *E. histolytica* infection. A deficient IL-6 response, together with a low pro-inflammatory IFN- $\gamma$ , may contribute firstly to the early lodging of the amoeba in the liver and later to the paucity of inflammation and the progression to necrotic ALA.

In previous studies, it was shown that neutrophils play a major protective role in resolving hepatic *E. histolytica* infection in mice (60). During a resolving acute inflammatory episode in amoebiasis, chemokine-mediated leucocyte recruitment is characterized by an initial influx of neutrophils,

followed by their replacement with a more sustained population of mononuclear cells (61).

Although IL-6 does not affect the initial rate of neutrophil infiltration, studies in IL-6-deficient (IL-6<sup>-/-</sup>) mice have shown that IL-6 blocks neutrophil accumulation at sites of infection or inflammation (62).

Therefore in IL-6 KO mice, the transition from an early neutrophil to a late mononuclear cell inflammatory infiltrate if orchestrated by IL-6 (63) might not occur.

Finally, in order to gain a better insight into the modulatory role of cytokines and chemokines in intestinal or hepatic amoebiasis, the use of new yet unexplored KO mice should be considered. This approach will contribute to the understanding of immunological changes during the inflammatory processes induced by *E. histolytica*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We sincerely thank Dra. Isabel Pérez Montfort for English assistance. Financial support was partially provided by Grant # IN226507 (P.O.S) from Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México and Grant # 42554 (E.A.G.Z.) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). A.R.L. and M.E.V. received scholarship from CONACYT.

## REFERENCES

- Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, *et al*. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1994; **50**: 412–419.
- Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA & Mande LL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis* 1981; **143**: 83–93.
- Lidell ME, Moncada DM, Chadee K & Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 9298–9303.
- Berninghausen O & Leippe M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1997; **65**: 3615–3621.
- Hellberg A, Nowak N, Leippe M, Tannich E & Bruchhaus I. Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Protein Expr Purif* 2002; **24**: 131–137.
- Sharma M, Vohra H & Bhasin D. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology* 2005; **131**: 783–796.
- Kammanadiminti SJ, Mann BJ, Dutil L & Chadee K. Regulation of Toll-like receptor-2 expression by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica*. *FASEB J* 2004; **18**: 155–157.
- Maldonado-Bernal C, Kirschning CJ, Rosenstein Y, *et al*. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite Immunol* 2005; **27**: 127–137.



- 9 Yu Y & Chadee K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cells without parasite–enterocyte contact. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1536–1547.
- 10 Espinosa-Cantellano M & Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 318–331.
- 11 Sanchez-Guillen Mdel C, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, *et al.* Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**: 731–737.
- 12 Bruchhaus I & Tannich E. Induction of the iron-containing superoxide dismutase in *Entamoeba histolytica* by a superoxide anion-generating system or by iron chelation. *Mol Biochem Parasitol* 1994; **67**: 281–288.
- 13 Rivero-Nava L, Aguirre-Garcia J, Shibayama-Salas M, Hernandez-Pando R, Tsutsumi V & Calderon J. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *Exp Parasitol* 2002; **101**: 183–192.
- 14 Asgharpour A, Gilchrist C, Baba D, Hamano S & Houpt E. Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1<sup>+</sup> cells. *Infect Immun* 2005; **73**: 4522–4529.
- 15 Lin JY, Seguin R, Keller K & Chadee K. Tumor necrosis factor  $\alpha$  augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun* 1994; **62**: 1534–1541.
- 16 Denis M & Chadee K. *In vitro* and *in vivo* studies of macrophage functions in amebiasis. *Infect Immun* 1988; **56**: 3126–3131.
- 17 Blazquez S, Zimmer C, Guigon G, Olivo-Marin JC, Guillén N & Labruyere E. Human tumor necrosis factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 2006; **74**: 1407–1411.
- 18 Zhang Z, Mahajan S, Zhang X & Stanley SL Jr. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse–human intestinal xenograft model of disease. *Infect Immun* 2003; **71**: 5355–5359.
- 19 Wang W, Keller K & Chadee K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun* 1992; **60**: 3169–3174.
- 20 Haque R, Mondal D, Shu J, *et al.* Correlation of interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **76**: 340–344.
- 21 Houpt ER, Glembocki DJ, Obrigg TG, *et al.* The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2002; **169**: 4496–4503.
- 22 Kasper LH & Buzoni-Gatel D. Ups and downs of mucosal cellular immunity against protozoan parasites. *Infect Immun* 2001; **69**: 1–8.
- 23 Hamano S, Asgharpour A, Stroup SE, Wynn TA, Leiter EH & Houpt E. Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *J Immunol* 2006; **177**: 1208–1213.
- 24 Ivory C, Kammanadiminti S & Chadee K. Innate resistance to *Entamoeba histolytica* in murine models. *Trends Parasitol* 2007; **23**: 46–48.
- 25 Salata RA, Ahmed P & Ravdin JI. Chemoattractant activity of *Entamoeba histolytica* for human polymorphonuclear neutrophils. *J Parasitol* 1989; **75**: 644–646.
- 26 Rico G, Leandro E, Rojas S, Jiménez JA & Kretschmer RR. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res* 2003; **90**: 264–267.
- 27 Utrera-Barillas D, Velazquez JR, Enciso A, *et al.* An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunol* 2003; **25**: 475–482.
- 28 Belloso P, Ostoa Saloma P, Benitez I, Soldevila G, Olivos A & García-Zepeda E. *Entamoeba histolytica* cysteine protease 2 (EhCP2) modulates leucocyte migration by proteolytic cleavage of chemokines. *Parasite Immunol* 2004; **26**: 237–241.
- 29 Tsutsumi V & Shibayama M. Experimental amebiasis: a selected review of some *in vivo* models. *Arch Med Res* 2006; **37**: 210–220 (Review).
- 30 Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F & Martínez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol* 1984; **117**: 81–91.
- 31 Tsutsumi V & Martínez-Palomo A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. *Am J Pathol* 1988; **130**: 112–119.
- 32 Brandt H & Pérez-Tamayo R. Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol* 1970; **1**: 351–385.
- 33 Sepúlveda B & Martínez-Palomo A. Immunology of amebiasis by *Entamoeba histolytica*. In Cohen S, Warren K (eds): *Immunology of Parasitic Diseases*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1982: 170–191.
- 34 Kretschmer RR & López-Osuna M. Effector mechanisms and immunity to amebas. In Kretschmer R (ed.): *Amebiasis: Infection and Disease by E. Histolytica*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1990: 105–122.
- 35 Jankovic D & Sher A. Initiation and regulation of CD41 T-cell function in host–parasite models. In Romagnani G (ed.): *Th1 and Th2 Cells in Health and Disease*. Basel, Karger, 1996: 51–65.
- 36 Murray JS. How the MCM selects Th1/Th2 immunity. *Immunol Today* 1998; **19**: 157–163.
- 37 Bansal D, Sehgal R, Charla Y, Malla N & Majan C. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol* 2005; **27**: 37–43.
- 38 Lotter J, Gaworski I & Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* 2006; **74**: 118–124.
- 39 Campbell D, Gaucher D & Chadee K. Serum from *Entamoeba histolytica* infected gerbils selectively suppresses T cell proliferation by inhibiting interleukin-2 production. *J Infect Dis* 1999; **179**: 1495–1501.
- 40 Campbell D & Chadee K. Interleukin (IL)-2, IL4 and tumour necrosis factor  $\alpha$  augments nitric oxide dependent macrophages cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J Infect Dis* 1997; **175**: 1176–1183.
- 41 Hoebe K, Janssen E & Beutler B. The interface between innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2004; **10**: 971–974.
- 42 Kopf M, Baumann H, Freer G, *et al.* Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; **368**: 339–342.
- 43 Kopf M, Gros G, Coyle A, Kosco-Vilbois M & Brombacher F. Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6-deficient mice. *Immunol Rev* 1995; **148**: 45–69.
- 44 Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, Krishna M, Lucian LA & Murray R. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1996; **64**: 3231–3235.

- 45 Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, *et al.* The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses *in vivo*. *Science* 1994; **264**: 561–563.
- 46 Fattori E, Cappelletti M, Costa P, *et al.* Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med* 1994; **180**: 1243–1250.
- 47 Romani L, Mencacci A, Cenci E, *et al.* Impaired neutrophil response and CD4<sup>+</sup> T-helper cell-1 development in interleukin-6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 1996; **183**: 1345–1355.
- 48 Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E & Flavell M. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T-cells. *J Exp Med* 1997; **185**: 461–469.
- 49 La Flamme AC & Pearce EJ. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development *in vivo*, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B-cell responses. *J Immunol* 1999; **162**: 5829–5837.
- 50 Yamamoto I, Yoshizaki K, Kishimoto T & Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol* 2000; **164**: 4878–4882.
- 51 Wang J, Homer RJ, Chen Q & Elias JA. Endogenous and exogenous IL-6 inhibits aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol* 2000; **165**: 4051–4061.
- 52 Xing Z, Gauldie J, Cox G, *et al.* IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; **101**: 311–320.
- 53 Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA & Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; **83**: 113–118.
- 54 Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, *et al.* Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity* 2001; **14**: 705–714.
- 55 Barton BE & Jackson JV. Protective role of interleukin-6 in the lipopolysaccharide galactosamine septic shock model. *Infect Immun* 1993; **61**: 1496–1499.
- 56 Ulich TR, Yin S, Guo K, Yi ES, Remick D & del Castillo J. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines: interleukin-6 and transforming growth factor  $\beta$  inhibit acute inflammation. *Am J Pathol* 1991; **138**: 1097–1101.
- 57 Onogawa T. Local delivery of soluble interleukin-6 receptors to improve the outcome of  $\alpha$ -toxin producing *Staphylococcus aureus* infection in mice. *Immunobiology* 2009; **209**: 651–660.
- 58 Bekker C, Arellano J, Talamas P, Kretschmer R, Perez-Rodriguez ME. Amebic lectin stimulation of lymphocytes of Mexican Mestizos recovered from amebic abscess of the liver induces decreased production of IL5 and IL6. *Arch of Med Res* 2000; **31** (4 Suppl.): S96–S97.
- 59 Bekker-Mendez VC, Perez-Castillo VL, Rico-Rosillo MG, *et al.* Downregulation of selected cytokines in amoebiasis. *Arch Med Res* 2006; **37**: 556–558.
- 60 Velázquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-Garcia J, Tsutsumi V & Calderón J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol* 1998; **20**: 255–262.
- 61 Topley N, Liberek T, Davenport A, Li FK & Williams JD. Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. *Kidney Int* 1996; **56**: S17–S21.
- 62 Xing Z, Gauldie J, Cox G, *et al.* IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; **101**: 311–320.
- 63 Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A & Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2003; **24**: 583–588.

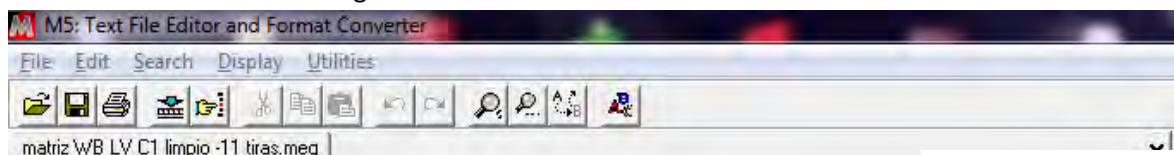
## Anexos

### Anexo I- Construcción de fenogramas con Mega 5

La construcción de fenogramas con Mega5 requiere los datos de las matrices de similitud previamente obtenidas con SPSS.

Paso 1. Creación del archivo de datos

1. Abrir Mega 5. En el menú File seleccionar "Edit a Text File". Se abrirá una ventana aparte. En esa ventana seleccionar el menú "File" y el submenú "New" para crear un nuevo archivo.
2. En esta pantalla se escribirá la información que el software Mega5 utilizará para crear el fenograma:



```
#mega
!Title: Arbol 1D WB bandas LV C1 matriz SPSS 13 OCT 2011;
!Format DataType=Distance DataFormat=LowerLeft NTaxa=11;
!Description arbol filogenetico a partir de matriz de similitudes SPSS;

[1] #S1
[2] #S2
[3] #S3
[4] #S4
[5] #S5
[4] #S6
[7] #S7
[8] #S8
[9] #S9
[10] #S10
[11] #S11

[ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11]

[1]
[2] .667
[3] .400 .286
[4] .333 .375 .750
[5] .364 .400 .857 .889
[6] .364 .400 .857 .889 1.0
[7] .571 .667 .400 .500 .545 .545
[8] .714 .778 .400 .500 .545 .545 .714
[9] .400 .286 1.00 .750 .857 .857 .400 .400
[10] .364 .400 .857 .889 1.00 1.00 .545 .545 .857
[11] .545 .400 .571 .667 .500 .500 .364 .364 .571 .500
```

Debe iniciar con #mega para indicar el tipo de archivo

Título de la información: "¡Title:" seguido del título deseado

Aquí se indica el formato de la información: el tipo de datos (DataType), el formato (DataFormat) y el número de Taxa (NTaxa) que en este caso son sueros.

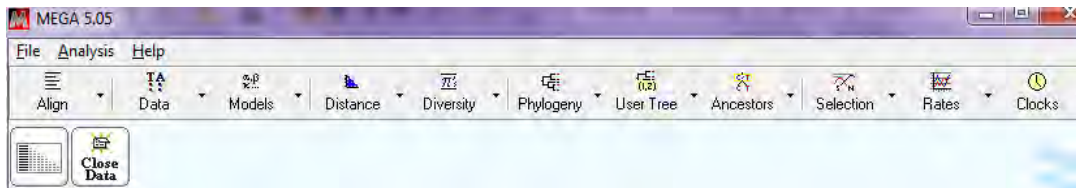
Descripción de la información del archivo.

Taxa, [número] seguido de un espacio y el nombre (en este caso "#S1" etc.

Los números de cada Taxa se indican aquí entre corchetes, al igual que verticalmente.

Estos son los datos de la matriz, como indicamos que el formato era LowerLeft sólo se colocan los datos de la parte inferior izquierda de la tabla de similitudes. Cada valor va separado por un espacio.

