



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Biología Experimental

Evaluación de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium* en su
capacidad diagnóstica de cisticercosis porcina y humana

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Christian Alejandro García Ávila

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Raúl José Bobes Ruíz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. Gladis del Carmen Fragoso Gonzáles
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marta C. Romano Pardo
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

CD. DE MÉXICO. AGOSTO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Biología Experimental

Evaluación de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium* en su
capacidad diagnóstica de cisticercosis porcina y humana

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Christian Alejandro García Ávila

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Raúl José Bobes Ruíz
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. Gladis del Carmen Fragozo Gonzáles
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Marta C. Romano Pardo
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN

MÉXICO, CD. DE MÉXICO. AGOSTO, 2018



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto del 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS del alumno GARCÍA AVILA CHRISTIAN ALEJANDRO con número de cuenta 305126896 con la tesis titulada "Evaluación de la proteína 14-3-3 de *Taenia solium* en su capacidad diagnóstica de cisticercosis humana y porcina", realizada bajo la dirección del DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUIZ.

Presidente: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Vocal: DR. JAVIER AMBROSIO HERNÁNDEZ
Secretario: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SANCHEZ
Suplente: DRA. AGNÉS ODILE FLEURY

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 3^o de mayo del 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A CONACyT por la beca 709008

Al Dr. Raúl José Bobes Ruíz, por su asesoramiento durante la realización de este trabajo, por su confianza y apoyo, no solo en la cuestión académica, sino también personal.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Gladis del Carmen Fragoso Gonzales y la Dra. Marta C. Romano Pardo, por su apoyo e ideas necesarias para mejorar y llevar a cabo este trabajo de investigación.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Juan Pedro Laclette San Román, por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, por su apoyo y ayuda en los problemas tanto académicos como personales.

A los miembros de mi jurado, Dra. Gladis Fragoso Gonzales, Dra. Edda Sciutto Conde, Dra. Agnes Fleury, Dr. Julio Cesar Carrero y Dr. Javier Ambrosio por su ayuda y comentarios que me ayudaron a mejorar y terminar este proyecto.

A la M. en C. Patricia de la Torre, por su amistad, consejos y ayuda para la culminación de mi trabajo.

A la M. en C. Cristina Parada Colín por su gran ayuda para la purificación de la proteína recombinante.

A mis amigos: Adriana Ayón por ayudarme y enseñarme en todo momento, Jeanette Flores, César Díaz, Israel por su compañía, consejos y amistad, hicieron más ameno todos esos días en el laboratorio.

A mi casi hermano Uriel Martínez porque después de tanto tiempo sigues ahí, siempre presente para consejos, platicas, fiestas, para todo.

Dedicatoria

A mis padres Alicia Ávila y Héctor García, mis hermanas Cristina García y Alicia García porque todo esto es gracias a ustedes, por su cariño y apoyo incondicional durante toda mi vida, porque siempre que necesite algo, ustedes estarán para mí, para darme esa fuerza que requiero, gracias por todo.

A Fabiola Estrada, porque me haz acompañado y apoyado en todo momento, porque siempre estas a mi lado cuando necesito ayuda, siempre presente sin importar nada, ya sean buenos o malos momentos, nunca me has dejado, gracias por todo.

A Dios, por todo lo bueno que tengo en la vida.

Índice

1.	Resumen	1
2.	Abstract	3
3.	Introducción	5
4.	Ciclo de vida	6
5.	Epidemiología	8
6.	Cisticercosis	10
7.	Diagnóstico	11
8.	Antecedentes	17
9.	Justificación.....	21
10.	Hipótesis	22
11.	Objetivos	22
11.1.	Objetivo general	22
11.2.	Objetivos específicos	22
12.	Metodología	24
12.1.	Análisis bioinformático sobre la proteína 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	24
12.2.	Extracción de RNA de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	24
12.3.	Amplificación de la secuencia de la proteína 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	25
12.5.	Inducción de la proteína 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	27
12.6.	Purificación de la proteína 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	27
12.7.	Identificación del tallo de Histidina de la proteína recombinante 14-3-3 mediante Western Blot.....	28
12.8.	Evaluación de la proteína recombinante 14-3-3 de <i>Taenia solium</i> en su capacidad diagnóstica mediante ensayos de ELISA.....	28
12.9.	Análisis estadístico	29
13.	Resultados	30
13.1.	Análisis Bioinformático de la proteína 14-3-3.....	30
13.2.	Amplificación del gen que codifica para la proteína 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	36
13.3.	Clonación de la proteína 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	38
13.4.	Expresión de la proteína recombinante 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	40
13.5.	Purificación de la proteína recombinante 14-3-3 de <i>Taenia solium</i>	41
13.7.	Evaluación de la proteína recombinante 14-3-3 de <i>Taenia solium</i> en su capacidad diagnóstica mediante ensayos de ELISA	42

13.7.1. Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad inmunodiagnóstica de la proteína 14-3-3 de <i>T. solium</i> utilizando muestras de sueros de cerdos cisticercosos y no cisticercosos.....	42
13.7.2. Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad inmunodiagnóstica de la proteína 14-3-3 de <i>T. solium</i> utilizando muestras de sueros de pacientes con NCC negativa, NCC activa, NCC inactiva y otros desórdenes neurológicos	42
14. Discusión	51
15. Referencias	58

1. Resumen

Taenia solium es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. La cisticercosis por *T. solium*, es causa de morbi-mortalidad en humanos y de pérdidas económicas en la porcicultura, principalmente en países en vías de desarrollo. En el ser humano, los cisticercos se localizan con mayor frecuencia en músculo esquelético, ojos, tejido graso subcutáneo, corazón y sistema nervioso central, cuando se localiza en este último causan neurocisticercosis (NCC), la forma más grave de la enfermedad.

El diagnóstico de la cisticercosis porcina en comunidades rurales se basa en la inspección lingual en búsqueda de cisticercos, sin embargo, este método es muy poco sensible. El diagnóstico de la NCC humana se basa principalmente en estudios de neuroimagen (resonancia magnética y tomografía computarizada) apoyados en el perfil clínico del paciente. Actualmente, las técnicas de inmunodiagnóstico se utilizan para apoyar el diagnóstico de cisticercosis humana y porcina. Dichas técnicas se basan en la detección de antígenos del cisticerco (lo cual indicaría una infección activa) o en la detección de anticuerpos (indicativo de contacto con el parásito). Aunque el inmunodiagnóstico es una herramienta de utilidad para el diagnóstico, los métodos actualmente disponibles no presentan la capacidad predictiva requerida. Así continúa vigente el requerimiento de antígenos que proporcionen un método de mayor sensibilidad y especificidad. Entre los antígenos candidatos de mayor interés se ha reportado en nuestro grupo de investigación a la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium* en su capacidad inmunodiagnóstica de la cisticercosis porcina y humana.

Para este propósito la proteína 14-3-3 fue clonada, expresada en forma recombinante y purificada. La proteína recombinante fue posteriormente evaluada en su capacidad diagnóstica por medio de ensayos de ELISA. Se utilizaron sueros de cerdos cisticercosos naturalmente infectados y no cisticercosos, así como

sueros y líquidos cefalorraquídeos (LCR) de humanos con NCC activa, NCC inactiva y otros desórdenes neurológicos.

Los resultados obtenidos muestran que la proteína recombinante 14-3-3 es capaz de diferenciar entre sueros de cerdos cisticercosos y no cisticercosos, presentando una sensibilidad y especificidad de 88.6% y 100% respectivamente. En el caso de los sueros y LCR de pacientes con NCC activa, la proteína 14-3-3 fue capaz reconocer en un 77% y 69.2% respectivamente. Por otro lado, la proteína también fue capaz de discriminar en un 100% las muestras de sueros de pacientes sanos y de LCR de pacientes con NCC inactiva.

Para los LCR de pacientes con otros desórdenes neurológicos, la proteína 14-3-3 solamente tuvo reacción con una sola muestra (3.5%, 1/29).

Los resultados reportados en este trabajo de tesis aportan datos suficientes para proponer a la proteína 14-3-3 como un candidato para el diagnóstico la cisticercosis porcina y humana. El antígeno 14-3-3 podría ser utilizado como apoyo a los estudios de neuroimagen y la clínica del paciente para poder llegar a un diagnóstico más certero, adicionalmente sería útil para estudios de seguimiento de pacientes y seroepidemiológicos.

2. Abstract

Taenia solium is the causal agent of human and porcine cysticercosis. *T. solium* cysticercosis is a significant cause of human mortality and economic losses in pig farming, mainly in developing countries. In humans, cysticerci are more commonly found in skeletal muscle, eyes, subcutaneous fat, heart and central nervous system, when it is located in the latter is called neurocysticercosis (NCC).

The diagnosis of swine cysticercosis is based on the lingual inspection in search of cysticerci, however, this method is very unresponsive. The diagnosis of neurocysticercosis is based mainly on neuroimaging studies (magnetic resonance and computed tomography) supported in the patient's clinic. Currently the immunodiagnostic techniques are used to support the diagnosis of human and porcine cysticercosis. These techniques are based on the detection of cysticercus antigens (which would indicate an active infection) or the detection of antibodies (indicative of contact with the parasite). Although immunodiagnosis is of great importance, a completely effective method for diagnosis is currently lacking. This is why it is of great importance to continue the search for antigens that provide a sensitive and specific method.

The objective of this work was to evaluate the recombinant 14-3-3 protein of *Taenia solium* in its immunodiagnostic capacity of porcine and human cysticercosis.

Protein 14-3-3 was cloned, expressed and purified, once the recombinant protein was obtained, its diagnostic capacity was evaluated by means of ELISA tests, sera from cysticercosis and non-cysticercosis pigs were tested as well as sera and Cerebrospinal fluid (CSF) from healthy humans, with active NCC, inactive NCC and other neurological disorders.

The results obtained show that the recombinant protein 14-3-3 is able to differentiate between sera from cysticercosis and non-cysticercosis pigs, presenting a sensitivity and specificity of 88.6% and 100%, respectively.

In the case of human sera, 14-3-3 protein was able to recognize in 76.9% sera from patients with active NCC and 69.2% CSF from patients with active NCC, the protein was also able to discriminate in 100% serum samples from healthy patients and CSF from patients with inactive NCC.

It is noteworthy that using CSF in patients with other neurological disorders, the 14-3-3 protein discriminates in 96.5% (1/29), which is interesting, as cross-reactions are generally observed with samples from patients with other diseases neurological.

Finally, our results provide relevant data on the use of the 14-3-3 protein as an antigen to diagnose porcine and human cysticercosis. This antigen can be used to support neuroimaging studies and the patient's clinic to reach a more accurate diagnosis would additionally be useful for follow-up studies of patients and seroepidemiological.

3. Introducción

Taenia solium es un parásito perteneciente a la clase Eucestoda, orden Cyclophyllidea y a la familia Taeniidae, causante de la teniasis en humanos y el metacestodo o cisticerco es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. La tenia adulta es un gusano aplanado, con una longitud de entre 1.5 y 5 m, en el extremo anterior se localiza el escólex con un diámetro de aproximadamente 1mm, con cuatro ventosas y un rostelo formado por una doble cadena de ganchos (25-30 ganchos cada una). Posterior al escólex se encuentra el cuello, el cual mide de 5 a 10 mm y continúa con el estróbilo, que es una serie de segmentos llamados proglótidos; cada proglótido es una unidad reproductiva independiente la cual tiene órganos reproductores femeninos y masculinos, los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros, continúan los maduros y los más distales son grávidos (los cuales contienen los huevos fecundados). Los huevos de la *T. solium* son esféricos y miden entre 20-40 µm. Los huevos que están presentes en los proglótidos grávidos se encuentran en diferentes grados de maduración, cerca del 50% contienen oncosferas infectivas totalmente desarrolladas mientras que aquellos inmaduros se localizan en proglótidos más distales. El cisticerco (también llamado metacestodo) mide generalmente de 0.5 a 2.0 cm de diámetro y se observan como vesículas blanquecinas llenas de líquido, con un escólex invaginado.¹⁻⁴

4. Ciclo de vida

Taenia solium tiene un ciclo de vida en el cual están involucrados dos hospederos; el humano como hospedero definitivo y el cerdo como hospedero intermediario, aunque el ser humano también puede infectarse con los cisticercos (Fig. 1). El parásito adulto habita en el intestino del ser humano, los proglótidos grávidos y/o los huevos son liberados junto con la materia fecal contaminando el ambiente; el cerdo ingiere los proglótidos y/o huevos, una vez en el tubo digestivo, las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación del embrión hexacanto (también llamado oncosfera) contenido en el huevo. Los embriones activados penetran la pared intestinal del cerdo hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos que los distribuyen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético, cardíaco y cerebro) donde se establecen y se desarrollan hasta alcanzar la fase de cisticerco. El ciclo se completa cuando el humano ingiere cisticercos vivos presentes en la carne de cerdo cruda o mal cocida, de igual manera, las enzimas gástricas e intestinales así como las sales biliares del humano participan en la activación, ahora del cisticerco, induciendo la evaginación del escólex y su fijación en la pared intestinal. Una vez anclado, el parásito crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia adulta productora de proglótidos grávidos. Sin embargo, el humano debido a prácticas de mala higiene, puede ingerir los huevos y desarrollar cisticercosis; cuando los parásitos se establecen en el sistema nervioso central se denomina neurocisticercosis.³⁻⁶



Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (tomado de Flisser A. et al 2006) ⁶