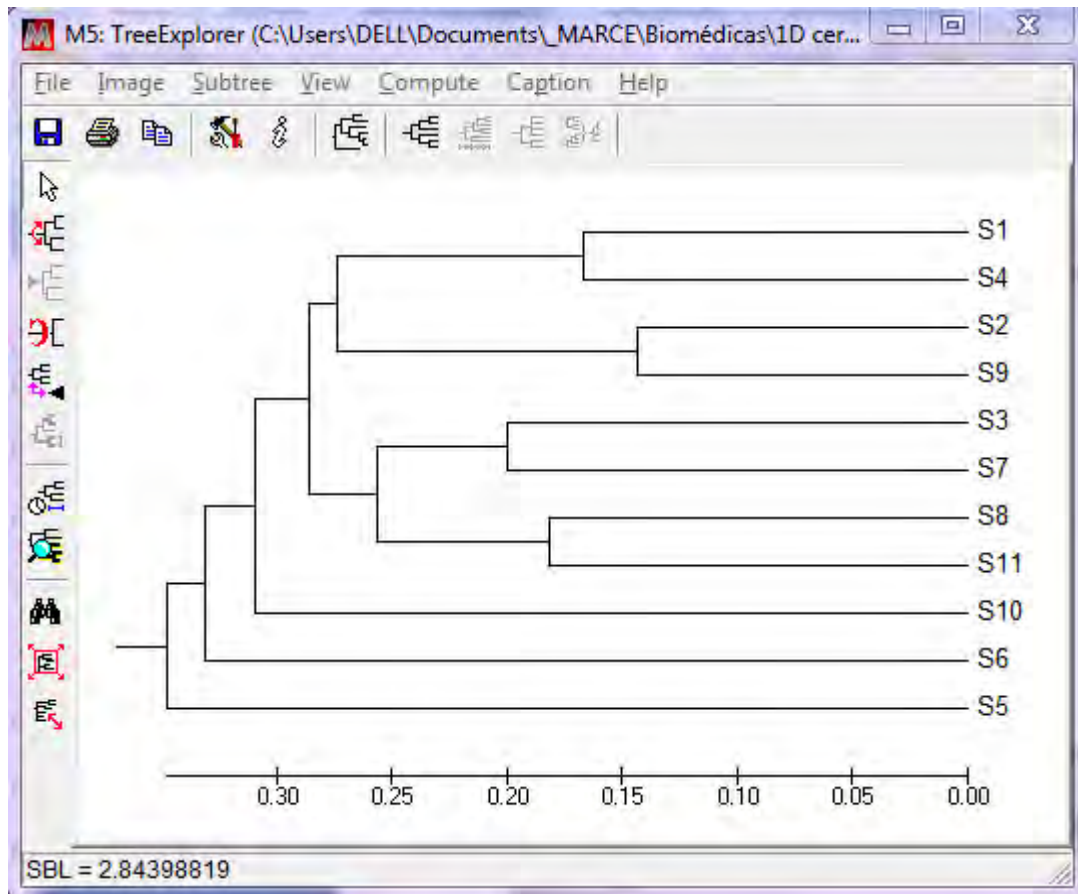
3. Guardar el archivo en una ubicación conocida. Se guardará por default como archivo de texto, sin embargo para que el programa pueda utilizar la información debe estar en formato .meg, por lo que, después de guardar el archivo seleccionar del menú "File" "Save as" y colocar al final del nombre del archivo las letras ".meg".
4. Abrir la ventana principal del programa y en el menú "File" seleccionar "Open a recent File/Session". Buscar el archivo recién guardado con la extensión .meg y abrirlo. Aparecerán dentro de la ventana principal dos íconos:



Al dar click sobre el primero aparecerán los datos de la matriz que introdujimos en forma de tabla

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
✓ 1. S1	1.000										
✓ 2. S2	0.667	1.000									
✓ 3. S3	0.400	0.286	1.000								
✓ 4. S4	0.333	0.375	0.750	1.000							
✓ 5. S5	0.364	0.400	0.857	0.889	1.000						
✓ 6. S6	0.364	0.400	0.857	0.889	1.000	1.000					
✓ 7. S7	0.571	0.667	0.400	0.500	0.545	0.545	1.000				
✓ 8. S8	0.714	0.778	0.400	0.500	0.545	0.545	0.714	1.000			
✓ 9. S9	0.400	0.286	1.000	0.750	0.857	0.857	0.400	0.400	1.000		
✓ 10. S10	0.364	0.400	0.857	0.889	1.000	1.000	0.545	0.545	0.857	1.000	
✓ 11. S11	0.545	0.400	0.571	0.667	0.500	0.500	0.364	0.364	0.571	0.500	1.000

5. Para la creación del árbol seleccionar del menú "Analysis" – "Phylogeny" – "Construct/Test UPGMA Tree".
6. Aparecerá una nueva ventana preguntando si queremos utilizar la información abierta. Dar click en "Yes".
7. Aparecerá otra ventana indicando las opciones que hemos seleccionado. Dar click en "compute".
8. Finalmente aparecerá en una ventana el fenograma o árbol filogenético.



Este árbol puede ser guardado (en formato del programa) y también puede ser exportado como imagen, para lo cual hay que seleccionar en el menú "Image" —"save as TIFF file" para poder guardarlo como imagen tif.

## Anexo II- Procedimientos

### Tinción zinc-imidazol

#### Soluciones:

- imidazol 0.2 M en agua destilada
- sulfato de zinc 0.2 M en agua destilada
- glicina 0.1 M en agua destilada
- Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 en agua MilliQ

#### Procedimiento:

1. Incubar el gel de acrilamida durante 10 min en agitación con imidazol 0.2M.
2. Tirar el imidazol e incubar el gel con sulfato de zinc 0.2 M, agitar

manualmente hasta que se revele (menos de 1 minuto).

3. Deshechar el sulfato de zinc y lavar con agua de la llave 1 vez.
4. Escanear el gel contra un fondo oscuro.
5. Desteñir el gel incubando con glicina 0.1 M durante 5 min, desechar la solución y colocar nueva. Dejar en agitación hasta que el gel se haya hecho nuevamente transparente.
6. Si se desea transferir el gel es necesario incubarlo 10-15 min en agitación con Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8.

### Tinción con CPTS

#### Soluciones

- HCl 12 mM (Sensitizer, Destain)
- 50 mL de KCl 0.2M + 40.8 mL de NaOH 0.2 M, el pH queda de 12.5 (Eraser o solución desteñidora)
- CPTS (*Copper(II) phthalocyanine-3,4',4'',4'''-tetrasulfonic acid, tetrasodium salt. ALDRICH, Cat. 02928KE*) en HCl 12 mM (50 mg en 100 mL)

#### Procedimiento:

1. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, incubarla con Sensitizer durante 2-3 min en agitación.
2. Retirar la solución y colocar la solución Stain. Incubar en agitación ≈5 min.
3. Retirar la solución Stain (se puede reusar varias veces guardándola a 4°C).

4. Lavar la membrana una vez con agua de la llave para retirar el exceso de colorante.
5. Realizar 3 lavados de 2-3 min con la solución Destain para aclarar el fondo.
6. Para desteñir la membrana colocar la solución desteñidora e incubar hasta que desaparezca el color azul de la membrana.

## Anexo III- Manual para el análisis de imágenes en 2-Dimensiones **Manual para analizar imágenes en 2-Dimensiones (geles e inmunoblots).**

Elaborado por: Marcela Esquivel Velázquez

En este manual se explican los procedimientos para analizar estadísticamente imágenes (geles e inmunoblots) en 2-Dimensiones paso a paso desde la digitalización de la imagen hasta las pruebas estadísticas que se pueden realizar, incluyendo los programas utilizados para cada paso.

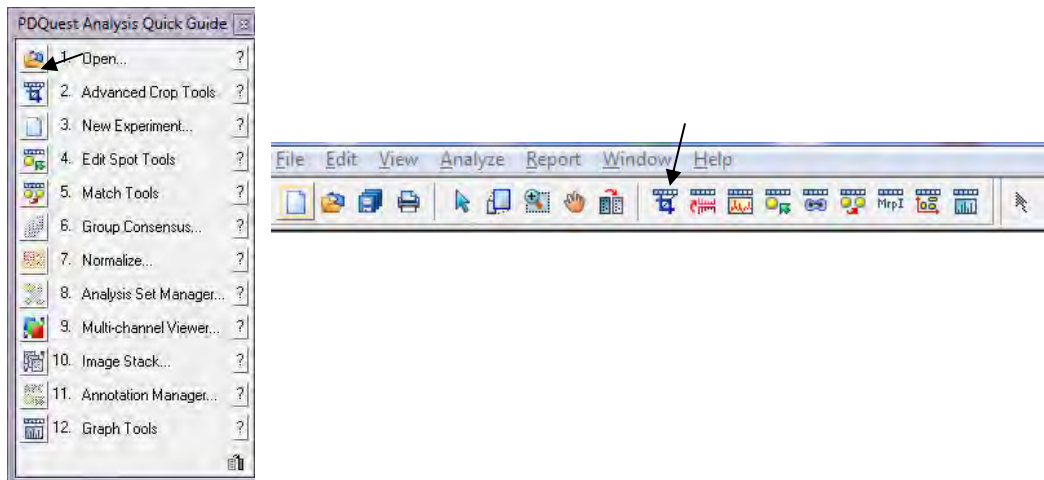
1. El primer paso para poder analizar imágenes en 2-Dimensiones es la digitalización de las mismas. Esto se puede realizar con un escáner convencional o con equipos especializados para ello.
  - a. Escáner convencional. Al escanear las imágenes es muuuuy importante que todas tengan la misma resolución (300 dpi) y que sean escaneadas con los mismos parámetros. Los escáneres digitalizan de 2 maneras: una automática y otra manual. En la primera los parámetros de luz, fondo, contraste, brillo, gamma, etc., se establecen automáticamente. En la segunda se determinan de manera manual. Normalmente los escáneres utilizan la automática primero, pero permiten que el usuario modifique esos parámetros antes de digitalizar la imagen final. Hay que asegurarse que todos los parámetros sean iguales en todas las imágenes. Los parámetros a modificar son aquellos que el modelo del escáner y el software lo permitan.  
  
El otro punto importante es digitalizar las imágenes en formato .TIFF (ojo, no es TIFF comprimido). Esto es para que las imágenes conserven calidad y puedan ser leídas por el software de análisis (PdQuest). El digitalizar en otro formato (como jpg o gif) puede llevar a la pérdida de información y a un análisis no óptimo.
  - b. Equipos especializados. Algunas compañías venden equipos de adquisición de imágenes. Estos equipos se utilizan para captar imágenes fluorescentes o teñidas con colorantes especiales. Dependiendo de las características de estos equipos, si se cuenta con alguno, es preferible usarlo que el escáner convencional. Algunos de estos equipos pueden brindar información adicional como la densidad de los spots o manchas en las imágenes y ahí radica su ventaja sobre el escáner convencional. Si el equipo a usar es de BioRad asegurarse que la extensión del archivo sea .1sc o .gsc. El PdQuest acepta además otros tipos de archivos como .gim, .gsp y .tif. Si el equipo en el cual se escanea no es de BioRad, guardar la imagen en alguna de las extensiones mencionadas para que pueda ser leído por el PdQuest.
2. Una vez que las imágenes se tienen digitalizadas se procede a su análisis con el PdQuest siguiendo los siguientes pasos.



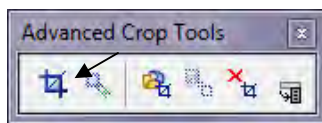
- a. Cortar las imágenes a un mismo tamaño.
  - i. Abrir el programa PdQuest y cerrar la ventana de experimento que se muestra al iniciar.
  - ii. En la barra de menús, seleccionar el menú "File". Al desplegarse las opciones seleccionar la opción "Open". Se debe abrir una ventana. Si no se abre hacer click en cualquier parte de la ventana del PdQuest.
  - iii. Seleccionar la ubicación del archivo y seleccionar el archivo. Dar click en abrir. Se pueden abrir varias imágenes a la vez. Para organizarlas en la barra de menús seleccionar "window" y seleccionar "Tile", "Tile horizontal" o "Tile vertical", dependiendo de cual organización nos convenga más. Si se dejaran de ver las imágenes en este punto o en cualquier otro punto del análisis o las ventanas no se mostraran y sólo se viera el fondo gris, reducir el tamaño de la ventana haciendo click en el ícono del extremo superior derecho. Eso debe arreglar el problema.



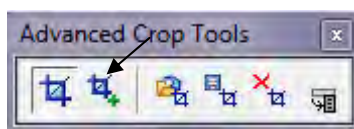
- iv. **Para recortar las imágenes** se usará la herramienta "Crop", la cual se puede encontrar ya sea en el menú de opciones que se abre al inicio con el programa, en la barra de herramientas o seleccionando el menú "Edit"- "image"- "advanced crop"- "define crop area".



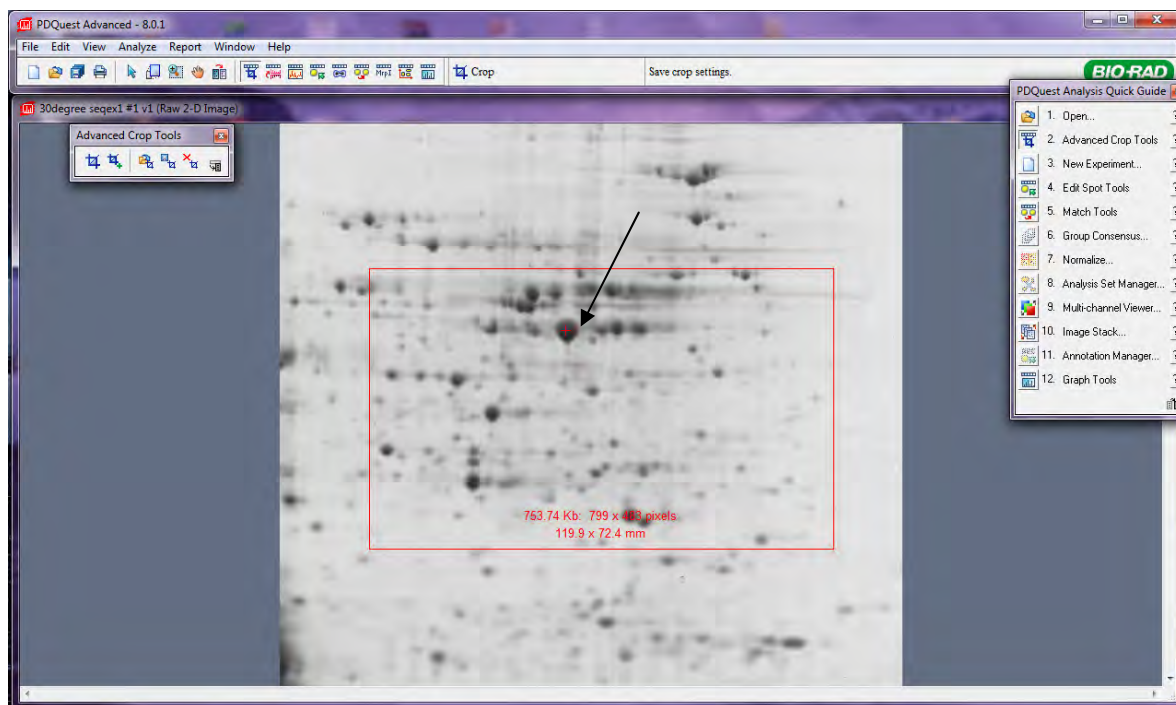
Al seleccionar alguna de las dos primeras opciones (ver imágenes), se abrirá la siguiente ventana:



Seleccionar la primera opción (marcada con una flecha). Al poner el cursor sobre la imagen aparecerá una cruz. Haciendo click con el mouse sin soltarlo seleccionar el área a cortar. Una vez hecho el recuadro éste se puede mover poniendo el cursor en el centro del recuadro y arrastrándolo. Si el cursor se pone en otro lugar del recuadro aparecerán unas tijeras y al dar click se cortará la imagen. Si las otras imágenes a cortar son réplicas o similares a la anterior, para que queden bien recortadas es necesario colocar una marca. Para esto, en la ventana de herramientas de recorte seleccionar la opción marcada con la flecha:

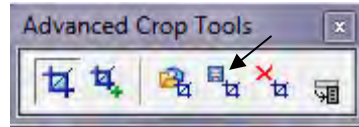


O en la barra de menús seleccionar “Edit” - “Image” – “Advanced Crop” – “Place Crosshair”. Sobre la imagen dar click sobre un spot o marca

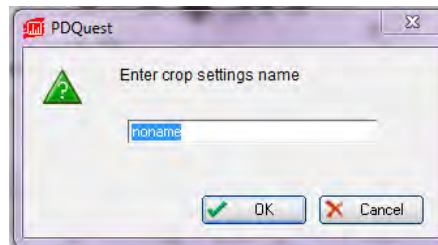


distintiva. Aparecerá una cruz roja sobre el punto seleccionado.

Para guardar los parámetros del tamaño del recorte así como la marca seleccionada en la barra de herramientas de recorte la opción marcada con una flecha, o en la barra de menús “Edit” - “Image” – “Advanced Crop” – “Save Crop Settings”:



Aparecerá una ventana donde deberá definirse el nombre de esos parámetros:

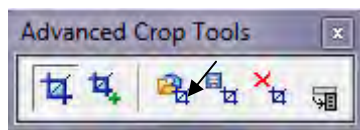


Escribir el nombre deseado y dar click en OK.

Una vez guardados los parámetros de corte se procede a cortar la imagen dando click en las tijeras que aparecen al colocar dentro del recuadro el cursor. Al hacer esto aparecerá una ventana donde se nos pide seleccionar alguna opción. La primera opción “Crop” corta la imagen. Aparecerá el recorte y una ventana donde se pide guardar la imagen (“Save now” or “save later”). La segunda opción “copy and crop” mantiene la imagen original mostrada y además abre una ventana para guardar el recorte y después aparece el recorte de la misma. La primera opción es útil si lo que queremos es solamente el recorte y no deseamos conservar la imagen original, ya que sólo se guardará el recorte. La segunda opción es más conveniente ya que se puede guardar el recorte en un archivo y la imagen original en otro. Esto es útil sobre todo cuando las imágenes no se encuentran en el formato .gsc (que es el del PdQuest) y de esta manera se puede guardar la imagen grande en el formato del PdQuest y el recorte en otro archivo.

NOTA: los marcadores de peso molecular no deben quedar dentro de la imagen cortada, sólo la distancia de la tira, por lo que es útil marcar en la membrana de dónde a dónde va la tira antes de transferir (para el caso de Western Blots).

Después de recortada la imagen original es conveniente guardarla. El PdQuest por default coloca nombres a los archivos de acuerdo a su nombre original añadiendo al final las letras v1, v2, v3, etc., de acuerdo a la versión de la imagen (cada modificación de la imagen es una versión distinta). Sin embargo los nombres se pueden cambiar a voluntad del usuario. Para guardar seleccionar en la barra de Menús “Archivo” – “Guardar como” y seleccionar el nombre del archivo y la ubicación a ser guardado. PdQuest guardará sólo la imagen presente en la ventana activa y no las demás por lo que hay que guardar las imágenes individualmente si se tienen varias abiertas. La otra opción para guardar es cerrar la imagen haciendo click en la cruz de lado superior derecho de la ventana de la imagen (no en la ventana del PdQuest). Si la imagen fue modificada pero no se guardaron los cambios el programa mostrará una ventana preguntando si desea guardarlos.

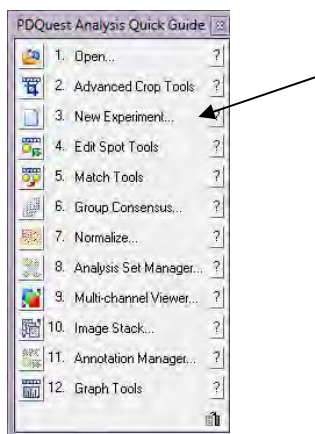


Para recortar otras imágenes con los mismos parámetros de la primera es necesario abrir la imagen nueva a recortar (o si ya se encuentra abierta seleccionar la ventana donde está), y en la barra de herramientas de recorte seleccionar la siguiente opción marcada con una flecha, o en la barra de menús seleccionar “Edit”- “Image” – “Advanced Crop” – “Load Crop Settings”

Aparecerá una ventana con los nombres de los parámetros que han sido guardados. Seleccionar la opción deseada. Automáticamente se cargará el recuadro de corte y la marca. Guiándose con la marca mover el recuadro para que quede en posición correcta en la nueva imagen, de ser necesario. Proceder a cortar (dando click en las tijeras) y a guardar como ya se ha explicado.

Repetir estos mismos pasos para todas las imágenes a ser analizadas.

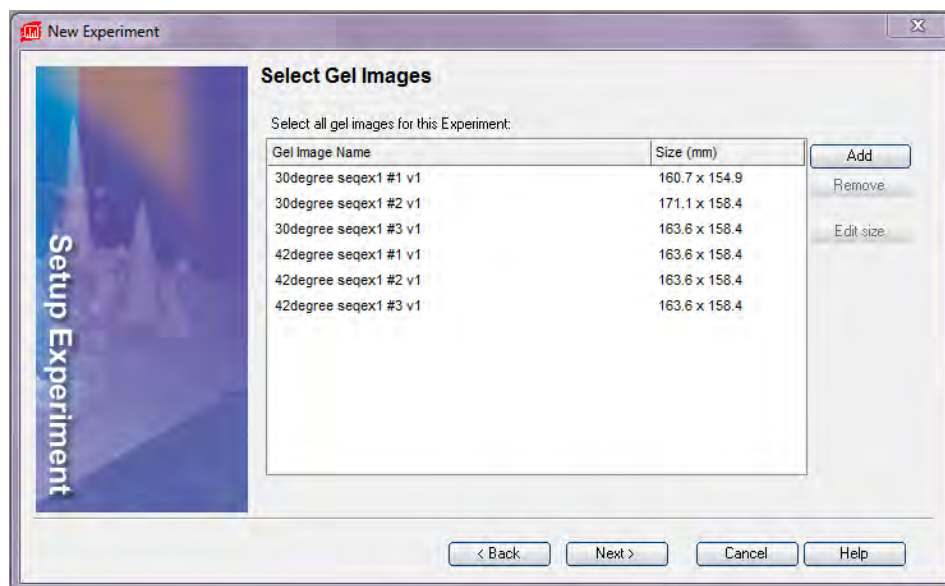
- v. Para analizar las imágenes y compararlas entre sí es necesario iniciar un nuevo experimento en PdQuest. Primero cerramos todas las ventanas de imágenes (opcionalmente se pueden dejar abiertos únicamente los recortes de las imágenes a ser analizadas), seleccionar el menú “File”- “New experiment” o en el menú desplegado de la derecha la misma opción (imagen a la izquierda).



Se abrirá una nueva ventana:

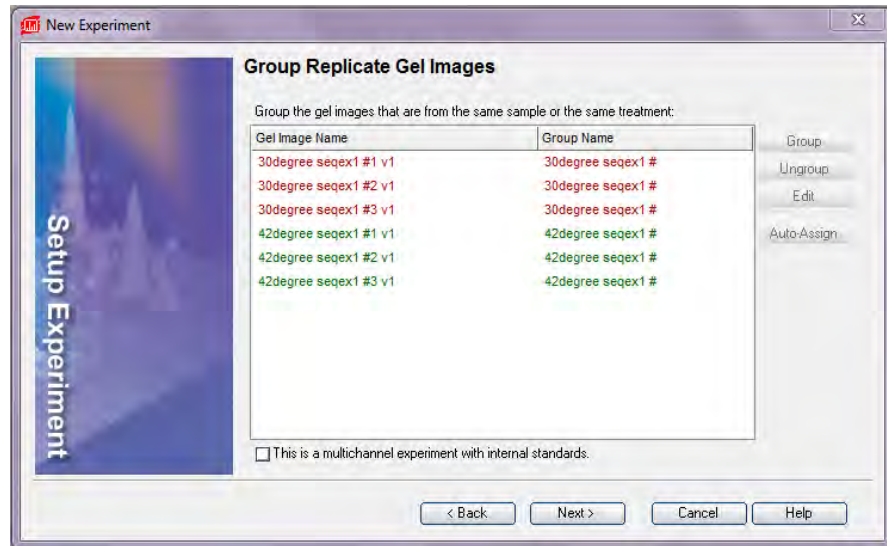


Introducir un nombre para el experimento y una descripción (opcional) y seleccionar el lugar dónde se va a guardar el experimento. Dar click en "Next". La siguiente pantalla que aparece es esta:



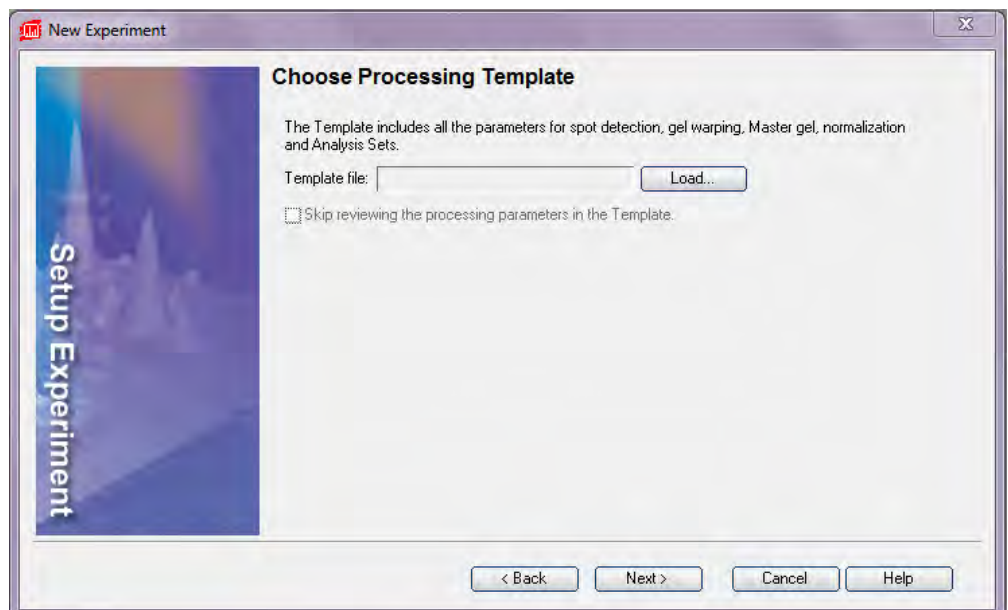
Dar click en "Add" se abrirá una ventana donde se podrán seleccionar las imágenes del experimento. Seleccionar los recortes anteriormente hechos de las mismas. Si las ventanas de los recortes se dejaron abiertas automáticamente aparecerán en la lista. Si hiciera falta alguna imagen agregarla con "Add". En este ejemplo se cargaron las imágenes de geles en 2D de Escherichia coli cultivada a 30 °C (3 réplicas) o a 42 °C (3 réplicas). Las imágenes no son todas del mismo tamaño, aún así se pueden

analizar, pero es conveniente que sean del mismo tamaño, para lo cual ya fue explicado el procedimiento de recorte. Una vez cargadas todas las imágenes dar click en “Next”. La siguiente pantalla es esta:

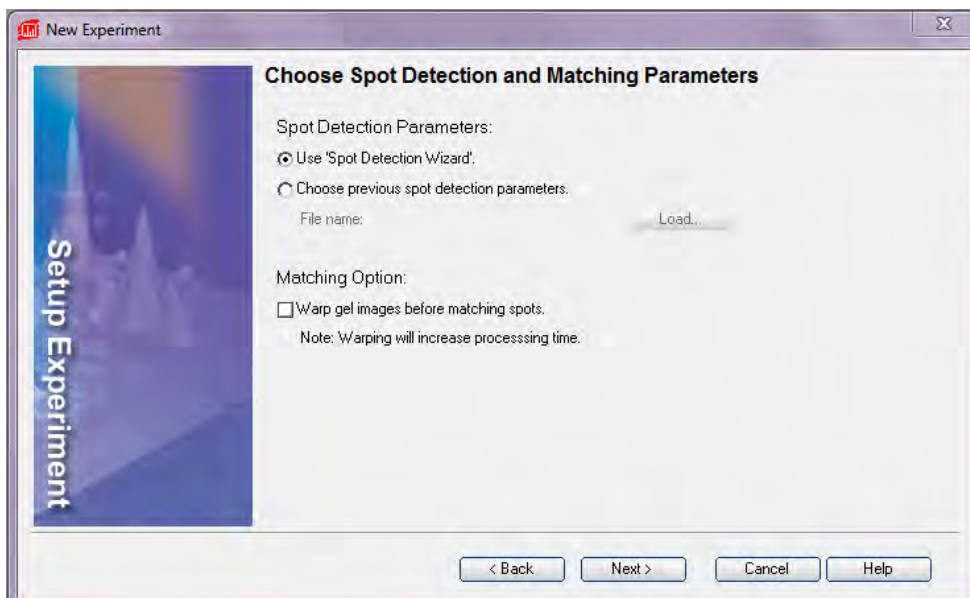


Si el experimento tiene réplicas éstas se pueden agrupar. La agrupación puede ser automática (dando click en Auto-Assign) o manual seleccionando las imágenes a ser agrupadas y dando click en “Group”. Si no se tienen réplicas pasar a la siguiente ventana. Una vez terminada la agrupación dar click en “Next”:

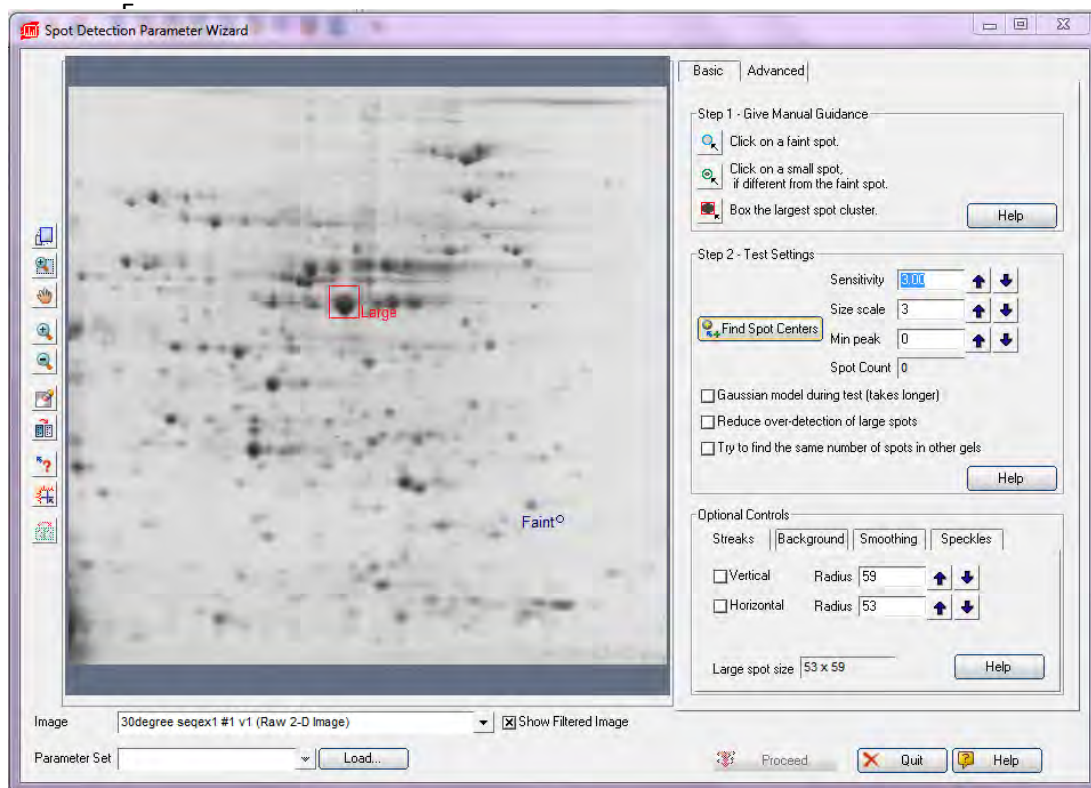
Si ya se hubiera hecho un experimento previamente y se desea analizar este nuevo experimento con los mismos parámetros de análisis que el anterior, en esta ventana deberán cargarse esos parámetros, para lo cual se selecciona “Load” y después se seleccionan los parámetros. En este caso no se cargarán esos parámetros y sólo se dará click en “Next”:






Esta es la siguiente pantalla:



Aquí se pueden cargar los parámetros de detección de spots de otro experimento si así se desea, así como seleccionar la opción de Warping. Esta opción hace que el análisis tarde más pero hace que el Matching entre los spots de diferentes imágenes sea mejor. La siguiente ventana es esta:

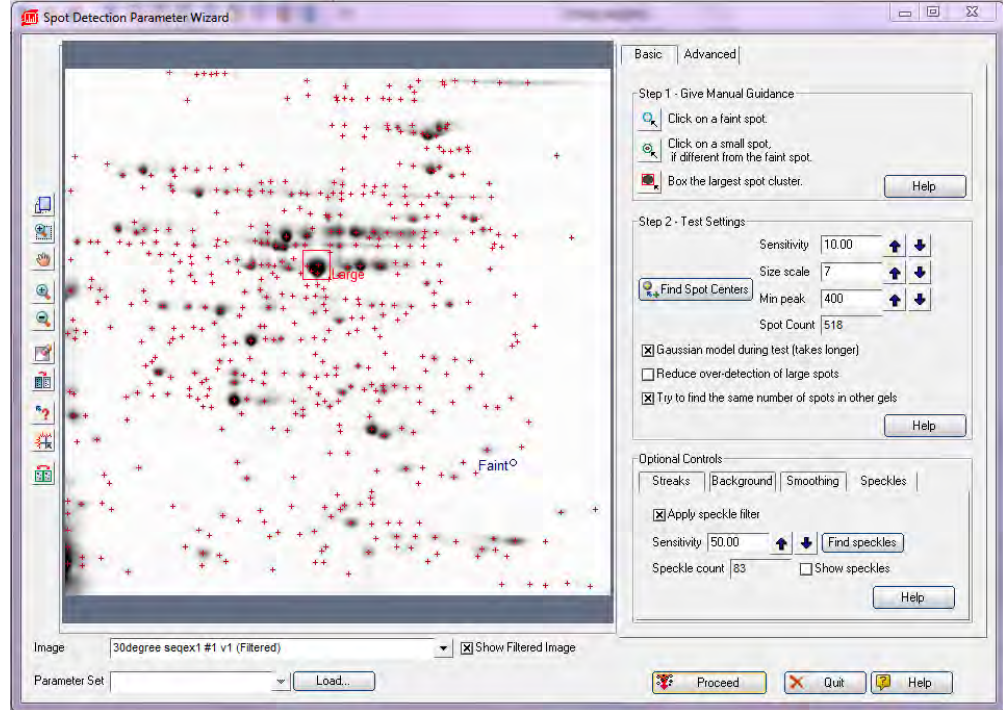


donde se seleccionarán los parámetros de detección de spots. En la parte superior derecha hacer click en la pestaña “Advanced” para que se muestren todas las opciones. El paso 1 (Step 1) como está indicado es la selección primero del “Faint spot” que es el spot más claro que se quiera detectar. Hacer click primero en  y luego hacer click sobre el spot en la imagen. Después seleccionar el spot más pequeño que se quiera detectar (sólo si es diferente al spot más claro o faint) haciendo click en  y después sobre el spot en la imagen. Finalmente hay que seleccionar el spot más grande que se quiera detectar o, si hay muchos juntos, el conjunto de ellos haciendo click en  y después haciendo un recuadro para enmarcar el (o los) spots en la imagen. El paso 2 (Step 2) es encontrar los centros de los spots haciendo click en “Find spot centers”. Para esto hay varias opciones que podemos utilizar para hacer esta detección mejor. El modelo Gaussiano es conveniente utilizarlo ya que reduce la detección de manchas o contaminantes que en realidad no son spots. La desventaja de esta herramienta es que el procedimiento de detección tarda considerablemente más. La herramienta “reduce over-detection of large spots” es conveniente usarla cuando hay spots muy grandes o muy saturados ya que el software suele reconocerlos como varios spots juntos. La última opción es la de “Try to find the same number of spots” la cual es muy útil cuando los experimentos tienen réplicas, como en este caso. La detección de spots puede ser más o menos exacta dependiendo del tipo de imagen con la que se cuente. Si la imagen viene de un equipo especializado que detecte parámetros como la densidad y profundidad de cada spot, la detección es mucho mejor.

La última parte del panel de opciones de la derecha es la de “Opcional Controls” y ofrece opciones útiles para cuando las imágenes vienen de un equipo especializado y/o están teñidas con colorantes fluorescentes. En la parte inferior, donde dice “Parameter set” ahí se puede cargar los parámetros de detección de spots de algún otro experimento si así se desea. Los botones de la parte derecha de la ventana son para modificar la vista de la imagen y así poder ver y seleccionar mejor los spots.

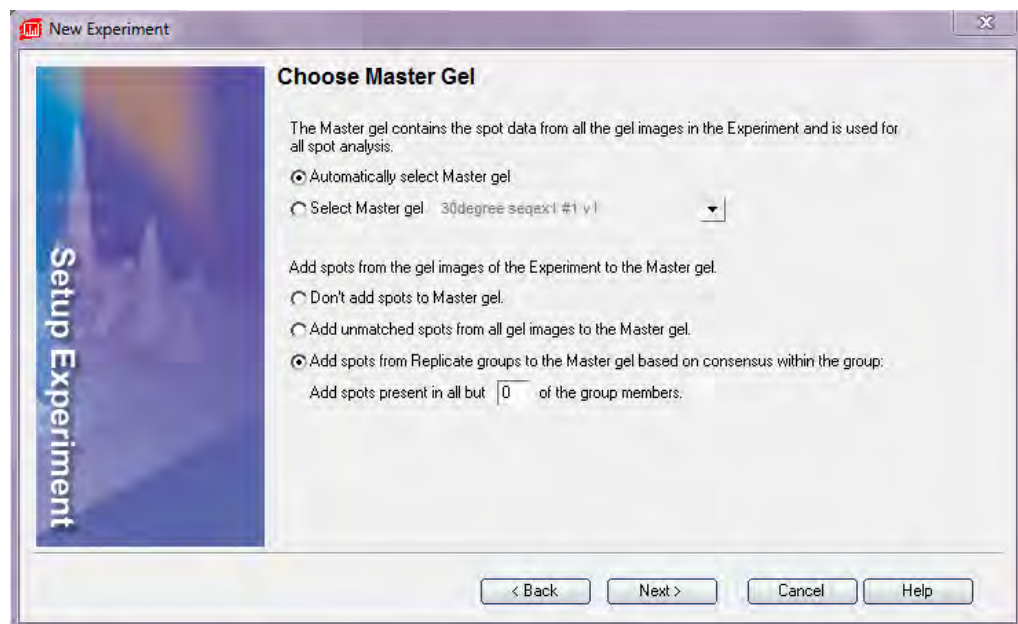
Una vez ajustados todos los parámetros, al dar click sobre “Find Spot centers”, el software comenzará a trabajar y finalmente aparecerán sobre la imagen los spots detectados.





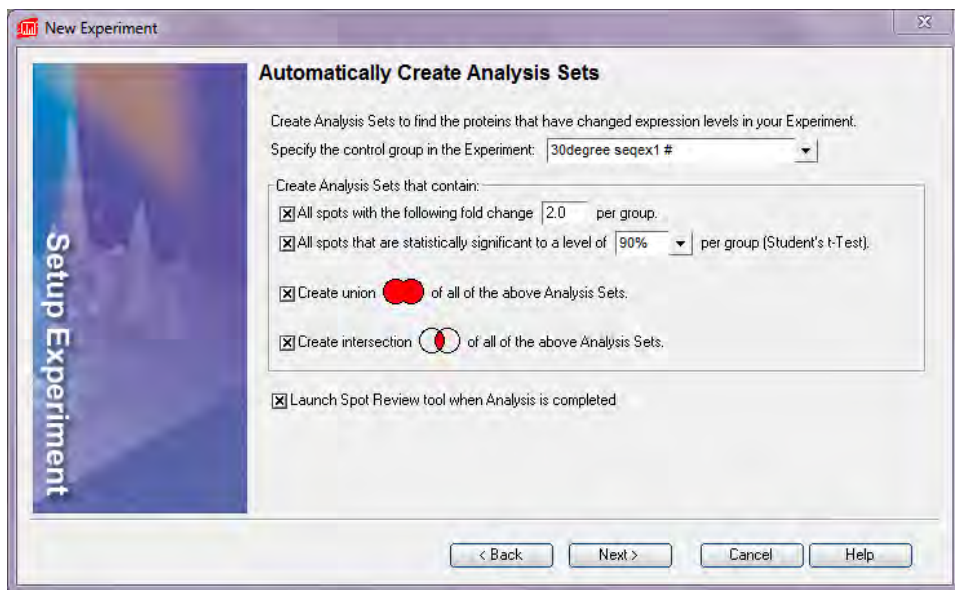
Si la detección no nos parece adecuada se pueden modificar los parámetros de “sensitivity” (a mayor sensibilidad mayor número de spots detectados), “size scale” (es el tamaño del spots más chico que se quiere detectar) y “Min Peak” (punto de corte sobre el cuál son detectados los spots, mientras mayor el valor, menor número de spots son detectados). También se pueden cambiar los spots seleccionados de la misma manera (faint, small, large).