5. Epidemiología

Taenia solium es un parásito cosmopolita, cuya distribución está ligada a condiciones socioeconómicas de países en vías de desarrollo. Es considerado como una causa de morbilidad/mortalidad en seres humanos y pérdidas económicas en las poblaciones de cerdos en América Latina, Asia y África (Fig. 2). Se reporta que hay más de 2 millones de personas teniasicas y aproximadamente 20 millones de personas con cisticercosis, los cálculos más conservadores estiman 50000 muertes al año debido a la neurocisticercosis ^{4,7-11}

En varios países de América Latina como México, Perú, Brasil, Ecuador, Colombia y Guatemala la cisticercosis se considera un problema de salud. En México se reportan tasas de seroprevalencia hasta de un 50% en humanos y un 35% en cerdos, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) en el 2004 reportó que la neurocisticercosis es la quinta causa de morbilidad y la novena causa de mortalidad en el Instituto. ^{8,12-19}

En Perú la prevalencia de cisticercosis en humanos y cerdos es de 36.9% y 61% respectivamente, mientras que en Bolivia se reportan 22.6% de cisticercosis humana y 38.9% de cisticercosis porcina. En Guatemala la prevalencia reportada es de 17% de cisticercosis humana y 14% porcina, Honduras reporta una prevalencia de cisticercosis porcina de 27.1% y en Ecuador la tasa de seroprevalencia reportada de cisticercosis en humanos es de 43% mientras que en cerdos es de 74%. ^{11,17,20-26}

En África, diversos países reportan distintas prevalencias de cisticercosis porcina; el Congo la prevalencia es del 41.2%, Sudáfrica reporta 40.6%, en Mozambique un 36%, Kenia reporta un 32.8% y Tanzania un 30.7% ²⁷⁻³²

Los casos reportados en los países desarrollados como Estados Unidos y Canadá se deben principalmente a la inmigración procedente de los países endémicos, ³³⁻³⁶ mientras que en Europa, en un estudio que abarca de 1990-2011 se reporta que de un total de 846 casos, el 70.1% (522) son autóctonos (Península Ibérica, del

norte de Portugal y el oeste de España) y 324 (29.9%) se deben a inmigración de los cuales el 74.7% de los casos son importados de América Latina. ³⁷

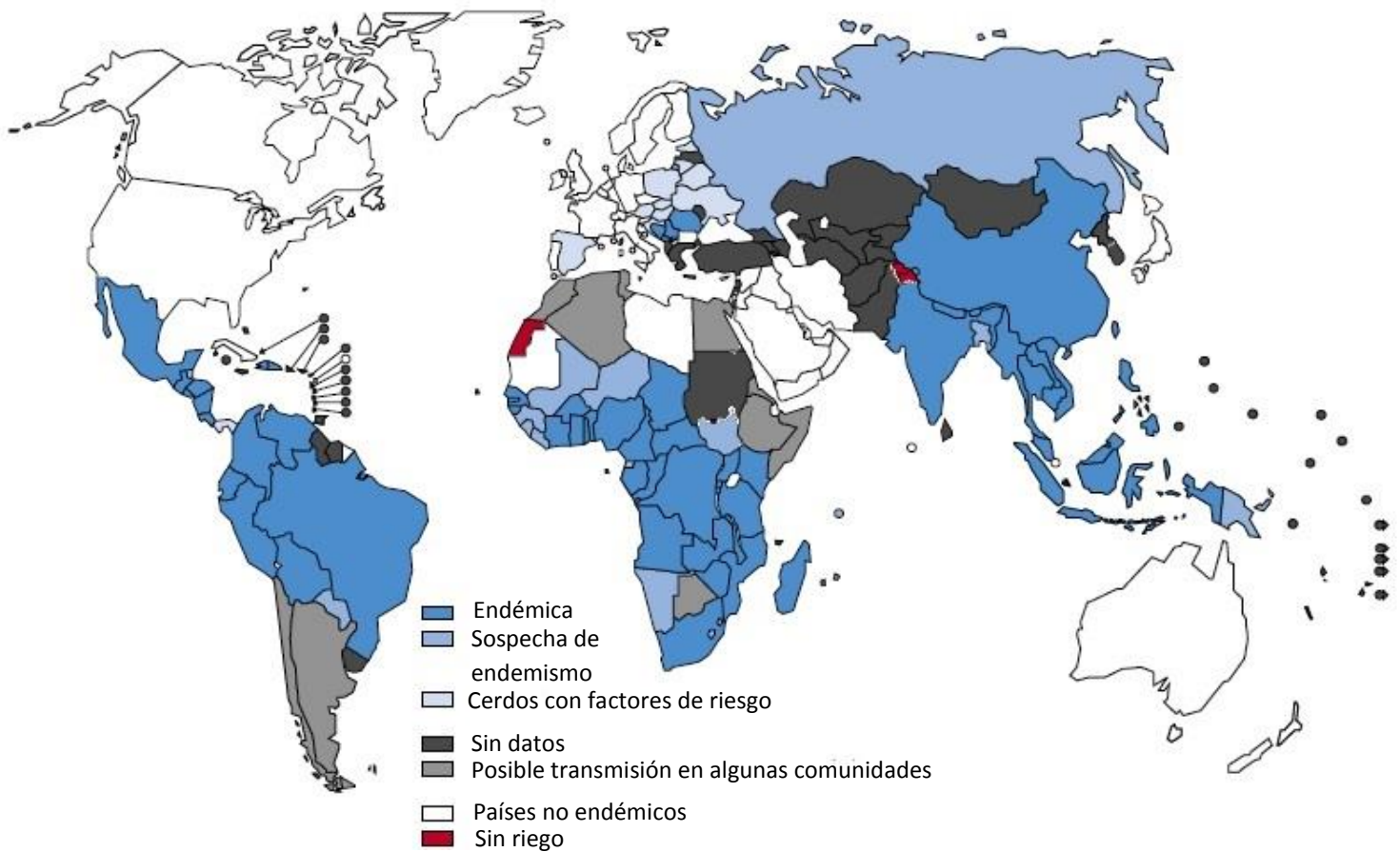


Figura 2. Distribución mundial de la teniasis/cisticercosis por *Taenia solium* (tomado y modificado de Donadeu M. *et al.* 2016) ⁹

6. Cisticercosis

La cisticercosis es causada por la fase larvaria o metacestodo de *T. solium*. En el humano, los cisticercos se localizan con mayor frecuencia en el músculo esquelético, sistema nervioso central (SNC), ojos, tejido graso subcutáneo y corazón. Cuando el cisticerco se localiza fuera del SNC, suele ser asintomático, mientras que cuando se aloja en el SNC, produce la neurocisticercosis (NCC). Las manifestaciones clínicas de la NCC dependerán del número de parásitos, estado degenerativo y de su localización, así como de la severidad de la respuesta inflamatoria del huésped. La cisticercosis extraneurológica parece ser más frecuente en África y Asia, mientras que la forma neurológica abunda en América Latina.³

La Neurocisticercosis no tiene un cuadro clínico específico, las manifestaciones pueden variar de la infección asintomática a la enfermedad grave, e incluso la muerte. La cisticercosis fuera del SNC no se asocia generalmente con manifestaciones clínicas, con las excepciones de la cisticercosis ocular y raros casos con afectación muscular masiva. Las principales manifestaciones clínicas de la NC son: epilepsia (80%), déficit neurológicos focales (16%), incremento de la presión intracraneal (12%) y deterioro cognitivo (5%). Cuando hay presencia de estos síntomas se denomina NCC activa, mientras que la NCC inactiva se refiere a que no hay evidencia del parásito (ni viable, ni en degeneración), pero los estudios de neuroimagen muestran residuos de una infección previa y de una respuesta del hospedador, generalmente los parásitos se encuentran en un estadio calcificado
38,39

El pronóstico de la NCC varía de acuerdo con la ubicación y la carga de parásitos. La NCC subaracnoidea e intraventricular están asociados con la mortalidad y la morbilidad grave. El pronóstico en la cisticercosis del parénquima cerebral se ve afectado principalmente por el número de lesiones y intensidad de la inflamación.^{3,40-42}

En los cerdos los cisticercos pueden alojarse en cualquier parte del cuerpo, más comúnmente en el músculo y la grasa subcutánea. En cerdos, generalmente la infección es asintomática, sin embargo, estudios realizados, reportaron que el parpadeo de los ojos, lagrimeo y salivación excesiva, así como torpeza, lentitud, somnolencia, apatía y pérdida de la conciencia pueden ser indicativos de NCC porcina, recientemente se reportó el caso de convulsiones en cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*.⁴³⁻⁴⁶

7. Diagnóstico

Neurocisticercosis

El diagnóstico de la Neurocisticercosis es complejo debido a que la enfermedad no presenta un cuadro clínico específico. Los estudios de neuroimagen (resonancia magnética nuclear y tomografía axial computarizada) son los estándares de oro para confirmar la presencia del parásito en el SNC. Dichas técnicas pueden mostrar la morfología y localización de los parásitos, la carga de la infección, la etapa de desarrollo de los cisticercos y la presencia de inflamación circundante. Sin embargo, son técnicas costosas y poco accesibles para las personas en los países endémicos.³⁹

Existen diferentes criterios para el diagnóstico de la NCC. Recientemente, un grupo de médicos e investigadores, actualizaron los criterios de diagnósticos basándose en la experiencia práctica, para confirmar el diagnóstico se revisan diversos criterios que se muestran en la tabla 1.^{39,47-49}

TABLA 1. Principales criterios para el diagnóstico de la Neurocisticercosis ⁴⁹.

Neurocisticercosis parenquimatosa	
Diagnóstico	Criterios
Definitivo	<p>Quiste parenquimatoso con diagnóstico patológico</p> <p>Quistes parenquimatosos múltiples o simples, activos, con al menos un escólex visible en TC o RM</p> <p>Múltiples vesículas parenquimatosas sin escólex asociadas con al menos uno de los siguientes criterios:</p> <p>Convulsiones tónico-clónico focal o generalizada.</p> <p>Prueba inmunológica positiva de suero o LCR (ELISA, EITB)</p> <p>Cualquier combinación del cisticerco parenquimatoso en diferentes etapas evolutivas: vesicular con o sin escólex, degenerativo (coloidal o nodular) y calcificado.</p>
Probable	<p>Calcificación o vesícula parenquimatosa única (sin escólex) o quiste (s) degenerado (s), que establece diagnósticos diferenciales con otras etiologías, asociados con al menos dos de los siguientes:</p> <p>Convulsiones: tónico-clónico focal o generalizado</p> <p>Localización de quistes subcutáneos o musculares confirmada por biopsia.</p> <p>Prueba inmunológica positiva de suero o CSF (ELISA, EITB).</p> <p>Películas de rayos X simples que muestran calcificaciones "en forma de cigarro".</p> <p>Individuo que vive o ha vivido o ha viajado frecuentemente a países endémicos.</p> <p>Múltiples calcificaciones parenquimatosas en un individuo que vive o ha vivido o ha viajado frecuentemente a países endémicos y en quien el estado clínico excluye otras etiologías de calcificaciones.</p>

Continuación tabla 1

Neurocisticercosis extraparenquimitasa (subaracnoidea, intraventricular)	
Diagnóstico	Criterios
Definitivo	Quiste extraparenquimatoso con diagnóstico patológico Uno o más quistes extraparenquimatosos en secuencias especiales de MRI con escólex en al menos uno de ellos. Uno o más quistes extraparenquimatosos en secuencias especiales de MRI sin escólex asociados con al menos dos de los siguientes: Hidrocefalia CSF inflamatorio Prueba inmunológica positiva de LCR (ELISA, EITB) Presencia de calcificaciones únicas o múltiples o quiste parenquimatoso vesicular o degenerativo

TC: tomografía computarizada, RM: resonancia magnética, LCR: líquido cefalorraquídeo, ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, EITB: electroinmunitransferencia. Tomado y modificado de Carpio A. *et al.* 2016 ⁴⁹

Debido a la heterogeneidad que se presenta en el cuadro clínico de la NCC, las técnicas de inmunodiagnóstico han sido de gran utilidad para apoyar al diagnóstico de la NCC. Estos métodos se basan en la detección de anticuerpos o antígenos del parásito.⁷

Los métodos de diagnóstico dirigidos a la búsqueda de anticuerpos se basan en que la infección con *T. solium* da como resultado una respuesta de anticuerpos específicos. Estos anticuerpos pueden ser detectados en el suero o líquido cefalorraquídeo del paciente en el caso de la NCC ⁵⁰, en la saliva ⁵¹ e incluso en las lágrimas en el caso de la cisticercosis oftálmica.⁵²

La prueba serológica más específica hasta ahora es la Electroinmunotransferencia (EITB) en la que se utilizan antígenos purificados mediante lectinas, dicho antígeno está compuesto por siete glicoproteínas (GP) altamente antigénicas y específicas: GP 50kDa, GP 42-39kDa, GP 24kDa, GP 21kDa, GP 18kDa, GP 14 kDa y GP 13 kDa, con este método se reporta una sensibilidad/especificidad de 98% y 100% respectivamente. La reacción con cualquiera de las siete bandas específicas se considera como diagnóstico para la cisticercosis. Sin embargo, la sensibilidad de este ensayo se reduce drásticamente en los casos en que los individuos tienen un solo parásito en el cerebro y además no es reproducible.^{53,54}

Existen diferentes reportes donde se utilizaron proteínas recombinantes o péptidos sintéticos para el diagnóstico de la NCC, obteniéndose distintos porcentajes de sensibilidad y especificidad (Tabla 2).

Sin embargo, los métodos que se basan en la detección de anticuerpos sólo indican la exposición al parásito y no necesariamente la infección activa. Debido a esto, se han realizado diversos trabajos en los cuales se busca detectar los antígenos del parásito, ya que esto reflejaría la presencia de parásitos viables. Estos ensayos utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales para detectar antígenos en LCR, suero u orina.^{62,63}

El uso de dos pruebas basadas en la utilización de un anticuerpo monoclonal se ha validado y se utilizan de forma rutinaria para la detección de antígenos del parásito (HP10 Ag-ELISA y B158/B160 Ag-ELISA).⁶⁴

El anticuerpo monoclonal HP10 reconoce un epítipo, el cual es una secuencia repetitiva de carbohidratos presentes en la superficie y en las secreciones de cisticercos de *T. saginata*.⁶⁵ Se ha reportado una sensibilidad de hasta el 91.3% en LCR, 84.8 % en suero y una especificidad de 94 % utilizando el antígeno HP10

Ag-ELISA, aunque se ha observado que estos valores decaen cuando hay un solo cisticerco o cuando éste se encuentran en el parénquima cerebral. ^{64,66}

Tabla 2. Trabajos de inmunodiagnóstico basados en la búsqueda de anticuerpos.

Antígeno	Técnica	Sensibilidad/especificidad (%)	Referencia
Péptido SPACc	ELISA	93/94.3	55
Ts8B2	ELISA	96.8/93.1	56
GP50	EITB	100/90	57
TsAg5	EITB	96.3/76.7 (extraparenquimal) 39.6/76.7 (un solo cisticerco)	58
Tsp27	EITB	76.4/95.6	59
	ELISA	86.7/94.6	
Ts8B2	ELISA	91.3/92.5 (NCC activa) 68.6/92.5 (NCC inactiva)	60
Péptido Ts8B2-NT		91.3/97.8 (NCC activa) 68.6/97.8 (NCC inactiva)	
Antígenos E/S 43kDa	EITB	88.2/100	61

Tabla 2. Proteínas recombinantes y péptidos utilizados para el inmunodiagnóstico de la NCC humana. Peptido SPACc (proteína del escolex de *Cisticercus cellulosae*), Ts8B2 (antígeno excreción/secreción de 8 kDa), GP50 (glicoproteína 50 kDa), TsAg5 (antígeno 5, proteína con actividad de tipo tripsina), Tsp27 (proteína de *Taenia solium* 27 kDa).

Con la técnica de B158/B160 Ag-ELISA se ha reportado hasta un 92% de sensibilidad. Sin embargo, también decae hasta un 62.5% cuando los pacientes tenían solo un cisticerco. ^{63,67}

Diversos trabajos han reportado el uso de distintos anticuerpos dirigidos a la búsqueda de antígenos para el diagnóstico de la cisticercosis (Tabla 3). <z<<<<

Tabla 3. Trabajos de inmunodiagnóstico basados en la búsqueda de antígenos

Anticuerpo	Técnica	Sensibilidad/especificidad (%)	Referencia
Policlonal anti- antígeno total de cisticerco	Aglutinación (Co-A)	62.5/100 (orina)	62
	ELISA	62.1/96 (suero)	
B158/B60	ELISA	90/98 (suero)	68
		86/88 (orina)	
Policlonal anti- antígeno total de cisticerco	ELISA	81.2/82 (suero)	69
Policlonal anti- antígeno total de cisticerco	EITB	58.8/100 (suero)	70
		58.3/98 (orina)	
HP10	ELISA	87.5/96.1 (LCR)	66

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el inmunodiagnóstico de la NCC humana.

Cisticercosis Porcina

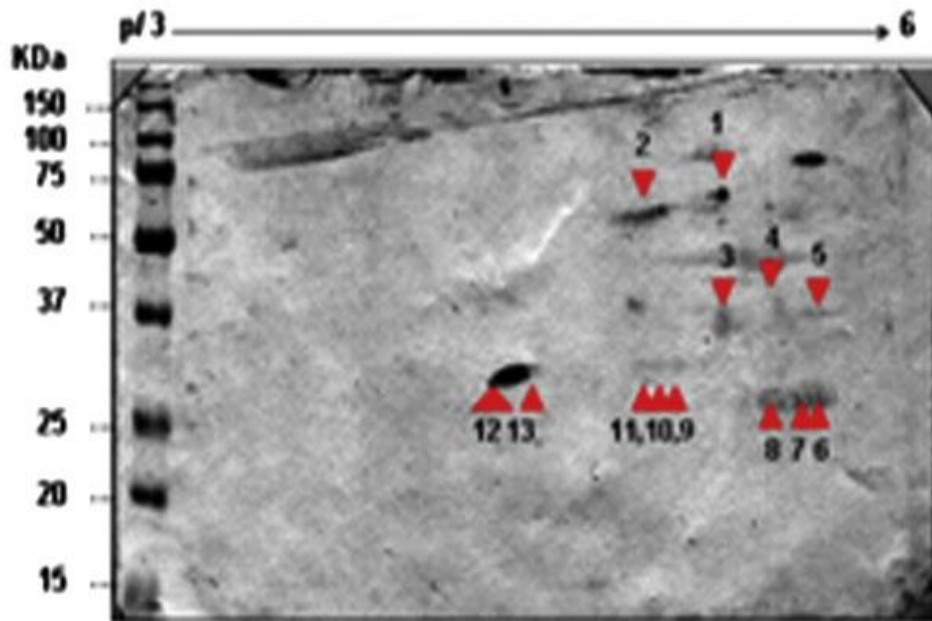
En cuanto a la cisticercosis porcina, el método más común para diagnosticarla es la inspección de la lengua. Sin embargo, esta técnica requiere habilidades técnicas y personal entrenado además de carecer de sensibilidad. En un estudio realizado se compararon los métodos de detección de antígenos y anticuerpos mediante ELISA, así como la inspección lingual y se reportó que en cerdos rurales estos métodos tenían poca sensibilidad y especificidad.⁷¹ También se han utilizado las técnicas de B158/B160 Ag-ELISA y HP10 Ag-ELISA dando como resultado una

sensibilidad y especificidad de 76%/84% respectivamente para B158/B160 Ag-ELISA y 55%/83% para HP10 Ag-ELISA. ²⁸

Debido a la dificultad del diagnóstico tanto de cisticercosis porcina como NCC es que se han tratado de desarrollar nuevas estrategias que conduzcan a la identificación de proteínas que puedan ser blancos específicos para el inmunodiagnóstico. Una herramienta es la proteómica, que mediante la separación de proteínas en geles de doble dimensión (2D-PAGE) se pueden identificar proteínas específicas e inmunorreactivas mediante inmunoblot, y su posterior identificación por espectrometría de masas y así proponerlas como blancos para el diagnóstico. ⁷²⁻⁷⁴

8. Antecedentes

En nuestro grupo de trabajo, mediante electroforesis en doble dimensión e inmunoblot, se identificaron 7 antígenos inmunodominantes específicos del cisticerco de *T. solium*, los cuales fueron propuestos como posibles blancos para ser utilizados en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis porcina y humana. Para la identificación de los antígenos se utilizó un extracto total proteico de cisticercos obtenidos de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente. Dicho extracto se separó por medio de electroforesis en doble dimensión (2D-PAGE), posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa y se llevó a cabo un inmunoblot utilizando diferentes pool de sueros de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis (*Ascaris spp.*, *Cysticercus tenuicollis*, *T. saginata*, *Echinococcus spp.*) Se identificaron 13 manchas, las cuales fueron reconocidas exclusivamente por los sueros de cerdos cisticercosos (Fig. 3). Finalmente, se identificaron 7 proteínas por espectrometría de masas, que participan en diferentes procesos, de señalización, metabolismo, estrés y que forman parte del citoesqueleto. Dentro de las proteínas identificadas se reportó la proteína 14-3-3 de *T. solium* (Tabla 3).⁷³



Figura

3. Inmunoblot del extracto total de cisticercos de *T. solium* contra mezcla de sueros de cerdos cisticercosos. Los números indican las proteínas que se reconocieron de manera exclusiva por estos sueros⁷³

Tabla 3. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas		
Numero Spot	Proteína	Especie
Ts1_1	Alfa-1 tubulina	<i>Hirudo medicinalis</i>
Ts1_2	Beta-2 tubulina	<i>Echinococcus multilocularis</i>
Ts1_3	Proteína de choque térmico	<i>Taenia solium</i>
Ts1_4	Proteína de choque térmico	<i>Taenia solium</i>
Ts1_5	Proteína de choque térmico	<i>Taenia solium</i>
Ts1_6	Anexina B1	<i>Taenia solium</i>
Ts1_7	Anexina B1	<i>Taenia solium</i>
Ts1_8	Similar a alfa-tubulina	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
Ts2_9	Anexina B1	<i>Taenia solium</i>
Ts1_10	Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico	<i>Schistosoma mansoni</i>
Ts1_11	Tropomiosina 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>
Ts1_12	Proteína 14-3-3	<i>Echinococcus granulosus</i>
Ts1_13	Proteína 14-3-3	<i>Echinococcus multilocularis</i>

Tabla 3. Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas. Se muestra la proteína a la que corresponde cada uno de los spots reconocidos exclusivamente por sueros de cerdos cisticercosos (Tomada y modificada de Diaz-Masmela *et al.* 2014) ⁷³

Proteínas 14-3-3

El nombre a la familia de las proteínas 14-3-3 se les asignó debido a su patrón de elución y migración en cromatografía DEAE-Celulosa y electroforesis en gel de almidón. Las proteínas 14-3-3 eluyen en la 14^a fracción de homogeneizado de

cerebro bovino procedente de la columna DEAE-celulosa y en las fracciones de 3,3 en la electroforesis. ⁷⁵

Los miembros de la familia 14-3-3 son proteínas con un peso de 24-33 kDa y que pueden formar homó o heterodímeros. ⁷⁶⁻⁸⁰ Estos dímeros interactúan con sus ligandos uniéndose a residuos fosforilados de Serina y/o Treonina, mediante motivos RSXpSXP o RXXXpSXP (R: arginina, S: serina, X: cualquier aminoácido, pS: fososerina o fosfotreonina, P: prolina), el sitio de unión a estos fosfopéptidos está conservado en todas las proteínas 14-3-3 cuyos residuos son Lys 49, Arg 56, Arg 127 y Tyr 128 (en la proteína 14-3-3ζ humana). ⁸¹⁻⁸⁶

Las principales funciones que se han reportado para las proteínas 14-3-3 son la regulación de vías de transducción de señales que controlan los puntos de control del ciclo celular, activación de la MAP cinasa, la apoptosis y programas de expresión génica. ^{80,84,85,87,88}

Dentro de las especies más estudiadas se han reportado 7 isoformas de las proteínas 14-3-3 en el humano, en *Saccharomyces cerevisiae* 2 isoformas y en *Arabidopsis thaliana* 15 isoformas. ^{76,79,89}

Proteína 14-3-3 en parásitos.

Se ha reportado la expresión de proteínas 14-3-3 en diferentes parásitos como: *Plasmodium spp*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Eimeria tenella*, *Echinococcus granulosus*; entre otros. ^{88,90-95} En parásitos como *Echinococcus granulosus* y *Fasciola giganta* se ha propuesto utilizar como vacuna a la proteína 14-3-3, mientras que en *Echinococcus multicularis* y *Schistosoma mansoni* ya se han realizado estudios de este tipo dando un rango de protección de 25-97%. ^{88,94,96,97}

En *Taenia solium* el único reporte sobre proteínas 14-3-3 es la presencia de la misma en la superficie de las oncoesferas activadas. ⁹⁸

9. Justificación

Como se mencionó anteriormente el diagnóstico más certero para la NCC se basa en estudios de neuroimagen (tomografía axial y resonancia magnética), dichos estudios presentan un costo bastante elevado, por lo que resultan económicamente difíciles de cubrir por gran parte de los pacientes de los lugares endémicos para la enfermedad. Para el diagnóstico de la cisticercosis en el cerdo se utiliza el método de inspección lingual en búsqueda de cisticercos. Sin embargo, este método requiere de la sujeción del animal y de la participación de personal entrenado para este procedimiento. Este procedimiento, además de agresivo para el cerdo es un método tardado que limita su aplicación extensiva en los miles de cerdos de traspatio que habitan en la república mexicana, sin tomar en cuenta que esta técnica solo permite detectar aproximadamente a la mitad de los cerdos infectados.

Considerando las limitaciones en el diagnóstico descritas anteriormente, las técnicas de inmunodiagnóstico se utilizan para apoyar el diagnóstico de NCC humana y cisticercosis porcina. El inmunodiagnóstico se basa en la búsqueda de anticuerpos específicos o antígenos del parásito presentes en suero o LCR de sujetos infectados. En nuestro grupo de trabajo, se realizó un extracto total proteico de cisticercos de *T. solium* y se detectó que la proteína 14-3-3 diferenciaba sueros de cerdos cisticercosos, sanos y con otras parasitosis, debido a esto, en el presente trabajo utilizamos la proteína 14-3-3 como antígeno para identificar los anticuerpos presentes en muestras de suero de cerdos y sueros y LCR de humanos con NCC.

10. Hipótesis

La proteína 14-3-3 de *Taenia solium* contiene epítopes que son reconocidos de manera específica por sueros y LCR de pacientes con NCC y sueros de cerdos con cisticercosis.