Una vez que la detección nos parece adecuada hacemos click sobre el botón “Proceed”. El programa nos va a pedir que guardemos los parámetros de detección de spots (si no se utilizaron los de otro



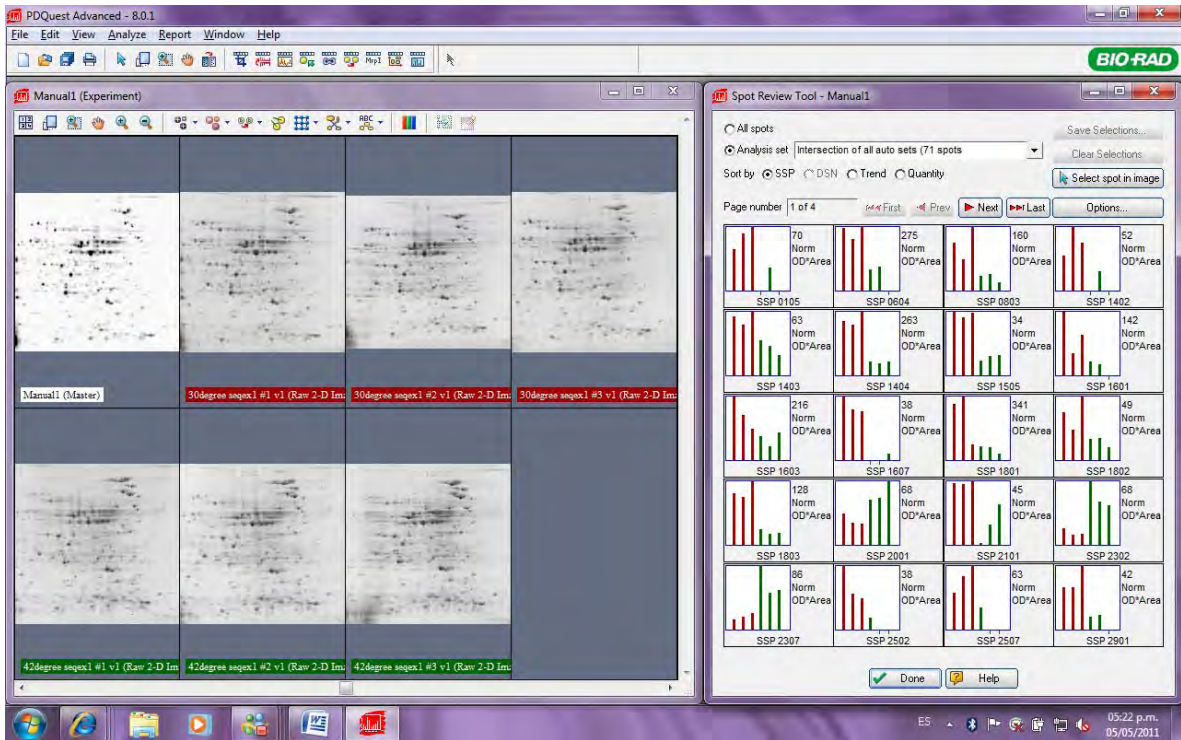
experimento), y nos mostrará después la siguiente pantalla:

En esta pantalla se puede seleccionar automáticamente el gel maestro o seleccionarlo manualmente, así como seleccionar cuáles spots nos interesan que estén en el gel maestro (los que no tienen correspondencia en otras imágenes, los "unmatched" o los presentes en las réplicas). Después de seleccionados los parámetros deseados dar click en "Next". Nos aparecerá una nueva ventana donde seleccionaremos el método de normalización de las imágenes (Regresión local está por default) y al dar "Next" aparecerá la siguiente ventana:



En esta ventana seleccionaremos los parámetros que nos interesa que se comparen entre los grupos, así como el nivel estadístico de cambio que nos interesa. Al terminar dar click en "Next" y en la siguiente ventana (que es el resumen del experimento) dar click en "Finish". El análisis del conjunto de imágenes cargado comenzará y al terminar se presentará el resumen de ese análisis en otra ventana, dar "Ok".



















Después de este procedimiento se despliegan las imágenes, y si seleccionamos como en este caso que queríamos medir las diferencias, también aparecera el spot review tool.















En la parte superior de la ventana se encuentran las herramientas de edición y de vista de las imágenes. Con ellas se pueden agregar o quitar spots, ver los spots matched o hacer que dos spots en diferentes imágenes hagan match.



A continuación se enlistan cada uno de los menús y su función (los menús están girados):

	Nuevo
	Abrir
	Guardar
	Imprimir
	Cursor
	Muestra la imagen seleccionada en pantalla completa
	Lupa. Aumenta el área seleccionada.
	Mueve la imagen con el cursor
	Herramienta transformar, abre una gráfica de saturación, cambia el contraste de las imágenes.
	Herramienta de cortar
	Herramienta de edición de imagen (para antes del análisis)
	Herramienta de los valores de los pixeles.
	Herramienta de edición de spots.
	Herramienta de edición de bordes de spots
	Herramienta de matching.
	Herramienta para agregar marcadores de punto isoeléctrico.
	Herramienta de análisis y anotación. Se les puede agregar notas a spots seleccionados.
	Herramienta para graficar spots. Útil para ver los cambios en spots entre diferentes grupos de imágenes.

	Herramienta para mostrar todas o sólo algunas imágenes del conjunto.
	Muestra la imagen seleccionada en pantalla completa
	
	
	Herramienta lupa aumento
	Herramienta lupa reducción.
	Muestra los centros de los spots con una cruz.
	Muestra el controno de los spots de acuerdo al modelo Gaussiano.
	Muestra los matches.
	Muestra la desviación de los spots con respecto al master para hacer match.
	Muestra el modelo del distorción de las imágenes utilizado para hacer match entre los spots.
	Muestra el set de análisis. Se pueden crear nuevos sets de análisis dependiendo de lo que se quiera comparar de los grupos.



Despliega las características o atributos seleccionados de los spots.

Cambia la coloración de las imágenes a la tinción deseada.

Algunas herramientas, al hacer click en ellas, abren en una ventana pequeña más herramientas. Al pasar el cursor sobre las herramientas en la parte superior de la ventana principal aparece lo que esa herramienta es.

El uso de las herramientas dependerá de las necesidades específicas de las imágenes y de lo que se quiera analizar. Sin embargo hay que tener en cuenta que el análisis con este software sólo da información de cuales spots están en los diferentes grupos y cuáles no, así como sobre las diferencias en cantidad de los spots y la estadística derivada de estos datos.

### Herramientas principales:



Herramienta de edición de spots.

Esta herramienta abre la

siguiente ventana:



Agregar spots. Seleccionar y dar click sobre el spot a agregar.


Eliminación de spots. Seleccionar y dar click sobre el spot a eliminar.

Combinar spots. Seleccionar la herramienta y después los spots a combinar.



Herramienta de matching. Esta herramienta es necesaria cuando el programa no logra detectar correctamente los spots que son los mismos en distintas imágenes. Al dar click en este ícono se abrirá la siguiente ventana:



- Remove spot añadido al gel maestro.
- Agregar spot al gel maestro. Útil cuando queremos matchear un spot que no se encuentra en el master gel.
- Muestra los spots que emparejan con el spot bajo el cursor
- Muestra los landmarks
- Muestra el movimiento de los spots para emparejarlos.
- Muestra los spots que emparejan entre las imágenes con una letra distinta para cada uno.
- Eliminar un match manual
- Hacer un match manual. Esta herramienta permite matchear spots de manera manual sin modificar el modelo de distorsión
- Eliminar un landmark
- Crear un landmark. Selector  selector click primero en el spot en el gel maestro y después en el mismo spot en los otros gels para crear un punto o guía para que el programa empareje los demás spots.



Herramienta para agregar pesos moleculares y puntos isoeléctricos a spots de referencia.

Esta herramienta permite seleccionar spots de los cuales se conozca el peso molecular y el punto isoeléctrico para que el programa los tome como referencia y calcule estos valores para el resto de los spots. Cabe señalar que no se pueden introducir 2 spots con el mismo peso molecular o con el mismo punto isoeléctrico.

El menú que despliega es el siguiente:



Despliega una cuadrícula de PM y pI sobre la imagen

Eliminar datos de PM y pI de un spot.

Mostrar datos de PM y pI del spot bajo el cursor

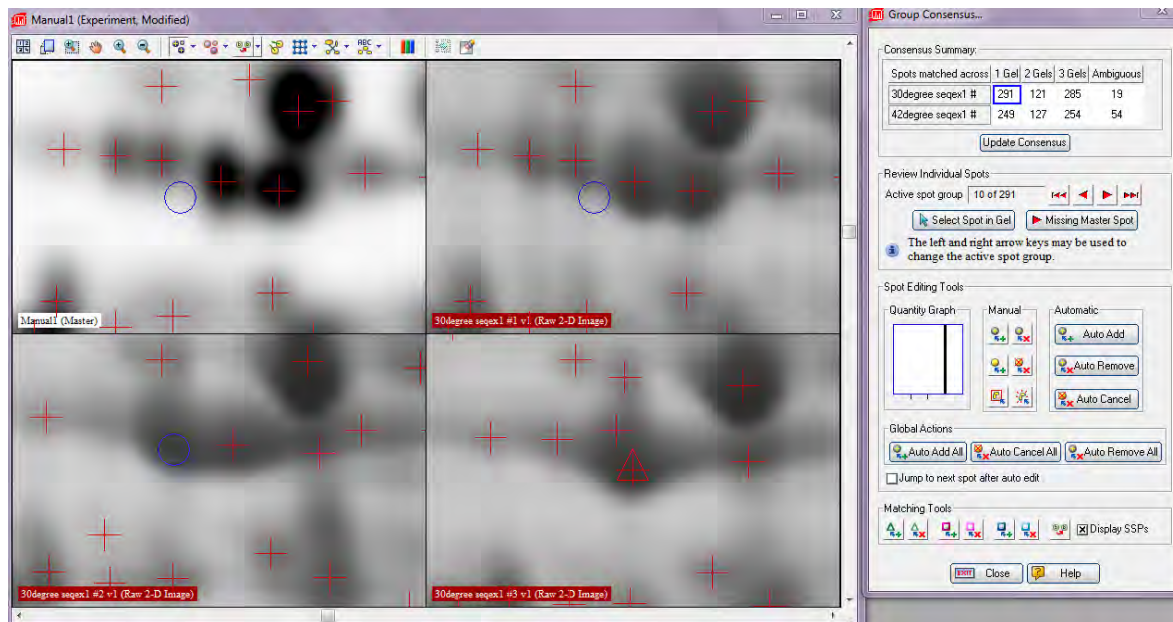
Agregar información de PM y pI a un spot

Otras herramientas importantes se encuentran en el menú “Edit”-“Match”, por ejemplo la de auto-add spots to master gel, agrega los spots de todas las imágenes al gel maestro, o la de “remove unmatched spots”, que elimina de las imágenes aquellos spots que no correspondieron entre ellas. Estas herramientas son particularmente útiles para eliminar los spots en grupos de réplicas que no concuerden entre las imágenes y eliminar así la variación de la técnica de análisis posteriores.

También existe la opción “Group Consensus” que se ubica en el menú “Analyze”. Esta herramienta permite revisar spot por spot para observar claramente si existe o no el spot en todas las imágenes. Abre una ventana que además permite agregar o quitar spots y agregar o eliminar landmarks.

Al seleccionar “Group Consensus” aparecerá una ventana en la que habrá que seleccionar “replicate groups” en la parte superior y en la parte

inferior hacer click sobre “Select All” para incluir todas las imágenes dentro de un grupo de réplicas:



Se observan el gel maestro, y las imágenes de los 3 geles réplicas. Los símbolos muestran en rojo el spot en cuestión y en azul cuando no se encuentra ese spot en las otras imágenes. En el panel de la derecha se encuentran los botones de navegación para ir cambiando de spot, así como las herramientas de edición de spots (agregar, eliminar, etc) y las herramientas de matching (landmarks, matching manual, etc), así como unos botones que permiten agregar todos los spots en las imágenes donde no se encuentren, o eliminar todos los spots que no estén presentes en las 3 imágenes.

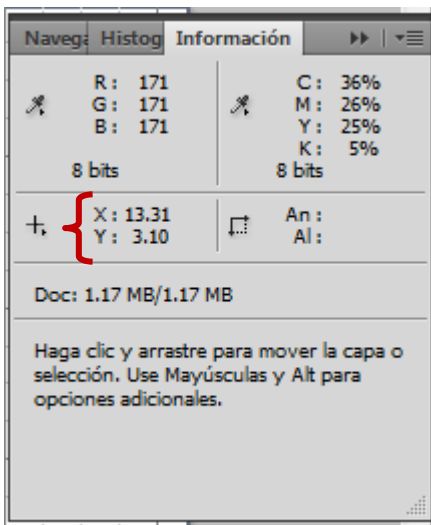
Para hacer el análisis estadístico de las imágenes en 2-D considerando además de estos factores las diferentes regiones de la imagen es necesario hacer otro análisis que ni PdQuest ni algún otro programa de análisis de geles en 2-D es capaz de realizar.

#### vi. Obtención de coordenadas de los spots



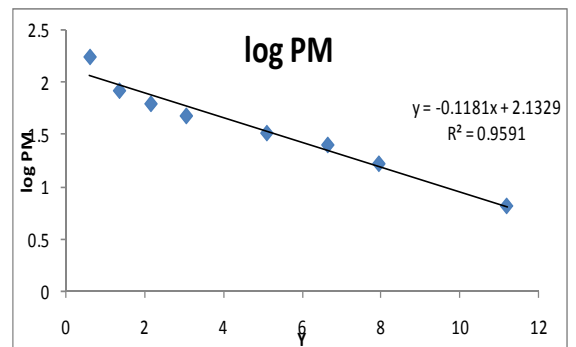
La obtención de las coordenadas (PM, pI) de cada uno de los spots puede realizarse directamente con el PdQuest y con la ayuda de Photoshop:

1. Correr los estándares de pI y de PM en 2-Dimensiones
2. Teñir y escanear el gel.
3. Abrir el gel en PdQuest y recortar al mismo tamaño de las imágenes que se están analizando.
4. Detectar los spots y exportar el gel maestro (como se verá más adelante en la sección **vii**)
5. Abrir la imagen exportada del gel maestro en Photoshop.
6. Presionar F8 o en el Menú “ventana” seleccionar la opción “Información”. Se abrirá una pestaña del lado derecho de la pantalla. Colocarse en el centro de cada spot y anotar sus coordenadas X y Y (horizontal y vertical, corresponden al pI y PM).
7. Dado que son marcadores los que estamos viendo, de cada uno de ellos se sabe su punto isoeléctrico y su peso molecular (viene en el inserto de fábrica). En excel hacer una tabla poniendo en la primera columna los valores de X de los spots; en la segunda los valores de pI correspondientes a los valores de X; en la tercera el log(pI); en la cuarta los valores de Y; en la quinta los valores de PM correspondientes a esos valores de Y y en la sexta el log(PM) como se muestra en la imagen siguiente:

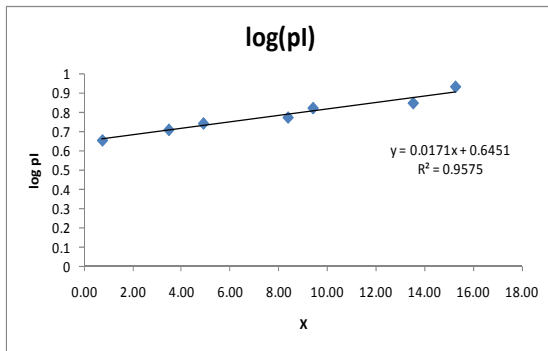


pHi curva			PM curva		
X	pI	log(pI)	y	PM	log PM
0.75	4.5	0.65321251	0.6	175	2.24303805
3.48	5.1	0.70757018	1.35	83	1.91907809
4.90	5.5	0.74036269	2.15	62	1.79239169
8.38	5.9	0.77085201	3.05	47.5	1.67669361
9.41	6.6	0.81954394	5.1	32.5	1.51188336
13.53	7	0.84509804	6.65	25	1.39794001
15.27	8.5	0.92941893	7.95	16.5	1.21748394
			11.2	6.5	0.81291336

8. Graficar para pI y para PM una curva colocando en el eje de las x los valores de X o Y, y en el eje de las abscisas los valores del logaritmo



calculado en cada caso, ajustar a una línea recta:



9. Abrir en Photoshop un gel maestro exportado de las imágenes en análisis (ver sección **vii** para exportar la imagen del gel maestro).

10. Seleccionar 6 o 7 puntos en diferentes regiones del inmunoblot, cada punto o spot seleccionado numerarlo seleccionando en photoshop del menú "análisis" la "Herramienta recuento" y haciendo click sobre cada punto seleccionado (aparecerá un número junto al spot).

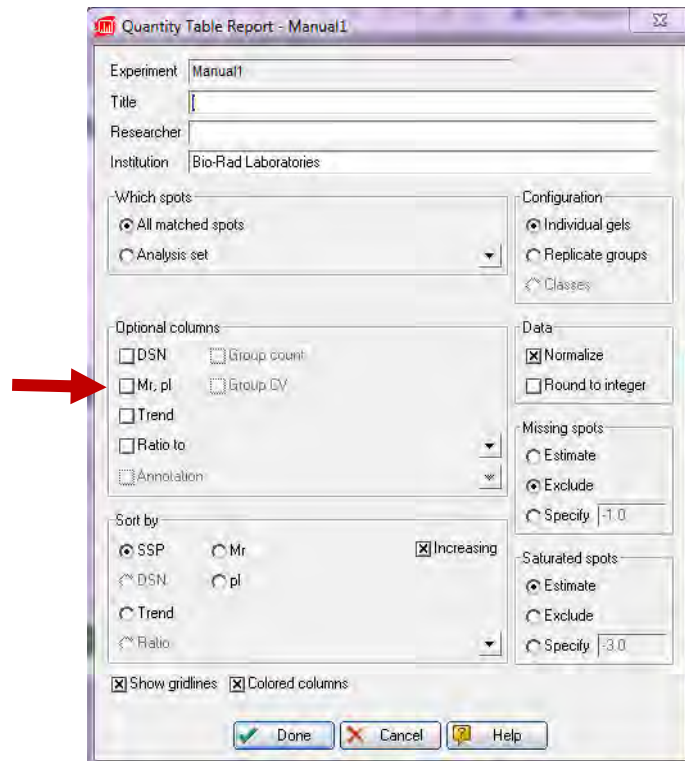
11. Seleccionar nuevamente la herramienta información y colocar el cursor en el centro de cada spot seleccionado y anotar sus coordenadas de X y Y.

12. En excel, introducir una nueva columna con las coordenadas X y Y de los spots seleccionados, despejar de las ecuaciones de pI y PM obtenidas de las gráficas las variables pI y PM ( $y = \log(pI)$ ;  $y = \log(PM)$ ) y calcular las coordenadas de pI y PM para los spots seleccionados.



13. En PdQuest abrir el experimento de donde se seleccionó el gel maestro y, con la herramienta para agregar pesos moleculares y puntos isoeléctricos agregar los valores calculados de pI y PM a los spots seleccionados. PdQuest automáticamente calculará los pI y PM de los demás spots.

14. Para obtener una lista de todos los spots con sus coordenadas, seleccionar en PdQuest del menú "Analyze" la opción "Quantity Table Report". Se abrirá la siguiente ventana:



Activar la casilla "Mr,pl" y dar click en "Done".

15. Aparecerá una nueva ventana con una tabla parecida a esta:

The screenshot shows a window titled "Quantity Table Report - Manual1" containing a table with the following data:

SSP	Mr	pl	30degree seqex1 #1	30degree seqex1 #2	30degree seqex1 #3
0001	40.94	-1.00	262.0		
0002	34.95	-1.00	2931.2	521.8	
0003	38.79	-1.00	883.2		
0004	36.82	-1.00	439.9	27.1	
0005	34.65	-1.00	61.8		
0006	35.67	-1.00	121.3		
0007	35.53	-1.00	49.1	76.7	15.6
0008	34.04	-1.00	49.3		22.0
0101	42.97	-1.00	184.1		
0102	56.04	-1.00	399.1		
0103	51.96	-1.00	23.8		
0104	42.21	-1.00	198.9	56.5	
0105	55.96	-1.00	45.8	63.2	70.1
0106	51.98	-1.00	120.0	108.7	174.6
0107	42.39	-1.00	17.5		
0108	46.39	-1.00	15.5		18.5
0109	45.13	-1.00	11.4		18.0
0110	41.59	-1.00	25.5		32.3
0111	55.31	-1.00	24.2	169.0	41.6
0112	47.57	-1.00			
0201	60.59	-1.00	273.9		

To the right, an "Export Options" dialog box is shown with the following settings:

- Field Separators:  Tab Delimited,  Comma Delimited
- Export Destination:  File,  Clipboard
- Export Selection Only

A red arrow in the main window points to the export icon in the bottom right corner.

Seleccionar la opción señalada con la flecha, aparecerá una ventana como la de arriba a la derecha, seleccionar "Clipboard" y dar click en "Done".

16. Abrir otro archivo de excel y presionar las teclas "Ctrl"+"V" (o pegar). Se pegará en el documento de excel la información. Guardar el archivo.

### vii. Exportación de los gels maestros.

The screenshot shows the "Configure Sub-Windows for Manual1 (Experiment)" dialog box. It has the following sections:

- Select group type:**  Gels,  Replicate Group,  Classes
- Selection table:**


Gels	Members
30degree seqex1 #1 v1	1
30degree seqex1 #2 v1	1
30degree seqex1 #3 v1	1
42degree seqex1 #1 v1	1
42degree seqex1 #2 v1	1
42degree seqex1 #3 v1	1
- Quick Config:** A grid of buttons for selecting members (1, 1 2, 1 2 3, 1 2 3 4, 1 2 3 4 5 6).
- Window Configuration:** Windows: 1, Rows: 1, Cols: 1
- Selected members:** 3
- Show Master
- Preserve View

Buttons at the bottom: Apply, Cancel, Help (indicated by a red arrow).

(Para este análisis son necesarios los programas SPSS y Photoshop)

El primer paso es exportar los masters del PdQuest. El PdQuest cuenta con una herramienta de exportación de imágenes, que hay que usar de acuerdo a las siguientes instrucciones para poder exportar las imágenes de los masters con calidad.

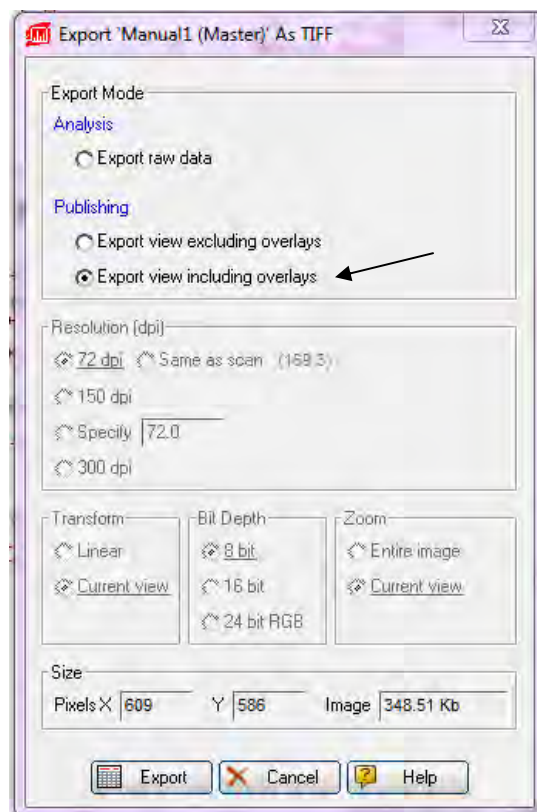
El primer paso es abrir el experimento del cual se quiere

exportar la imagen del master gel. Una vez abierto hacer click en la herramienta . Se abrirá una ventana nueva. Seleccionar sólo un grupo de imágenes y el recuadro con el número 1.

Verificar que esté marcada la casilla “Show Master”. Una vez realizado esto dar click en “Apply”. Se mostrará solamente el master gel del conjunto de imágenes seleccionado. Después hay que cerrar todas las ventanas de herramientas y quedarse exclusivamente con la ventana que contiene la imagen. Maximizar esa ventana y dar click en la herramienta



para que la imagen del master se ajuste al tamaño de la ventana. Seleccionar la forma en que se desea que los spots se muestren, ya sea con cruces, con círculos o ambos. Hecho esto dar click en el menú “File”- “Export” – “Export to Tiff Image”. Se abrirá la siguiente ventana:

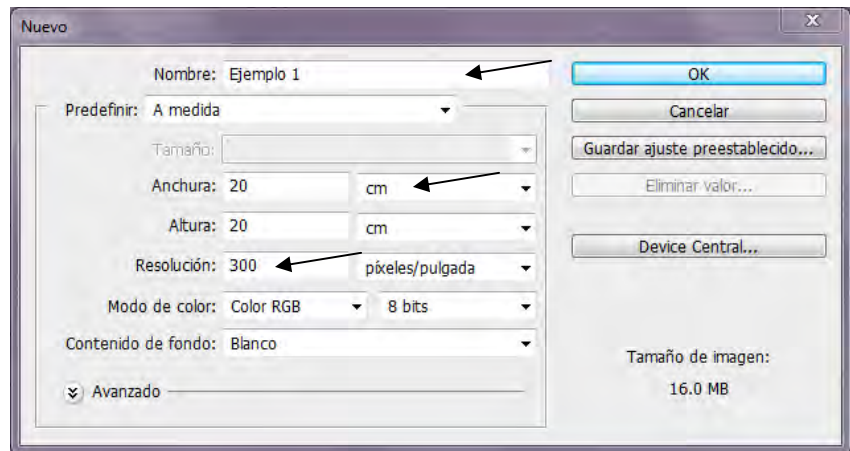


Seleccionar la opción “Export view including overlays” y dar click en “Export”. Seleccionar la ubicación donde se va a guardar la imagen y guardar. Hacer esto para cada una de los conjuntos de imágenes analizados. Es importante que se sigan todos los pasos de la misma manera para asegurar que las imágenes exportadas sean todas del mismo

tamaño. Si en el momento de exportar la imagen ésta es pequeña y no se ha ajustado al tamaño de la ventana maximizada, la imagen exportada será de ese mismo tamaño con la consecuente pérdida de calidad.

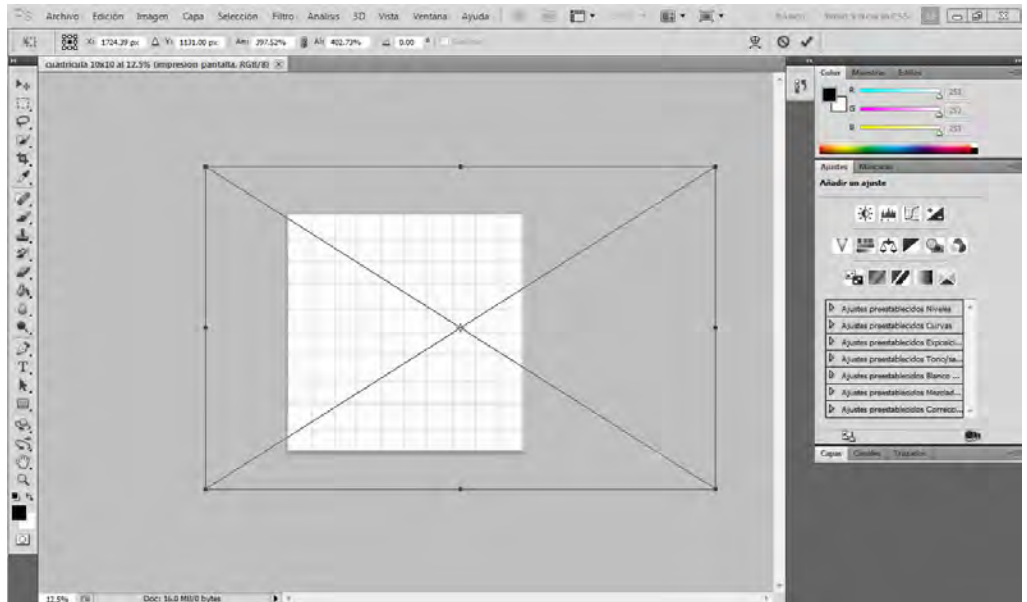
**viii. Creación de las casillas.** Para analizar la posición de los spots en las imágenes, éstas deben ser divididas por una cuadrícula de 10x10, de manera que se creen 100 casillas. En esta parte del análisis se utiliza el programa Photoshop. Lo primero es crear la cuadrícula 10x10.