11. Objetivos

11.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad diagnóstica de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium* para cisticercosis porcina y humana

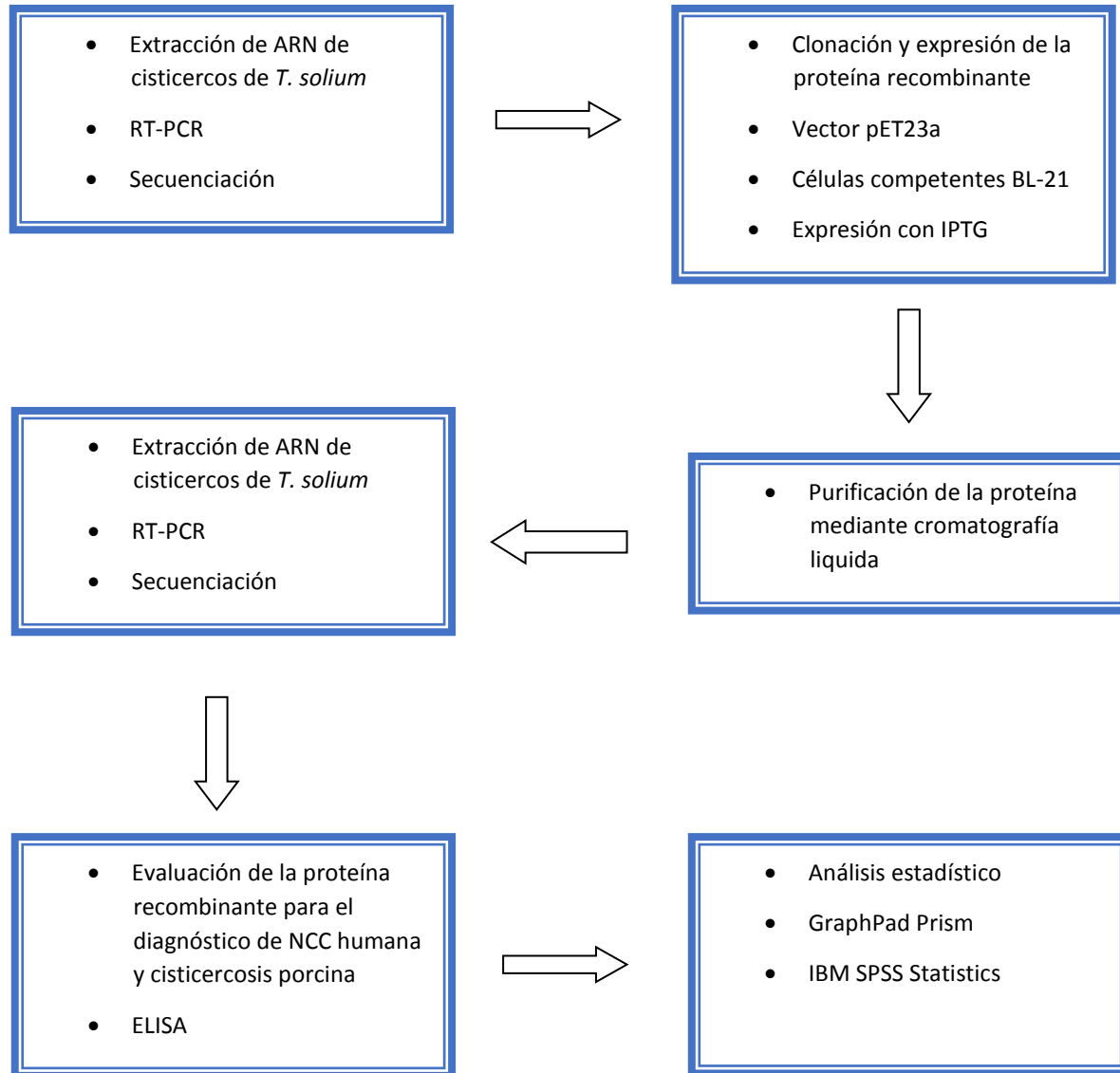
11.2. Objetivos específicos

Clonar, expresar y purificar la proteína 14-3-3 recombinante de *Taenia solium* para evaluar su potencial en el inmunodiagnóstico de cisticercosis humana y porcina.

Evaluar la capacidad de la proteína 14-3-3 recombinante de *Taenia solium* en el reconocimiento de sueros de cerdos cisticercosos y no cisticercosos

Evaluar la capacidad de la proteína 14-3-3 recombinante de *Taenia solium* en el reconocimiento de sueros y LCR de pacientes con NCC activa, NCC inactiva e individuos con otras enfermedades neurológicas

Metodología general



12. Metodología

12.1. Análisis bioinformático sobre la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

Se realizó una búsqueda en el genoma de *T. solium* para identificar los genes de la proteína 14-3-3. Se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con cada secuencia para identificar las proteínas con mayor homología para cada una de ellas. Así mismo utilizando el software Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) se alinearon las secuencias y se realizó una matriz de identidad, posteriormente se alinearon las secuencias de las proteínas 14-3-3 de *T. solium* junto con las de otros parásitos como *Taenia crassiceps*, *Echinococcus granulosus* y *E. multilocularis*, Además, se construyó una matriz de identidad de la secuencia de la proteína utilizada en este trabajo con las proteínas 14-3-3 de humano y de cerdo (hospederos).

12.2. Extracción de RNA de cisticercos de *Taenia solium*

El RNA_{total} se extrajo a partir de 3 cisticercos de *T. solium* obtenidos de músculo esquelético de un cerdo infectado de forma natural. Se adicionaron 500 µl de TRIzol® Reagent Invitrogen y se maceraron con ayuda de un embolo de jeringa estéril. El macerado se colocó en un tubo eppendorf y se le adicionó 500 µl más de TRIzol® Reagent Invitrogen y se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y colocó en un nuevo tubo eppendorf estéril y se le agregó 220 µl de cloroformo a 4°C e inmediatamente se resuspendió por inversión durante 15 segundos, a continuación se incubó por 5 minutos en hielo seco. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El RNA, presente en la fase acuosa, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se adicionaron 600 µl de Isopropanol, se agitó e incubó por 1 hora a -20°C.

Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y al precipitado (RNA) se le agregaron 300 µl de etanol al 80% para lavarlo, se agitó y se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado (RNA) se dejó secar aproximadamente durante 5 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet en 40 µl en agua DEPC y se guardó a -70°C hasta su uso.

12.3. Amplificación de la secuencia de la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

Partiendo del RNA_{total} de *T. solium*, se llevó a cabo la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína 14-3-3. Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos específicos para amplificar en su totalidad la secuencia de interés.

Forward

5´AATGGGTCGCGGATCCATGGCAGCTATTACTTCCTGG3´

Reverse

5´TGCTCGAGTGCGGCCGCGGAGTCAGTTTCACATTCGGA3´

La reacción de amplificación se hizo mediante una Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) con el kit SuperScript® III First-Strand Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El amplificado se corrió en un gel de agarosa al 1%, obteniendo una banda en el peso esperado. A partir del gel, se cortó la banda y purifiqué con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Clontech, según las instrucciones del fabricante.

Para verificar y confirmar que el amplificado era la secuencia que codifica la proteína 14-3-3 de *T. solium* se mandó a secuenciar.

12.4. Clonación de la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

Se puso a crecer un cultivo de 5 ml de bacterias *E.coli* XLBlue y se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep Kit según las instrucciones del fabricante para purificar el plásmido con el vector pET 23a.

Una vez purificado el plásmido se realizó una reacción de restricción para linearizar el vector, para esto se utilizaron las enzimas de restricción BamH1 y Not1.

Para la reacción de clonación se utilizó el kit In-Fusion® HD Cloning de Clontech® Laboratories, Inc. según las instrucciones del fabricante, en una relación 1:3 (vector: inserto).

La transformación bacteriana se llevó a cabo utilizando células *E. coli* HST08 Stellar Competent Cells de Clontech® Laboratories, Inc mediante el procedimiento de choque térmico a 42°C por 45 segundos, finalmente se plaquearon en medio agar LB + ampicilina (100 µg/ml), se dejaron incubando a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron 3 clonas de las bacterias crecidas, las cuales se utilizaron para corroborar que el gen de interés fue el que se clonó, para esto se realizó una reacción de restricción con las enzimas BamH1 y Not1 y poder observar la liberación del inserto clonado, este se purificó y se mandó a secuenciar.

12.5. Inducción de la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

Para llevar a cabo la expresión de la proteína recombinante 14-3-3 de *T. solium* se utilizaron células *E. coli* BL21, las cuales presentan la secuencia que codifica para la RNA polimerasa T7 que requiere el vector pET23a.

Las bacterias transformadas se sembraron en 100 ml de medio LB + ampicilina (100µg/ml) a 37°C con agitación constante (150 rpm) durante toda la noche. Se tomaron 50 ml del cultivo anterior y se agregaron a 1500 ml de medio LB + ampicilina (100µg/ml) y se dejó incubando a 37°C con agitación constante (150rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6. Una vez alcanzada la densidad óptica, se le adicionó el inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración 1mM y la inducción se llevó a cabo durante 6 horas. Al finalizar el tiempo de inducción, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en buffer de lisis (Tris HCl 50mM, NaCl 100mM, pH 8). Posteriormente las células se lisaron por medio de sonicación en hielo con 3 ciclos de 2 minutos cada uno, con pulsos de 20 segundos y 10 segundos de descanso. Una vez lisadas las células, estas se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se guardó a -70°C hasta su uso. La expresión de la proteína recombinante se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%.

12.6. Purificación de la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía líquida, utilizando la fracción soluble (sobrenadante) colectada a las 6 horas post-inducción con IPTG. Se utilizaron columnas HisTrap™ HP de GE Healthcare y el sistema de cromatografía líquida automatizado “AKTA™FPLC” de acuerdo a las instrucciones del fabricante, se colectaron distintas fracciones y se verificaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.

12.7. Identificación del tallo de Histidina de la proteína recombinante 14-3-3 mediante Western Blot

Con el propósito de verificar que el producto purificado contenía la proteína recombinante, la fracción soluble, en donde se encontraba la proteína 14-3-3 purificada, se corrió en un gel de poliacrilamida al 12% durante 80 minutos a 100 Voltios. Posteriormente, se transfirió a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante transferencia húmeda a 100 voltios durante 70 minutos. La membrana se bloqueó con albumina en buffer de fosfatos (PBS) al 3% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación, se incubó con un anticuerpo primario anti-HIS (Cell Signaling Technology USA) a una dilución 1:2000 en PBS-Tween 0.05% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se lavó 3 veces la membrana con PBS-Tween 0.05%, al terminar los lavados, se incubó con un anticuerpo secundario anti- ratón en una dilución 1:6000 en PBS-Tween 0.05% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0.05% y se reveló con Diaminobencidina.

12.8. Evaluación de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium* en su capacidad diagnóstica mediante ensayos de ELISA

Para la evaluación de la proteína recombinante, se utilizó la prueba de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para determinar la capacidad diagnóstica de detectar anticuerpos IgG en sueros y líquido cefalorraquídeo (LCR) de humanos con NCC activa, inactiva, y con otros desórdenes neurológicos. Así como también con sueros de cerdos cisticercosos, no cisticercosos y con otras parasitosis.

Se utilizaron 53 muestras de sueros de cerdos cisticercosos y 13 sueros de cerdos no cisticercosos.

En cuanto a las muestras de humanos se utilizaron muestras pareadas de suero y LCR. Se obtuvieron 26 muestras de NCC activa, 14 muestras de NCC inactiva y 29 muestras de otros desórdenes neurológicos (ODN). Adicionalmente se trabajaron 19 muestras de sueros de pacientes sanos, 25 muestras de sueros con NCC activa y 7 muestras de sueros de pacientes con otros desórdenes neurológicos.

Se hizo una recopilación de información clínica de los pacientes para identificar las características que presentaba cada uno de ellos, se obtuvieron datos sobre la carga parasitaria, localización y celularidad.

Para las pruebas de ELISA se utilizaron placas de 96 pozos (CORNING® Costar 3590), las cuales se sensibilizaron con 1µg/pozo de proteína recombinante a 4°C toda la noche con agitación constante. Posteriormente (y al final de cada paso) las placas se lavaron con 200 µl/pozo de PBS-Tween 0.05%. Las placas se bloquearon con 100 µl/pozo de BSA 1% en PBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. A continuación se adicionaron 100 µl de suero (dilución 1:100) o 40 µl de LCR a cada pozo y se dejaron incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se adicionaron 100µl de anticuerpo Anti-IgG de cerdo o humano (dependiendo el suero que se utilizó) acoplado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:8000, se dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Para finalizar se adicionaron 100 µl/pozo del sustrato Tetrametilbencidina (TMB) y se dejó incubar por 4 minutos, la reacción se detuvo con 100 µl/pozo de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) y se leyó la densidad óptica a 450 nm.

12.9. Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism 6 para graficar los resultados obtenidos de los ensayos de ELISA. Para la prueba de correlación de Spearman se utilizó el software IBM SPSS Statistics 23.

13. Resultados

13.1. Análisis Bioinformático de la proteína 14-3-3

La proteína identificada mediante espectrometría de masas fue la siguiente:

MAAITSWITDSGCKDHASLVSIKLAEQAERYEDMAVAMKTIAEMGNELNNEERNLLSVAYKNVVG
ARRSSWRIMSSIAKKQAGTPLADQTDIYLKKEEELTKICNDVLALLSKNLITEKIGAEAKIFYKMMG
DYRYLAEVQEGEQNDKSTEAEEAYQKATSLAEAEELSVTHPIRLGLALNFSVFYYEIKNMPEKACS
LAKAAFDAIAIEVDSIKDETYKDSTLIMQLLRDNLTLWNSECETDSX

Buscando la secuencia en el genoma de *T. solium*, dicha proteína se identificó como proteína 14-3-3 beta/alpha. Además de la esta, se identificaron 3 proteínas homologas en el genoma, que se identificaron como:

Proteína 14-3-3 épsilon

MATKSPREALLTKAKLAEQIERYYDDMAQFMHKIVDLNDESAPELTVEERNLLSVAYKNVIGARRSS
WRIISAIESKDEGNERVKNIRACREQVEKELKQMANEILSLEKTLIPRAQNADSKVFYYKMQGDYN
RYLAEIATASERDEVAKRSLDAYKVATDIGTAELQPTHPIRLGLALNFSVFYYEIMNKPQQACQIAKQ
AFDDAIAELDTLNEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWRSVDNDNDEAEKNSPEGDKRDX

Proteína 14-3-3

MSSLSKREENVYMAKLCEQCERYDEMVKAMKDVLESGADLTVEERNLLSVAYKNVVGARRSSWR
VISSIEQKHDGDAKMQIAKKVREEIEKELNATCREILDLLDKTLLPAASNSESKIFFLKMKGDYRYVA
EFCTGEERKQASDNSLTAYKAATDVAEADMQTTHPIRLGLALNFSVFYYEIMNPNKCRACELARKAF
DDAVAELDTLPEESYKDATLIMQLLRDNLTLWNSDTGDNDAAEQPKAEX

Proteína 14-3-3 zeta/delta

MADLLSTEWLKDPLKDRDSYVNTAKCLEQAERFDDMAVCMKEVTKFDKELNNEERNLLSVAFKN
VVGSRNSYRVLSSRLSRTQDPEKQALTKEYLDILQKELNAICSDVLQIEERLYPSCSNAEGKVFY
KKMMGDYRYKAENAKGEDHKQVVEASLKAYEEATEIANEKLSCSTHPIRLGLALNYSVFYYEIMNS
PDRACQLAKKAFDDAVSDVDSANDDSYKDSTLIMQLLRDNLALWTSDPREETENEGAEX

Se realizó un BLAST a cada una de las proteínas arrojando los siguientes resultados (Fig. 4)



Figura 4. BLAST realizado utilizando las 4 secuencias de la proteína 14-3-3 identificadas en el genoma de *T. solium*. A) 14-3-3 epsilon, B) 14-3-3, C) 14-3-3 Zeta/Delta y D) 14-3-3 Beta/Alpha. Las 4 proteínas de *T. solium* presentan una identidad mayor al 95% con proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* y *E. multilocularis*.

Como se observa, la proteína beta/alpha arroja un 100% de identidad con una proteína putativa de *T. solium* y un 99% con la proteína beta/alpha de *Echinococcus multilocularis*, mientras que las demás proteínas dan una mayor cobertura e identidad con proteínas 14-3-3 de *E. granulosus* seguido por *E. multilocularis*.

Se alinearon las 4 secuencias de aminoácidos (Fig. 5) de las proteína 14-3-3 de *T. solium* y se construyó una matriz para observar el porcentaje de identidad entre ellas.

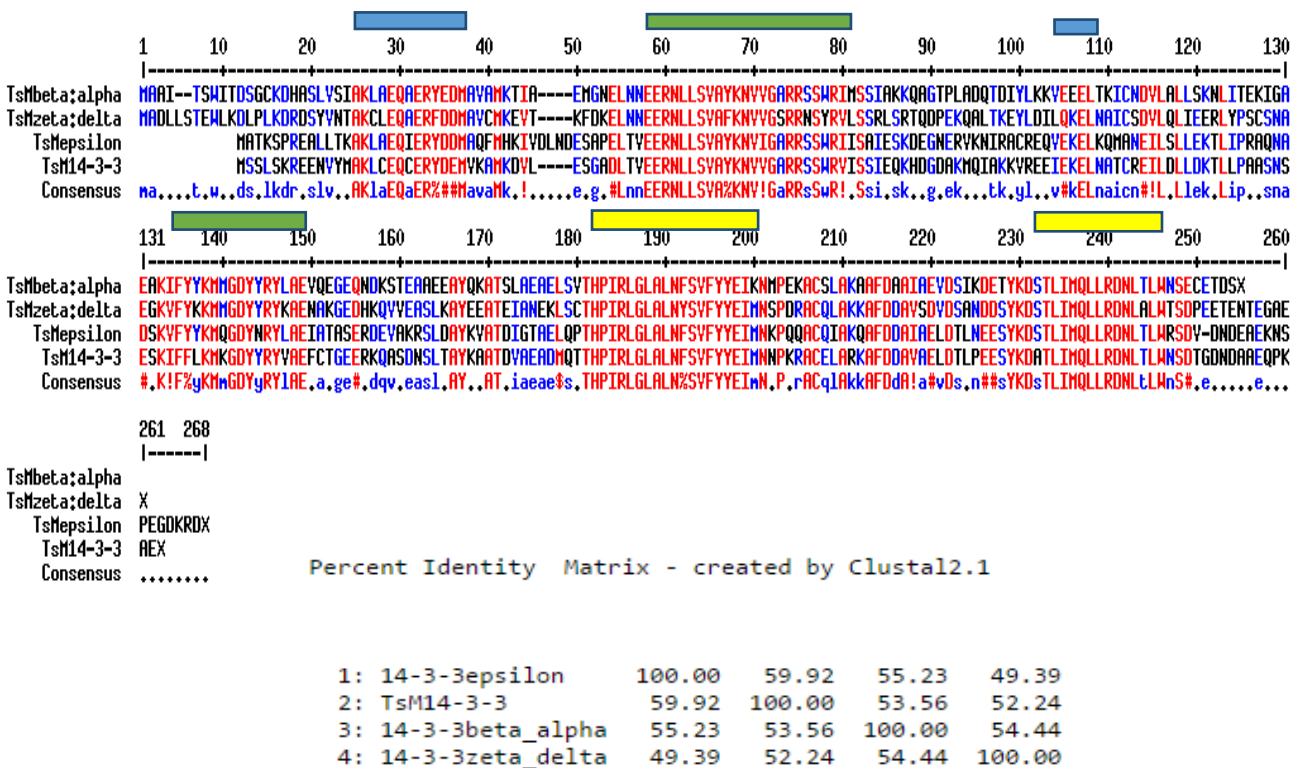
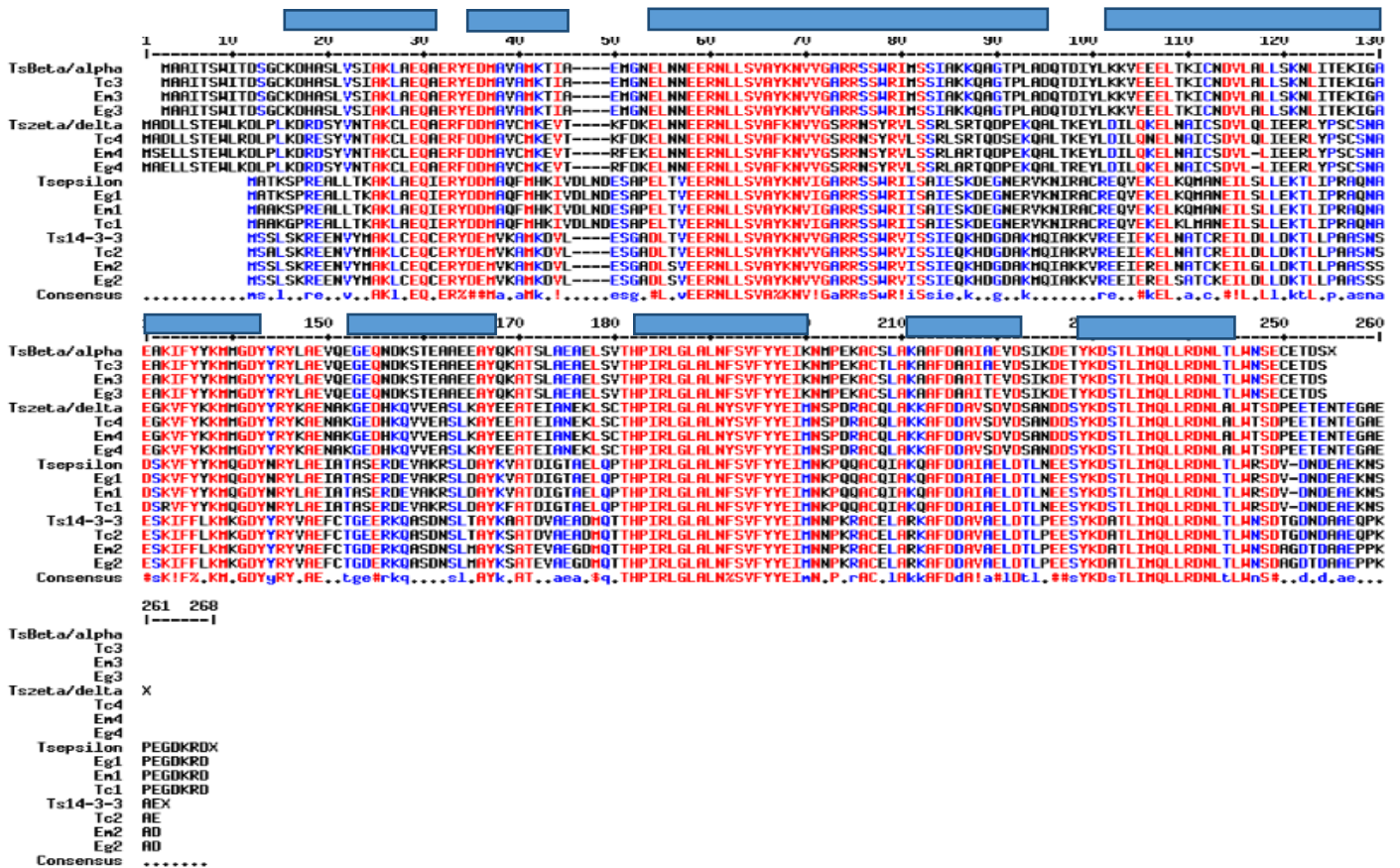


Figura 5. Alineación de las 4 proteínas 14-3-3 de *T. solium*, se observa que se conservan los dominios distintivos para la familia 14-3-3. La barra azul muestra la región involucrada en la formación de homo/heterodímeros, la barra verde identifica la región de unión del fosfopéptido ligando y la barra amarilla corresponde a la región de interacción de las cadenas laterales del fosfopéptido ligando con la proteína 14-3-3. La matriz muestra que las proteínas poseen en promedio 50% de identidad entre ellas.

De igual manera, se realizó una alineación de las proteínas 14-3-3 de *T. solium* y otras proteínas ortólogas de otros parásitos como *T. crassiceps*, *E. granulosus* y *E. multilocularis* (Fig. 6). Se observa que las proteínas se agrupan por isoformas con las que comparten un porcentaje mayor de identidad. Para la proteína 14-3-3 beta/alpha que utilizamos en este trabajo encontramos un 99.6% de identidad con proteínas de *E. granulosus* (*Eg3*), *E. multilocularis* (*Em3*) y *T. crassiceps* (*Tc3*).



Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: Em4	100.00	98.82	96.47	98.04	55.06	55.06	54.84	55.06	49.18	49.59	49.59	49.59	53.09	52.67	53.50	53.50
2: Eg4	98.82	100.00	96.86	98.43	55.47	55.47	55.24	55.47	50.00	50.41	50.41	50.41	52.26	51.85	52.67	52.67
3: Tc4	96.47	96.86	100.00	98.44	55.24	55.24	55.02	55.24	49.80	50.20	50.20	50.20	52.87	52.46	52.87	52.87
4: Tszeta/delta	98.04	98.43	98.44	100.00	55.24	55.24	55.02	55.24	49.59	50.00	50.00	50.00	52.24	51.84	52.65	52.65
5: Em3	55.06	55.47	55.24	55.24	100.00	100.00	99.60	99.19	55.23	55.23	55.23	55.65	52.30	52.30	53.14	53.56
6: Eg3	55.06	55.47	55.24	55.24	100.00	100.00	99.60	99.19	55.23	55.23	55.23	55.65	52.30	52.30	53.14	53.56
7: TsBeta/alpha	54.84	55.24	55.02	55.02	99.60	99.60	100.00	99.60	55.42	55.42	55.42	55.83	52.50	52.50	53.33	53.75
8: Tc3	55.06	55.47	55.24	55.24	99.19	99.19	99.60	100.00	55.65	55.65	55.65	56.07	52.72	52.72	53.56	53.97
9: Tc1	49.18	50.00	49.80	49.59	55.23	55.23	55.42	55.65	100.00	98.04	98.04	98.43	57.09	57.09	58.47	59.11
10: Tsepsilon	49.59	50.41	50.20	50.00	55.23	55.23	55.42	55.65	98.04	100.00	100.00	99.61	57.89	57.89	59.27	59.51
11: Eg1	49.59	50.41	50.20	50.00	55.23	55.23	55.42	55.65	98.04	100.00	100.00	99.61	57.89	57.89	59.27	59.51
12: Em1	49.59	50.41	50.20	50.00	55.65	55.65	55.83	56.07	98.43	99.61	99.61	100.00	57.89	57.89	59.27	59.92
13: Em2	53.09	52.26	52.87	52.24	52.30	52.30	52.50	52.72	57.09	57.89	57.89	57.89	100.00	99.19	94.33	93.93
14: Eg2	52.67	51.85	52.46	51.84	52.30	52.30	52.50	52.72	57.09	57.89	57.89	57.89	99.19	100.00	94.33	93.93
15: Ts14-3-3	53.50	52.67	52.87	52.65	53.14	53.14	53.33	53.56	58.47	59.27	59.27	59.27	94.33	94.33	100.00	98.79
16: Tc2	53.50	52.67	52.87	52.65	53.56	53.56	53.75	53.97	59.11	59.51	59.51	59.92	93.93	93.93	98.79	100.00

Figura 6. Alineación de 4 proteínas 14-3-3 de *T. solium* (*Ts*), 4 de *E. granulosus* (*Eg*), 4 de *E. multilocularis* (*Em*) y 4 de *T. crassiceps* (*Tc*). Se observa que se agrupan por isoforma. Las barras azules indican las regiones que forman las 9 hélices características de la familia. En la matriz se observa la identidad entre cada una de las proteínas.