1. Crear un nuevo documento en Photoshop. Abrir el programa, y en el menú “Archivo” seleccionar “Nuevo”. Se abrirá una nueva ventana. Escribir un nombre para el nuevo documento, seleccionar el tamaño de la hoja (en cm) y seleccionar una resolución de 300 pxeles/pulgada. Dar click en “OK”.



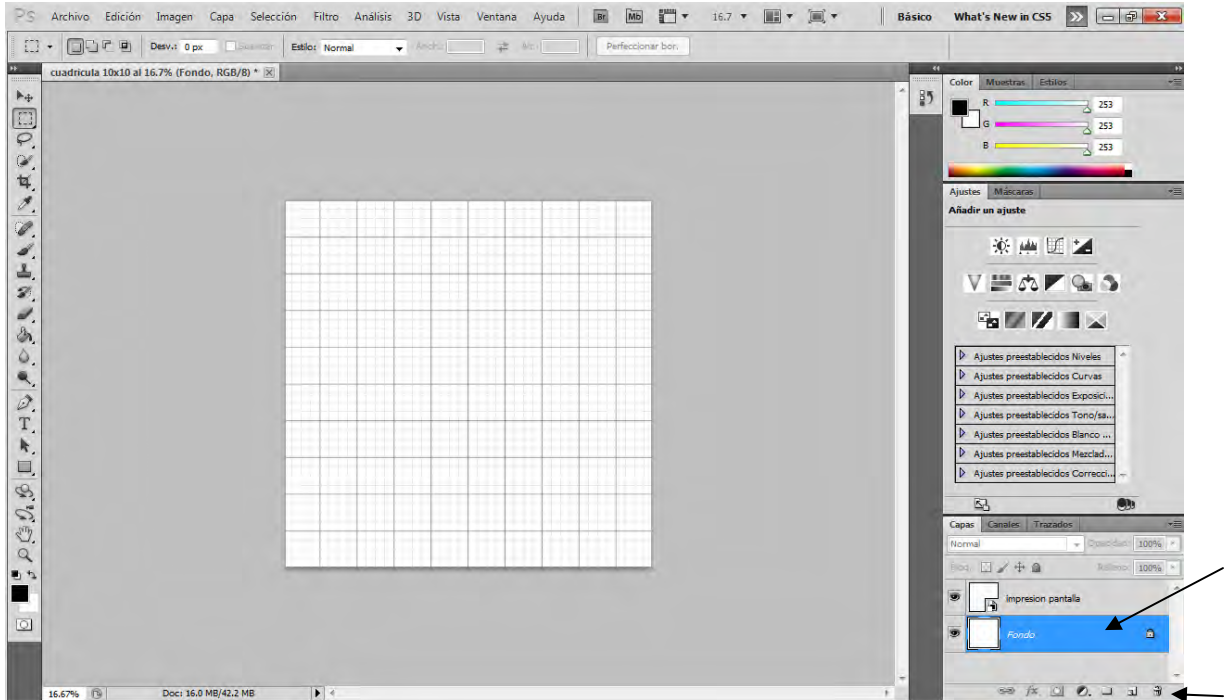
Se abrirá una imagen con las características antes indicadas. En el menú “Vista” seleccionar “Extras”, al hacer esto la opción quedará palomeada y en la imagen (que en realidad es un cuadro blanco) se verá una cuadrícula de 10x10 (líneas oscuras). Para agregar esta cuadrícula a las imágenes de los geles maestros es necesario exportarla primero. Maximizar la ventana del Photoshop y, con las teclas Ctrl+ ó Ctrl- ajusta el tamaño de la imagen para que quede lo más grande posible sin que se oculten partes de ella. Hecho esto imprimir la pantalla (dependiendo de la computadora, la impresión de la pantalla puede estar directamente en el teclado como en el caso de una PC o disponible al presionar una combinación de teclas como en el caso de una laptop). Buscar la tecla “ImprPan” o “PrntScrn”. Si la tecla sólo tiene escrito eso,

basta con presionarla. Si viene en otra tecla, por ejemplo en F11, F12 u otra, es necesaria una combinación de teclas para activarla, que puede ser "Fn+PrntScrn" o "Ctrl+Alt+PrntScrn". Después de copiar la pantalla seleccionar en Photoshop el menú "Archivo" y posteriormente "nuevo". Por default el programa selecciona el tamaño (ancho y alto) del nuevo documento, que corresponde al tamaño de la pantalla copiada. Dejar el tamaño por default, cambiar la resolución a 300 pixeles/pulgada y cambiar el nombre por otro (por ejemplo, impresión pantalla), dar click en "OK". Seleccionar el menú "Edición" y "Pegar" o presionar las teclas Ctrl+V simultaneamente. Guardar el documento seleccionando en el menú "Archivo" la opción "guardar" y guardar en formato .Tiff (dar "OK" a las ventanas que aparezcan). Cerrar la pestaña de ese documento y abrir uno nuevo. Nuevamente hay que cambiar el tamaño a 20x20 cm, la resolución a 300 pixeles/pulgada y ponerle un nombre al nuevo documento (por ejemplo cuadrícula 10x10). En el menú "Vista" asegurarse que la opción "Extras" no esté palomeada. Después seleccionar en el menú "Archivo" la opción "colocar" y en la ventana seleccionar la ubicación y el nombre del archivo donde se pegó la pantalla (impresión pantalla), dar click en "Colocar". Aparecerá la imagen sobre el nuevo documento (En un recuadro con una X y pixeleada). Ajustar el tamaño de la imagen de manera que sólo la cuadrícula quede en el espacio del documento (si al ajustar la imagen ésta quedara fuera de los márgenes de la pantalla, presionando simultáneamente las teclas "Ctrl" "+" o "Ctrl" "-" se puede aumentar o disminuir la vista).

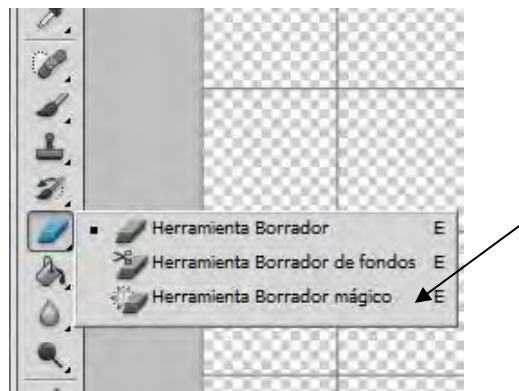


Una vez que la imagen quedó bien ajustada dar “enter” y ésta quedará colocada en la posición y tamaño determinados. Si hubiese quedado mal habrá que eliminar la imagen con la tecla “Delete” o “supr” y reiniciar el proceso de colocado y ajuste. Seleccionar en la pestaña “Capas” la capa llamada “Fondo” y seleccionar el bote de basura debajo para eliminarla.





Después, en la barra de herramientas de la izquierda seleccionar el ícono con forma de borrador y dar click en la pequeña flecha en la parte inferior derecha del ícono para que aparezcan más opciones. Seleccionar la Herramienta Borrador mágico.

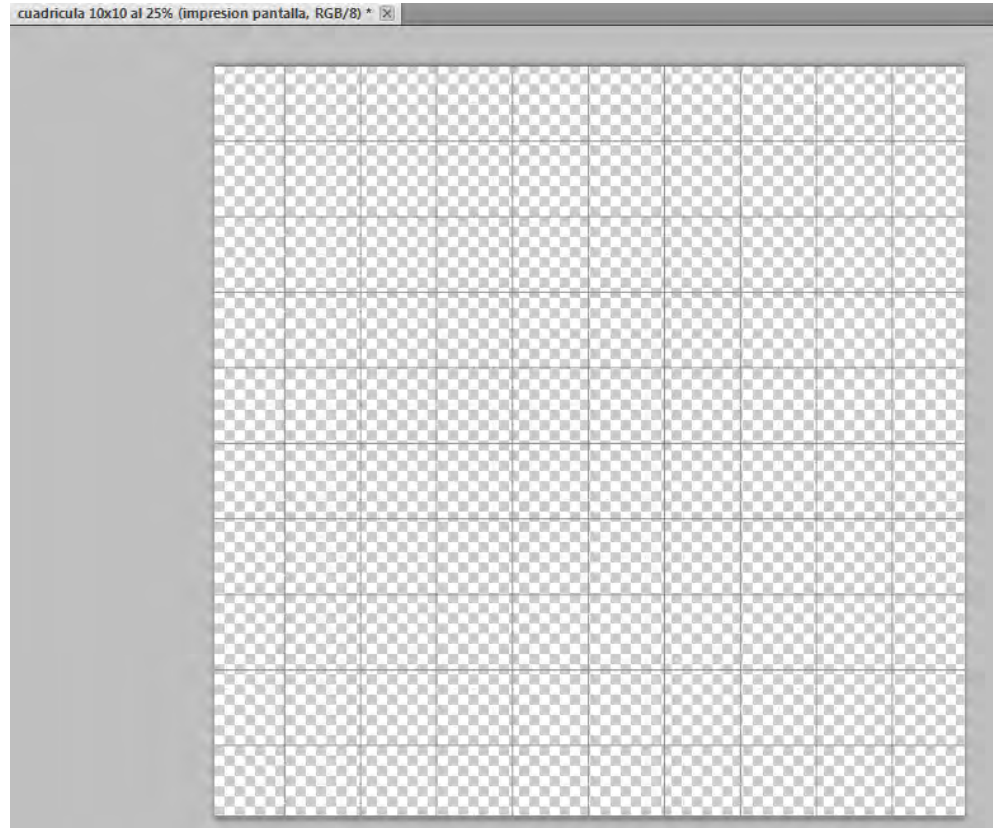


Al seleccionar esta herramienta, en la parte superior de la pantalla aparecerán las opciones de la misma. Seleccionar la opción



“Muestrear todas las capas”.


Una vez hecho esto, sobre la imagen de la cuadrícula dar click en cualquier lugar de color blanco. Al hacer esto se borrará todo el fondo y sólo quedarán las líneas de la cuadrícula. La imagen se verá así:



En la pestaña “capas” sólo debe estar presente una: impresión pantalla. Guardar el archivo como cuadrícula 10x10.

Nota: Los usuarios de Windows 7 cuentan con un programa llamado “Recortes”, que se puede encontrar dando click en el menú inicio y buscando la palabra “recortes”. Al abrir este programa podemos seleccionar el área de la pantalla a copiar sin necesidad de copiarla toda. Esto se puede usar en sustitución de “PrntScrn”.

Con esto terminamos el procedimiento para crear la cuadrícula 10x10.

2. Colocar la gradilla de 10x10 en las imágenes problema. Una vez que tenemos hecha la Gradilla 10x10 es hora de colocarla sobre las imágenes de los masters que exportamos de PdQuest. Para esto es necesario abrir cada imagen por separado en Photoshop. Cerciorarse que en el menú “Vista” la opción “Extras” no esté palomeada. Abrir la primera imagen de gel maestro exportada del PdQuest. Debido a que las imágenes exportadas del PdQuest cuentan con un candado que evita su modificación, habrá que crear una copia de cada una de ellas. Para esto, una vez abierta la imagen seleccionar la herramienta “Marco rectangular”  de la barra de herramientas del lado izquierdo. Después, sobre la imagen trazar un rectángulo que abarque la imagen completa y en el menú “Edición” seleccionar “copiar” o presionar “Ctrl” “c” simultáneamente. Abrir un nuevo documento seleccionando “Nuevo” del menú “Archivo”. Nombrar este nuevo documento con el nombre del gel maestro+ cuadrícula (ejemplo: master40grados+cuadrícula). No modificar el tamaño ni la resolución ya que si se copió correctamente la imagen la resolución será 300 dpi. En este nuevo documento pegar seleccionando del menú “Edición” -“pegar” o presionando “Ctrl”+“V”. La imagen copiada debe ser del mismo tamaño del documento, de lo contrario no se copió correctamente. En el menú “Archivo” seleccionar la opción “Colocar”. Buscar el archivo “cuadrícula 10x10” y dar click en “Colocar”. Ajustar la cuadrícula de manera que quede del mismo tamaño que la imagen. Guardar el archivo con el nombre seleccionado (ejemplo: master40grados+cuadrícula). Repetir esto para cada uno de los geles maestros.

**3. Análisis estadístico.** Para esta parte se requiere del programa SPSS.

C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	...						
C2.1	C2.2									
C3.1										
C4.1										
C5.1										...
...										C6.10
										C7.10
										C8.10
									C9.9	C9.10
				...	C10.6	C10.7	C10.8	C10.9	C10.10	

- a. **Creación de la base de datos.** Con las imágenes de los geles maestros divididas por la gradilla de 10x10 se procede a la creación de una base de datos de todas las casillas. Las casillas serán nombradas de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. De esta manera serán numeradas las 100 casillas en cada imagen. Si dentro de una casilla particular existe al menos un spot, se le asignará un valor de “1” a esta casilla. Si no hay algún spot presente se le asignará un valor de

“0”. En el SPSS serán vaciados esos datos, así como información adicional que se quiera tomar en cuenta (por ejemplo, sexo, edad, estado, tratamiento, método, etc). Al abrir el SPSS se abren 2 ventanas, una es la de datos (parecida a Excel), y la otra es la de resultados, que es donde aparecerán los resultados de los análisis estadísticos que se realicen. En la ventana de datos hay dos pestañas: la primera “vista de datos” es donde se vaciará la información, la segunda denominada vista de variables es dónde se pondrá nombre y características de las variables.

Se puede comenzar poniendo el nombre de las variables en la pestaña Vista de variables.

Nombre: nombre de la variable, sin espacios.

Tipo: Numérica, cadena (texto), notación científica, moneda, dólar, fecha...etc.

Anchura: Ancho de columna

Decimales: Número de decimales que se quieren utilizar

Valores: si es una variable nominal aquí se pueden asignar un significado a cada uno de los valores empleados, por ejemplo 1: hembra 2: macho.