También se realizó la alineación y matriz de identidad de la proteína 14-3-3 beta/alpha de *T. solium* con sus ortólogos de humano y cerdo (sus hospederos), la proteína de *T. solium* tiene una identidad de 61.18% con la de humano y 53.81% con la cerdo, así mismo observamos que solo se conservan las firmas de la familia 14-3-3 entre ellas (Fig. 7)

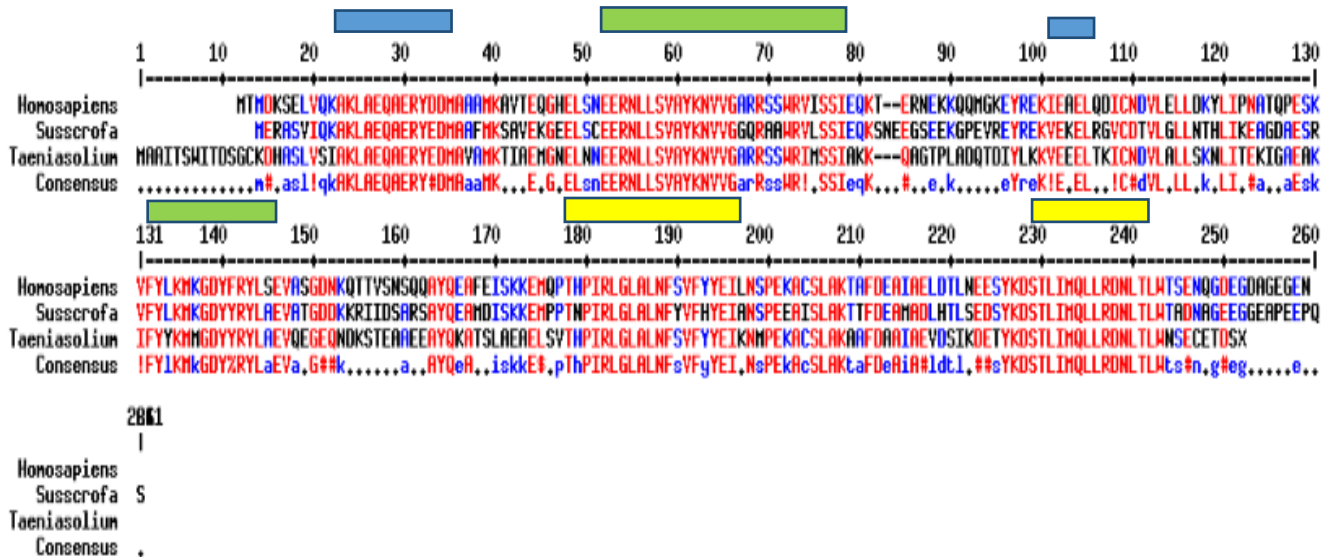


Figura 7. Alineación de las proteínas 14-3-3 de *T. solium*, *Homo sapiens* y *Sus scrofa*. Se observa que se conservan los dominios distintivos para la familia 14-3-3. La barra azul está por encima de la región involucrada en la formación de homo/heterodímeros, la barra verde identifica la región de unión del fosfopéptido ligando y la barra amarilla corresponde a la región de interacción de las cadenas laterales del fosfopéptido ligando con la proteína 14-3-3. La matriz muestra que las proteínas poseen entre 50% y 60% de identidad entre ellas.

13.2. Amplificación del gen que codifica para la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

Partiendo del RNA_{total} de cisticercos y los oligonucleótidos diseñados se realizó la RT-PCR. Se obtuvo un amplicon de aproximadamente 748 pb (Fig. 8). Dicho producto se mandó a secuenciar y se confirmó que el amplificado corresponde al gen de la proteína de interés (Fig. 9).

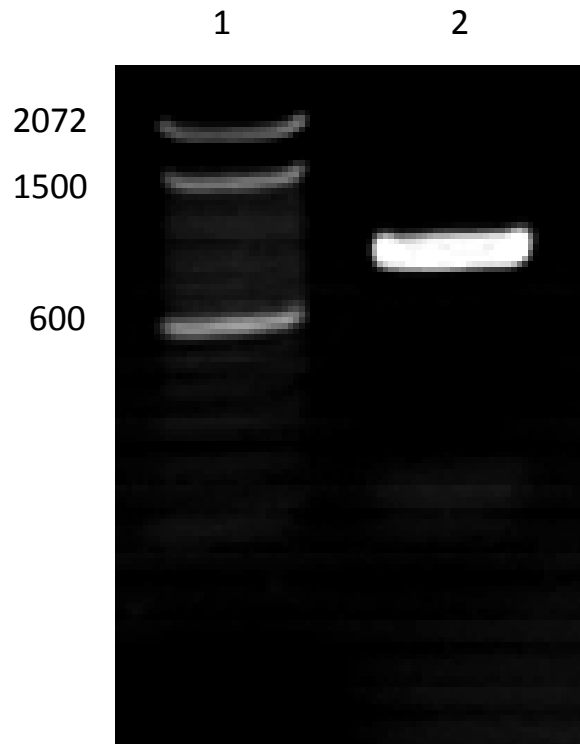


Figura 8. Gel de Agarosa 1%. Amplificación por RT-PCR del gen que codifica para la proteína 14-3-3 de *T. solium*. Carril 1: Marcador de tamaño molecular (100 pb), Carril 2: Producto amplificado 748 pb.

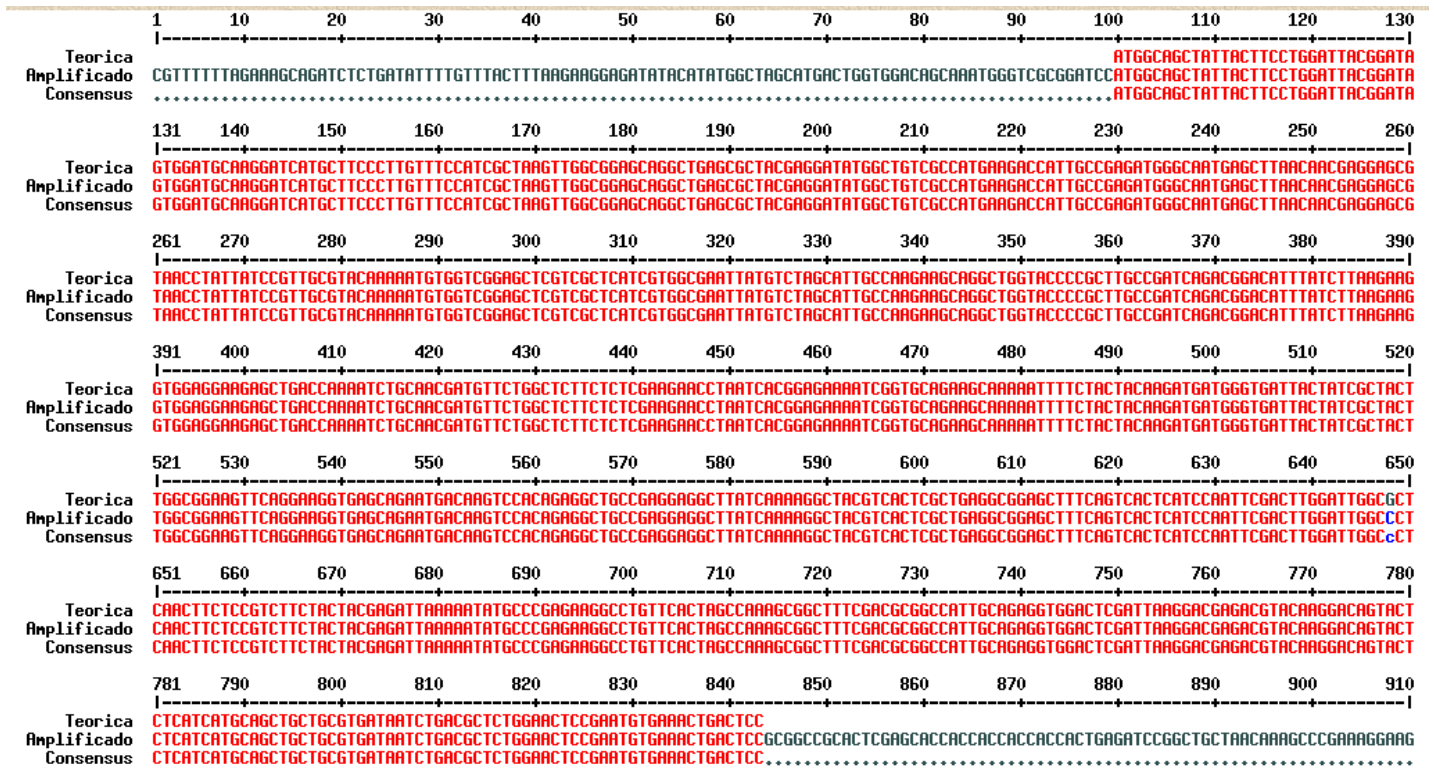


Figura 9. Alineación de la secuencia de la proteína 14-3-3 de *T. solium* y el amplificado por medio de RT-PCR, se observa que solo hay un cambio de una base G por C.

13.3. Clonación de la proteína 14-3-3 de *Taenia solium*

Para la clonación se utilizó el vector pET23a. La transformación bacteriana se llevó a cabo utilizando células *E. coli* HST08 Stellar Competent Cells mediante choque térmico y se plaquearon en caja de cultivo con agar y antibióticos, se seleccionaron 3 clonas y se purificó el ADN recombinante. Se realizó una doble restricción con las enzimas BamH1 y Not1 para observar la liberación del inserto que corresponde a la región codificante de la proteína 14-3-3 (Fig. 10). El vector recombinante se mandó a secuenciar y se confirmó la integridad de la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto que codifica para la proteína 14-3-3. Se observó un cambio de base de una G por C (Fig. 11).

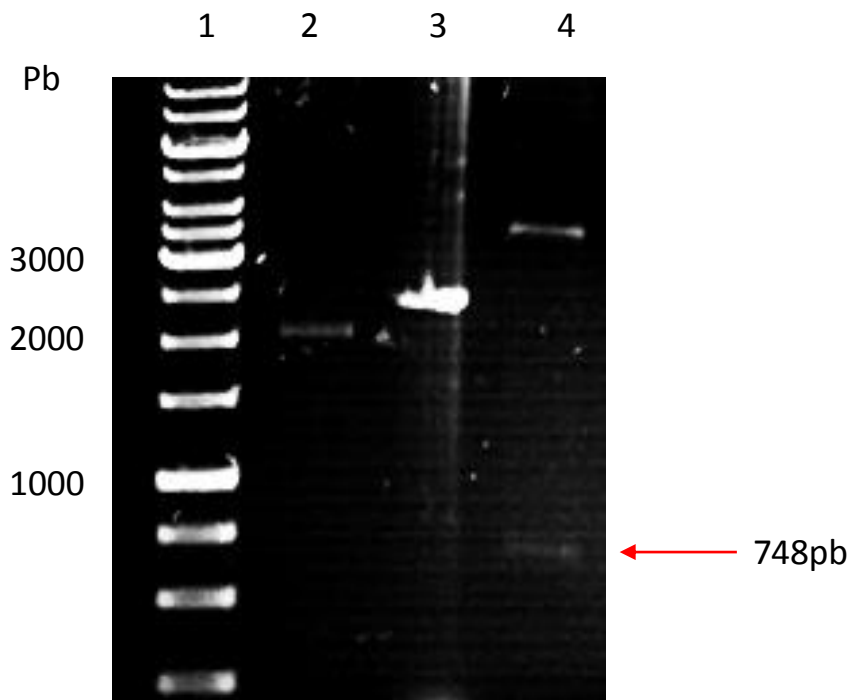


Figura 10. Gel de Agarosa 1%. Carril 1: marcador de tamaño molecular, carril 2: vector pET23a purificado, carril 3: vector pET23a más inserto (14-3-3), carril 4: vector pET23a después de la doble digestión con BamH1 y Not1, se observa la liberación del inserto en el tamaño esperado (748 pb).

14-3-3	-----
T7	gggatthttcctcctgaaataatthtttgthtaactthtaagaaggagatatacatatggcta
14-3-3	-----ATGGCAGCTATTACTTCCTGGATTA
T7	gcatgactggtggacagcaaatgggtcgcggatccATGGCAGCTATTACTTCCTGGATTA
14-3-3	CGGATAGTGGATGCAAGGATCATGCTTCCCTTGTTCCATCGCTAAGTTGGCGGAGCAGG
T7	CGGATAGTGGATGCAAGGATCATGCTTCCCTTGTTCCATCGCTAAGTTGGCGGAGCAGG
14-3-3	CTGAGCGCTACGAGGATATGGCTGTCGCCATGAAGACCATTGCCGAGATGGGCAATGAGC
T7	CTGAGCGCTACGAGGATATGGCTGTCGCCATGAAGACCATTGCCGAGATGGGCAATGAGC
14-3-3	TTAACAACGAGGAGCGTAACCTATTATCCGTTGCGTACAAAAATGTGGTCGGAGCTCGTC
T7	TTAACAACGAGGAGCGTAACCTATTATCCGTTGCGTACAAAAATGTGGTCGGAGCTCGTC
14-3-3	GCTCATCGTGGCGAATTATGTCTAGCATTGCCAAGAAGCAGGCTGGTACCCCGCTTGCCG
T7	GCTCATCGTGGCGAATTATGTCTAGCATTGCCAAGAAGCAGGCTGGTACCCCGCTTGCCG
14-3-3	ATCAGACGGACATTTATCTTAAGAAGGTGGAGGAAGAGCTGACCAAAAATCTGCAACGATG
T7	ATCAGACGGACATTTATCTTAAGAAGGTGGAGGAAGAGCTGACCAAAAATCTGCAACGATG
14-3-3	TTCTGGCTCTTCTCTCGAAGAACCTAATCACGGAGAAAATCGGTGCAGAAGCAAAAATTT
T7	TTCTGGCTCTTCTCTCGAAGAACCTAATCACGGAGAAAATCGGTGCAGAAGCAAAAATTT
14-3-3	TCTACTACAAGATGATGGGTGATTACTATCGCTACTTGGCGGAAGTTCAGGAAGGTGAGC
T7	TCTACTACAAGATGATGGGTGATTACTATCGCTACTTGGCGGAAGTTCAGGAAGGTGAGC
14-3-3	AGAATGACAAGTCCACAGAGGCTGCCGAGGAGGCTTATCAAAAGGCTACGTCACTCGCTG
T7	AGAATGACAAGTCCACAGAGGCTGCCGAGGAGGCTTATCAAAAGGCTACGTCACTCGCTG
14-3-3	AGGCGGAGCTTTCAGTCACTCATCCAATTCGACTTGGATTGGCgCTCAACTTCTCCGTCT
T7	AGGCGGAGCTTTCAGTCACTCATCCAATTCGACTTGGATTGGCcCTCAACTTCTCCGTCT
14-3-3	TCTACTACGAGATTAATAATATGCCCGAGAAGGCCTGTTCACTAGCCAAAGCGGCTTTCG
T7	TCTACTACGAGATTAATAATATGCCCGAGAAGGCCTGTTCACTAGCCAAAGCGGCTTTCG
14-3-3	ACGCGGCCATTGCAGAGGTGGACTCGATTAAGGACGAGACGTACAAGGACAGTACTCTCA
T7	ACGCGGCCATTGCAGAGGTGGACTCGATTAAGGACGAGACGTACAAGGACAGTACTCTCA
14-3-3	TCATGCAGCTGCTGCGTGATAATCTGACGCTCTGGAACCTCCGAATGTGAAACTGACTCC-
T7	TCATGCAGCTGCTGCGTGATAATCTGACGCTCTGGAACCTCCGAATGTGAAACTGACTCCg

Figura 11. Alineamiento de la secuencia de la proteína 14-3-3 de *T. solium* y el resultado de la secuenciación del vector recombinante.

13.4. Expresión de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium*

La inducción de la proteína recombinante 14-3-3 se llevó a cabo con IPTG 1mM, se tomaron muestras a diferentes tiempos post-inducción. Se observó que a las 6 horas era el tiempo óptimo de expresión de la proteína. Esto se verificó mediante geles de poliacrilamida al 12% donde también se observó que la proteína estaba en el peso molecular esperado (Fig. 12).

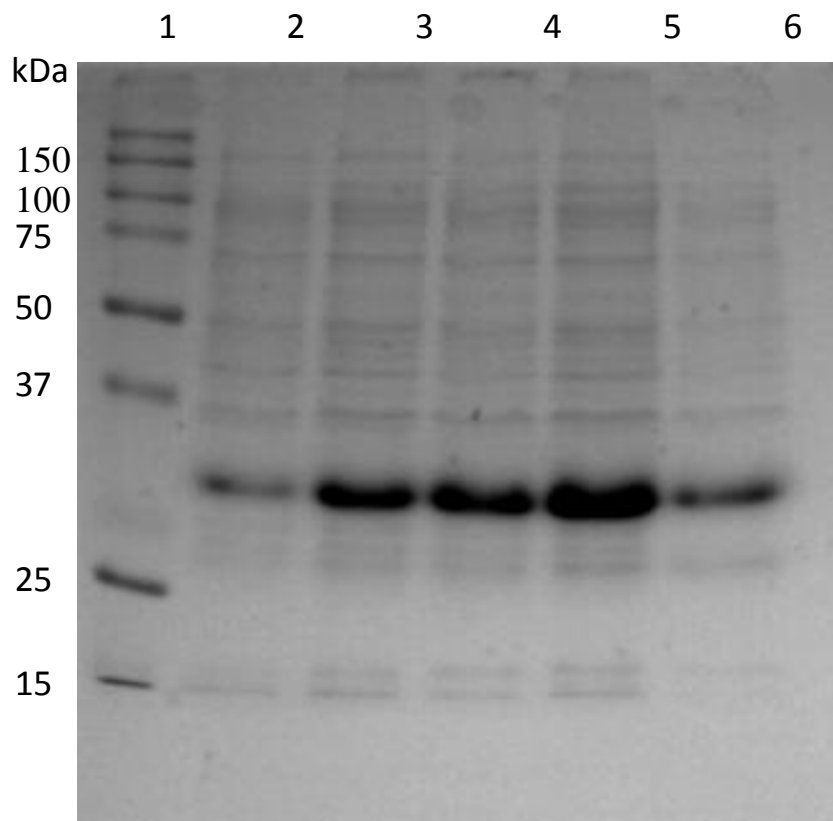


Figura 12. SDS-PAGE 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa), carril 2: sin IPTG, carril 3: 2 horas (Hrs) con IPTG, carril 4: 4 Hrs con IPTG, carril 5: 6 Hrs con IPTG, carril 6: 24 Hrs con IPTG. Se observa el peso de la proteína 14-3-3 de aproximadamente 30 kDa. Tinción de Plata

13.5 Purificación de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium*

Se realizó la purificación por medio del sistema de cromatografía líquida automatizado “ÄKTA™FPLC” con el cual se obtuvieron distintas fracciones, las cuales fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida para identificar en que fracciones estaba la proteína purificada (Fig. 13).

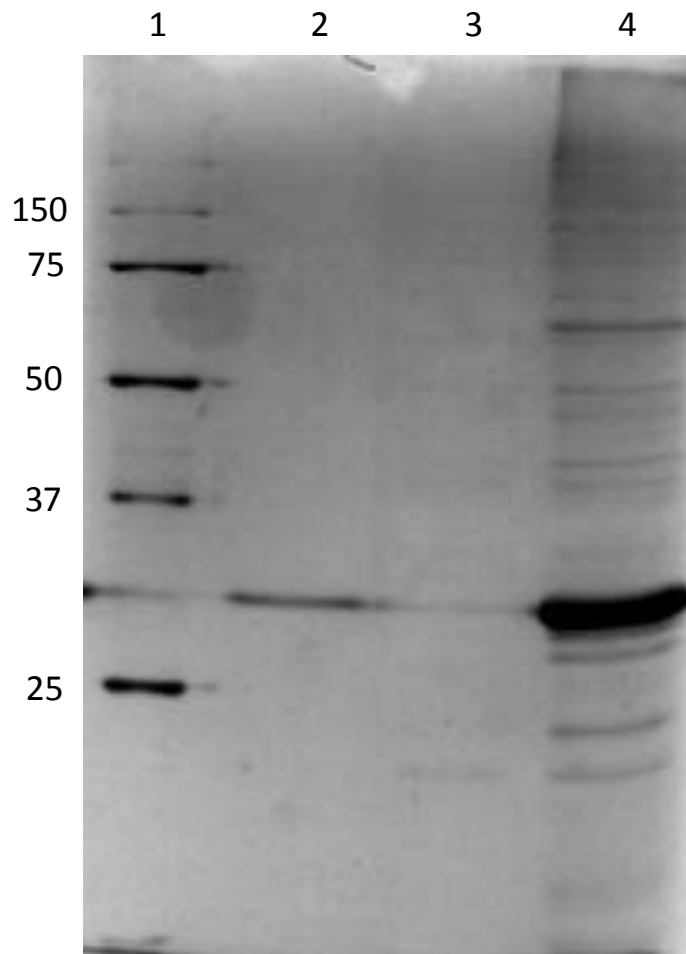


Figura 13. SDS-PAGE 12%. Purificación de la proteína recombinante 14-3-3. Carril 1: marcador de peso molecular (kDa), carril 2: fracción donde se encontraba la proteína purificada, carril 3: fracciones donde no se purifico la proteína, carril 4: muestra inicial. Tinción de plata.

13.7. Evaluación de la proteína recombinante 14-3-3 de *Taenia solium* en su capacidad diagnóstica mediante ensayos de ELISA

13.7.1. Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad inmunodiagnóstica de la proteína 14-3-3 de *T. solium* utilizando muestras de sueros de cerdos cisticercosos y no cisticercosos.

Para los ensayos de ELISA se utilizaron 53 muestras de sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* y 13 muestras de sueros de cerdos sanos (ambos confirmados por necropsia).

Los resultados muestran que la proteína 14-3-3 es capaz de diferenciar entre cerdos infectados y sanos con una sensibilidad de 88.67% y una especificidad de 100% (Fig. 14). El punto de corte (0.4101) se estableció como el promedio de las densidades ópticas (D.O.) de los controles de sueros de cerdos sanos más dos desviaciones estándar. Ningún suero de cerdo sano está por encima del punto de corte, mientras que de los sueros de cerdos cisticercosos, solo 6 no son reconocidos como positivos.

13.7.2. Ensayos de ELISA para evaluar la capacidad inmunodiagnóstica de la proteína 14-3-3 de *T. solium* utilizando muestras de sueros de pacientes con NCC negativa, NCC activa, NCC inactiva y otros desórdenes neurológicos

En el caso de los ensayos de ELISA utilizando muestras de humanos, se utilizaron muestras de suero y LCR. Se obtuvieron 51 muestras de suero con NCC activa, 14 sueros con NCC inactiva, 36 sueros con otros desórdenes neurológicos (ODN), 26 muestras de LCR con NCC activa, 14 muestras de LCR con NCC inactiva y 29 muestras de LCR con ODN.

En la Tabla 4 se muestra la información que se obtuvo de cada uno de los pacientes con los que se trabajó.

En cuanto a los ensayos de ELISA, se observa que la proteína rTs14-3-3 fue capaz de diferenciar entre sueros y LCR de pacientes con NCC inactiva, activa y con otros desórdenes neurológicos. Se determinó el punto de corte para las muestras de suero (0.1303) (Fig. 15) y muestras de LCR (0.1148) (Fig.16). Utilizando las muestras de suero se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 76.47% y 100% respectivamente. De las 29 muestras de suero de pacientes con ODN, 20 están por encima del punto de corte (68.9%), y de las 14 muestras de NCC inactiva 8 superan el punto de corte (57.14%). En cuanto a las muestras de LCR se obtuvo una sensibilidad de 76.92% y una especificidad de 100%, es de llamar la atención que solo una muestra de LCR de pacientes con otros desórdenes neurológicos está por encima del punto de corte (3.44%), así como 3 muestras de NCC inactiva superan el punto de corte (21.42%) a diferencia de lo obtenido con suero.

Se realizó una prueba de Spearman para ver si había correlación entre los resultados obtenidos con suero y LCR de pacientes con NCC activa, se obtuvo un valor de 0.356 para el coeficiente de correlación de Spearman y un valor de $p=0.074$, lo cual indica que no hay una tendencia de correlación entre los valores obtenidos con suero y LCR de pacientes con NCC activa (Fig. 17).

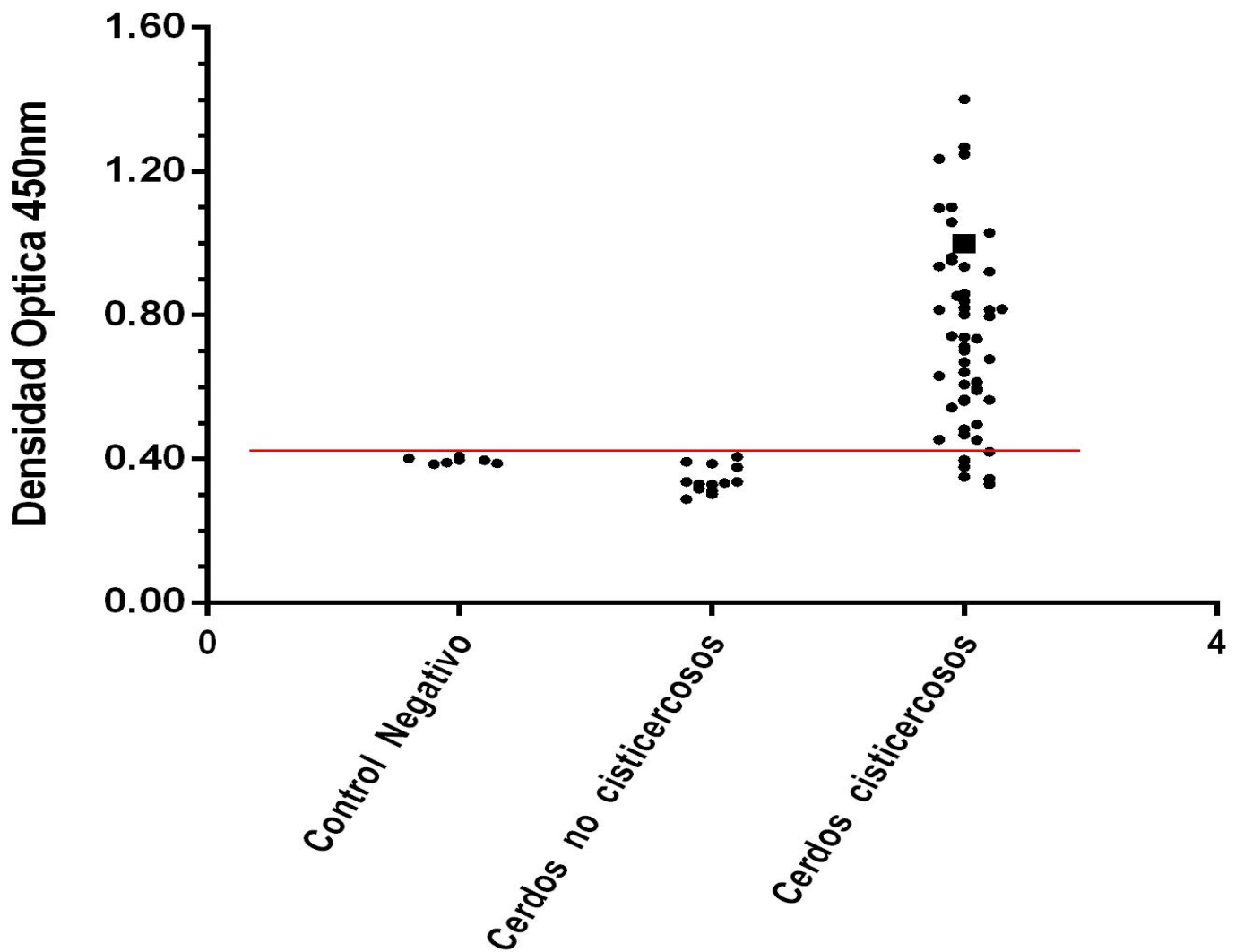


Figura 14. Gráfica de dispersión que muestra los valores de densidad óptica (D.O.) de las pruebas de ELISA utilizando muestras de cerdos cisticercosos (positivos) y no cisticercosos (negativos). La línea roja representa el punto de corte = 0.4101 (promedio de D.O. de sueros negativos más 2 desviaciones estándar).