Medida: tipo de variable: nominal, ordinal o escala

	Nombre	Tipo	Anchura	Decimales	Etiqueta	Valores	Perdidos	Columnas	Alineación	Medida	Rol
1	Pig	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Escala	Entrada
2	Sex	Numérico	8	2		{1.00, Hemb...	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
3	State	Numérico	8	2		{1.00, Comp...	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
4	Load	Numérico	8	2		{1.00, Poco ...	Ninguna	8	≡ Derecha	Ordinal	Entrada
5	TOTAL.SP...	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	11	≡ Derecha	Desconocido	Entrada
6	Immunoblot....	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	11	≡ Derecha	Escala	Entrada
7	variabil.para...	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Escala	Entrada
8	variabil.2D	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Escala	Entrada
9	C1.1	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
10	C1.2	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
11	C1.3	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
12	C1.4	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
13	C1.5	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
14	C1.6	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
15	C1.7	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
16	C1.8	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
17	C1.9	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
18	C1.10	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
19	C2.1	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
20	C2.2	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
21	C2.3	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
22	C2.4	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
23	C2.5	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
24	C2.6	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
25	C2.7	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada
26	C2.8	Numérico	8	2		Ninguna	Ninguna	8	≡ Derecha	Nominal	Entrada

1

Vista de datos    Vista de variables

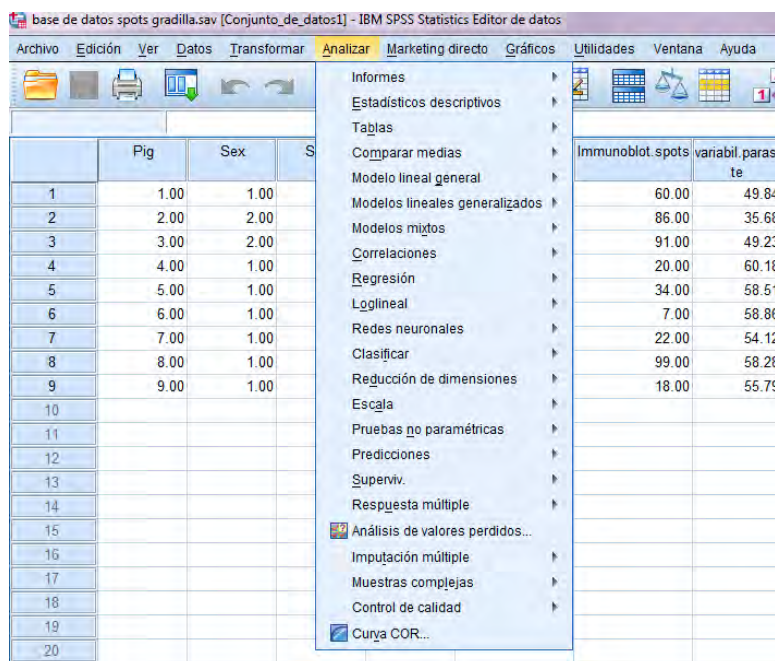
Primero de ponen las variables o características de lo que se está evaluando, por ejemplo: sexo, edad, estado, tratamiento, número de spots, etc.

Después de ponen las casillas de la 1 a la 100 de acuerdo a los nombres anteriormente asignados (C1.1, C1.2, C1.3...). Una vez definidas las variables, en la pestaña vista de datos, se colocan los valores de cada una de ellas.

	Pig	Sex	State	Load	TOTAL SPOTS	Immunoblot.spots	variabil.parasi te	variabil.2D	C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	C1.5	C1.6
1	1.00	1.00	3.00	1.00	91.00	60.00	49.84	49.62	.00	.00	.00	.00	.00	.00
2	2.00	2.00	4.00	4.00	154.00	86.00	35.68	45.82	.00	.00	.00	.00	.00	.00
3	3.00	2.00	4.00	4.00	236.00	91.00	49.23	43.21	.00	.00	.00	.00	.00	.00
4	4.00	1.00	1.00	4.00	105.00	20.00	60.18	38.22	.00	.00	.00	.00	.00	.00
5	5.00	1.00	1.00	1.00	80.00	34.00	58.51	40.97	.00	.00	.00	.00	.00	.00
6	6.00	1.00	4.00	3.00	21.00	7.00	58.86	30.23	.00	.00	.00	.00	.00	.00
7	7.00	1.00	4.00	4.00	53.00	22.00	54.12	45.79	.00	.00	.00	.00	.00	.00
8	8.00	1.00	2.00	4.00	175.00	99.00	58.28	49.13	.00	.00	1.00	1.00	1.00	1.00
9	9.00	1.00	1.00	4.00	68.00	18.00	55.79	44.19	.00	.00	.00	.00	.00	.00
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														
24														

Las casillas tomarán valores de 1 ó 0 dependiendo si eran positivas (con al menos 1 spot) o negativas en cada caso. En este ejemplo se están analizando 9 geles maestros, por lo que hay 9 valores para cada una de las casillas.

- b. **Análisis estadísticos.** Con el SPSS se pueden hacer comparaciones entre las variables, así como ponderar el efecto que alguna de ellas podría tener sobre otra. En este caso se analizará si existe alguna relación entre las casillas (Correlacion de pearson) o entre las casillas y alguna de las variables (por ejemplo sexo). El parecido de las imágenes será analizado mediante una matrix de similitud.

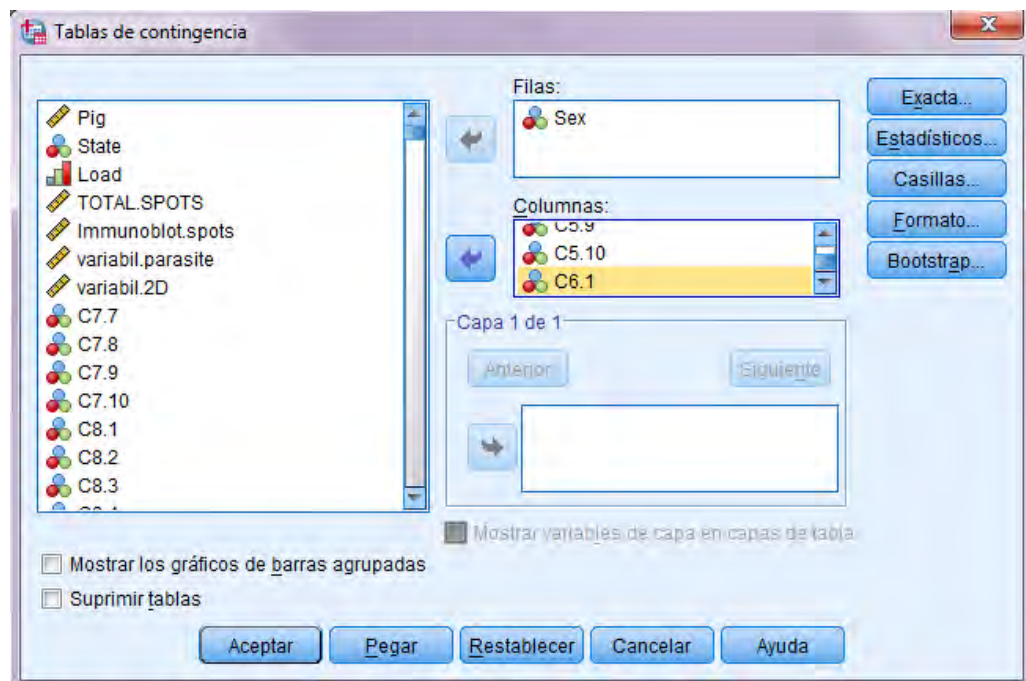


Correlación. Seleccionar del Menú 'analizar' – 'correlaciones' – 'bivariadas'



Seleccionar todas las casillas y dar click en la flecha para pasarlas a la ventana de variables. Dar click en aceptar. En la ventana de resultados aparecerá la tabla de las correlaciones entre las casillas. Las casillas significativas ( $p=0.05$ ) estarán marcadas con un asterisco y las muy significativas ( $p<0.01$ ) con dos asteriscos.

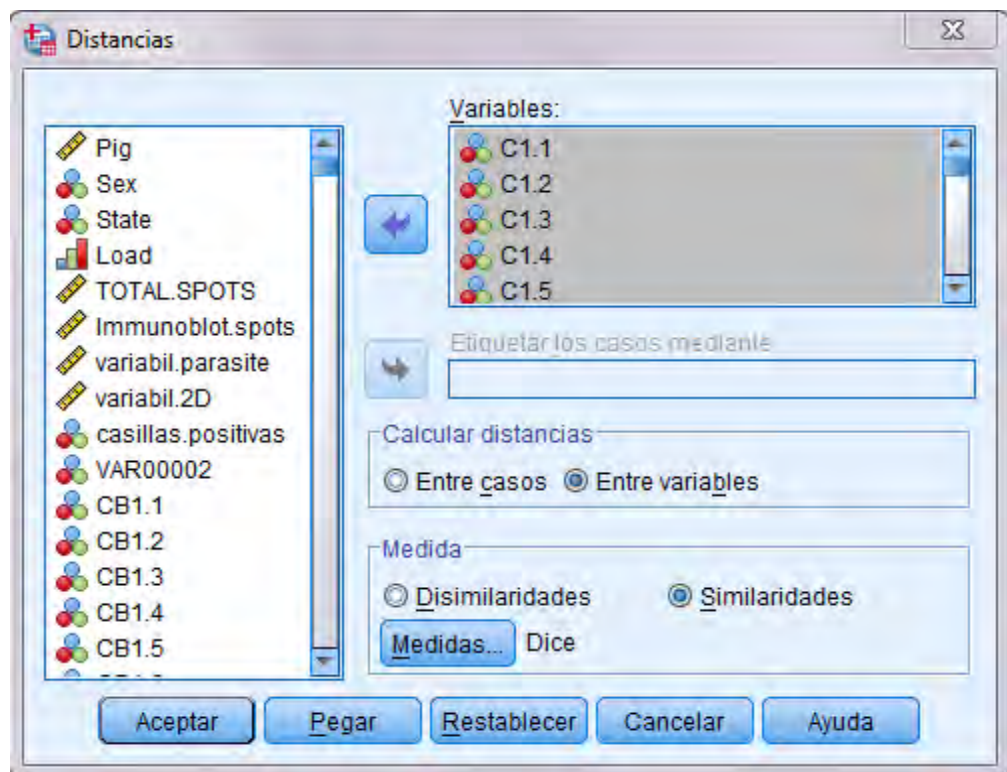
Para evaluar si alguna casilla en particular se asocia con alguna otra variable (por ejemplo: sexo) una prueba de  $\chi^2$  será realizada. Para esto deberán crearse primero tablas de contingencia. Menú 'analizar' – 'estadísticos descriptivos' – 'tablas de



contingencia’.

En la sección de filas colocar las variables a contrastar contra las casillas, y en la sección de columnas colocar las casillas. El máximo de columnas es 76, por lo que el análisis de las 100 casillas deberá realizarse en 2 partes. Dar click en el botón ‘estadísticos’ y seleccionar la opción ‘chi-cuadrada’. Dar click en aceptar. En la ventana de resultados aparecerá el análisis. Para aquellas casillas con valores no constantes aparecerá una tabla con el análisis estadístico y el valor de p del contraste de la variable (sexo en este caso) con cada una de las casillas. Repetir el procedimiento para el resto de las casillas hasta completar las 100.

Matriz similitud. Seleccionar del menú ‘analizar’ – ‘correlaciones’ – ‘distancias’.



Seleccionar todas las casillas y pasarlas al lado de Variables. Seleccionar la opción Calcular distancias “entre variables” y seleccionar si lo que se desea es una matriz de similitudes o de diferencias. En Medidas seleccionar el método de cálculo de distancia o si se desea, la prueba estadística a realizar. Dar click en aceptar. El resultado aparecerá en la ventana de resultados.



Dependiendo de las necesidades específicas de cada análisis se pueden realizar otras pruebas con el SPSS, como ANOVA de un factor o Multivariante, pruebas de t, correlaciones lineales, gráficos, etc.

## Anexo IV- Información suplementaria



Figura S1. Western Blots en 2-Dimensiones realizados para determinar si en 2-Dimensiones, el anticuerpo secundario tiene la misma magnitud de reacción que en 1-Dimensión. Todos los 2D-IgG inmunoblots presentados en esta figura fueron realizados utilizando el LV de los cisticercos (quince) obtenidos de un cerdo naturalmente infectado que no está incluido en los experimentos anteriormente presentados (Cerdo #12, Hembra de traspatio de edad desconocida, proveniente de la costa chica de Guerrero, poco infectada). A), C) y E) corresponden al LV sin limpiar de su contenido de inmunoglobulinas. B), D) y F) corresponden al mismo

LV pero limpio de su contenido de inmunoglobulinas. A) y B) corresponden a la reacción de las IgG del suero del mismo cerdo 1:1000. C) y D) corresponden a la reacción de un pool de sueros negativos para cisticercosis 1:1000 de cerdos rurales (Guerrero) negativos para cisticercosis examinados por necropsia y de cerdos provenientes de una granja tecnificada (ver tabla ST1). E) y F) corresponden a la reacción del anticuerpo secundario solamente. No se usó suero de cerdo.

Suero	Número clave	Procedencia
1	12	Granja tecnificada
2	14	Granja tecnificada
3	16	Granja tecnificada
4	18	Granja tecnificada
5	19	Granja tecnificada
6	31	Granja tecnificada
7	33	Granja tecnificada
8	35	Granja tecnificada
9	37	Granja tecnificada
10	80	Granja tecnificada
11	3	Zona endémica
12	7	Zona endémica
13	8	Zona endémica
14	23	Zona endémica
15	31	Zona endémica
16	40	Zona endémica
17	55	Zona endémica
18	58	Zona endémica
19	65	Zona endémica
20	66	Zona endémica

Tabla ST1. Información de los sueros de cerdos controles, negativos para cisticercosis.



Figura S2. Western Blot en 1-Dimensión utilizando los sueros controles. Se realizó una mezcla de partes iguales de los LV obtenidos de los cisticercos de los once cerdos utilizados en el estudio. Sólo algunos cerdos provenientes de zona endémica mostraron bandas, aunque son muy pocas comparadas con las de los inmunoblots en 1D con los sueros de los cerdos infectados. Los cerdos de zonas rurales endémicas para cisticercosis pueden haber tenido contacto con el parásito y no haber desarrollado la infección o lograron eliminarla, razones por las cuales pueden tener anticuerpos contra el parásito.