Tabla 4. Muestras de suero y LCR de pacientes con NCC activa

Muestra	Sexo	D.O. sueros	D.O. LCR	Celularidad	# parásitos	Localización
1	M	0.0880	0.3100	256	Múltiples	Subaracnoideo
2	M	0.1231	0.3012	341	Múltiples	Mixto
3	M	0.1003	0.1093	23	Múltiples	Mixto
4	M	0.1826	0.0947	5	Múltiples	Mixto
5	M	0.1084	0.3287	149	Múltiples	Mixto
6	M	0.6178	0.1652	32	Múltiples	Subaracnoideo
7	M	0.1127	0.1216	0	Múltiples	Subaracnoideo
8	F	0.5475	3.0296	154	Múltiples	Mixto
9	F	0.1729	0.1011	86	Múltiples	Subaracnoideo
12	M	0.3281	0.7174	6	Múltiples	Mixto
614	F	0.2022	0.1607		Múltiples	Subaracnoideo
646	M	0.3405	0.1470		Múltiples	Subaracnoideo
685	M	0.1714	0.1226	12	Múltiples	Intraventricular
698	F	0.1887	0.1837		Múltiples	Subaracnoideo
700	F	0.1661	2.1999	36	Múltiples	Subaracnoideo
705	M	0.2297	0.1080	15	Múltiples	Subaracnoideo
712	F	0.1421	2.6694	154	Múltiples	Intraventricular
719	M	1.2364	0.3991		Múltiples	Intraventricular
720	M	0.1477	0.3051	341	Múltiples	Parénquima y Subaracnoideo
743	M	0.5340	0.2503		Múltiples	Subaracnoideo
747	M	0.1293	0.1051	39	Múltiples	Parénquima y Subaracnoideo
752	F	0.1601	0.0446	0	Múltiples	Parénquima
792	F	0.7444	1.3527	341	Múltiples	Subaracnoideo
797	F	0.5436	2.3671	101	Múltiples	Parénquima y Subaracnoideo
648	F	0.6654	1.0468		Múltiples	Subaracnoideo
706	M	0.4155	0.8844		Múltiples	Parénquima y Subaracnoideo

La tabla 4 continua en la siguiente pagina

Tabla 4. Muestras de sueros y LCR de pacientes con NCC activa

Muestra	D.O. suero	D.O. LCR	Celularidad	# parásitos	Localización
10	0.3667			Múltiples	Mixto
11	0.1468			Múltiples	Mixto
1.1	0.1168			Múltiples	Mixto
2.1	0.9754			Múltiples	Mixto
3.1	0.1660			Múltiples	Mixto
4.1	0.2951			Múltiples	Subaracnoideo
5.1	0.1775			Múltiples	Mixto
6.1	0.1103			Múltiples	Mixto
7.1	0.1475			Múltiples	Mixto
8.1	0.1238			Múltiples	Mixto
713	0.3503			Múltiples	Subaracnoideo
688	0.1444			Múltiples	Subaracnoideo y ventrículos
1J	0.2320				
2J	0.1222				
3J	0.3370				
4J	0.1293				
5J	0.2214				
6J	0.2155				
7J	0.1550				
8J	0.1741				
9J	0.3655				
10J	0.1765				
11J	0.2979				
12J	0.2519				
13J	0.1195				

Tabla 4. Información de las muestras utilizadas para los ensayos de ELISA. Se muestra la densidad óptica para cada una de las muestras de suero y LCR, así como la celularidad, carga parasitaria y localización en el SNC. Los espacios en blanco se deben a que no se tenía la información completa del paciente.

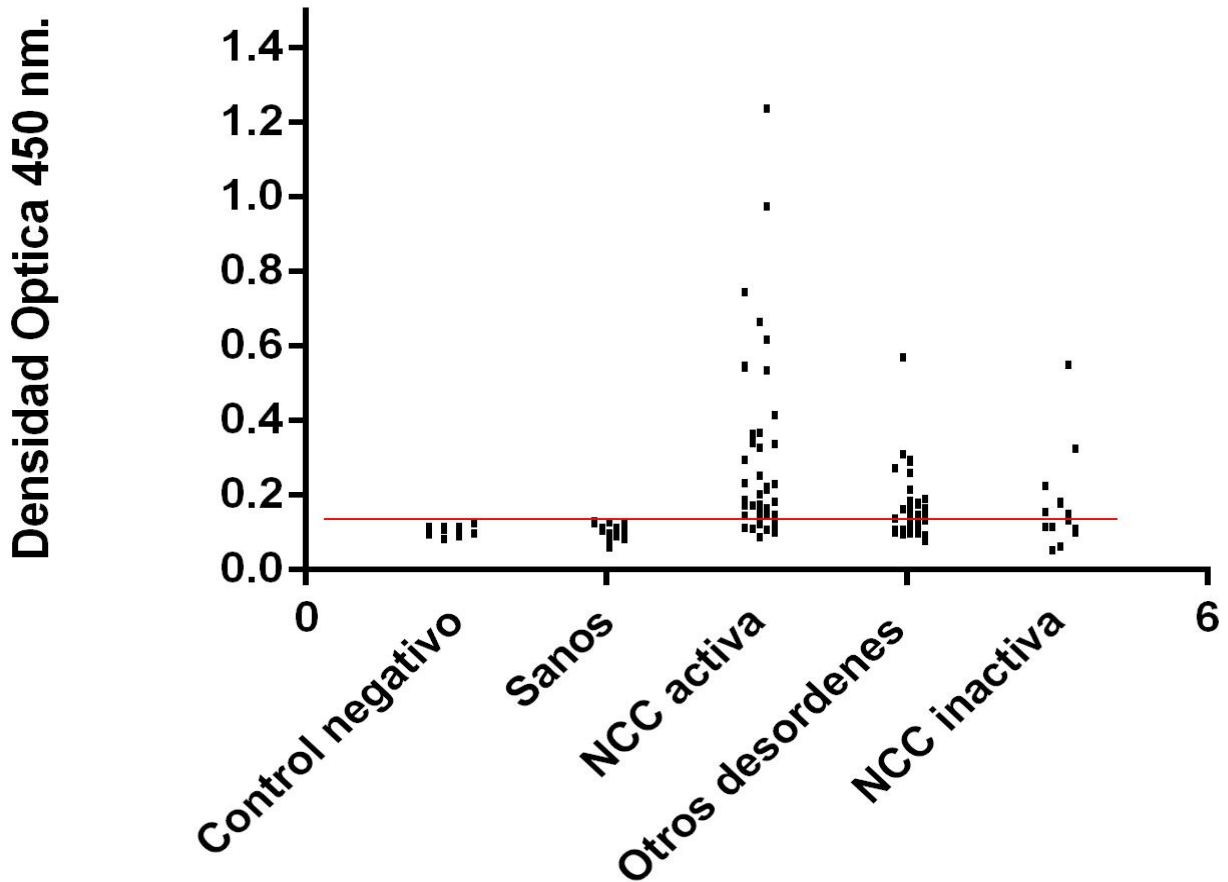


Figura 15. Gráfica de dispersión que muestra los valores de densidad óptica de las pruebas de ELISA utilizando muestras de suero de personas sanas, pacientes con NCC activa, NCC inactiva y con otros desórdenes neurológicos. La línea roja representa el punto de corte (promedio de D.O. de control negativo más 2 desviaciones estándar)

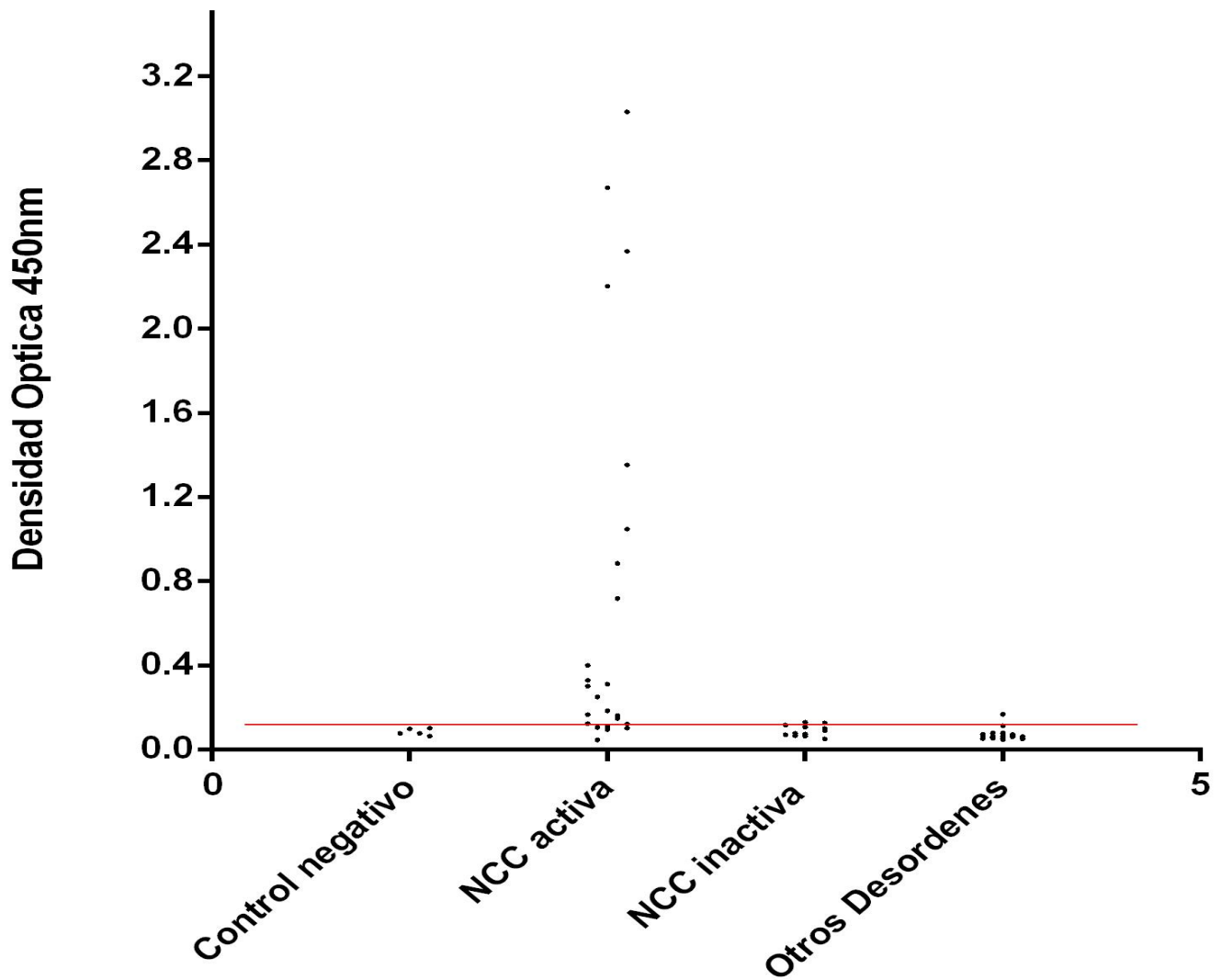


Figura 16. Gráfica de dispersión que muestra los valores de densidad óptica de las pruebas de ELISA utilizando muestras de LCR de pacientes con NCC activa, NCC inactiva y con otros desórdenes neurológicos. La línea roja representa el punto de corte (promedio de D.O. de control negativo más 2 desviaciones estándar)

Correlaciones

			Suero	LCR
Rho de Spearman	Suero	Coefficiente de correlación	1.000	.356
		Sig. (bilateral)	.	.074
		N	26	26
LCR	LCR	Coefficiente de correlación	.356	1.000
		Sig. (bilateral)	.074	.
		N	26	26

Figura 17. Se realizó una prueba de Spearman para conocer el grado de correlación de los resultados obtenidos utilizando sueros y LCR de pacientes con NCC activa. Se obtuvo un valor de correlación de 0.356 y $p=0.074$, lo que indica que no existe ninguna correlación entre los resultados obtenidos.

Previamente en nuestro equipo de investigación se evaluó la capacidad diagnóstica de las proteínas recombinantes Anexina B1 y Cinasa dependiente de AMPc, utilizando muestras de sueros de cerdos⁹⁹. Los resultados obtenidos en el anterior trabajo se compararon con los obtenidos en presente trabajo con la proteína 14-3-3 de *T. solium* (Tabla 6)

Tabla 6. Reconocimiento por parte de las distintas proteínas recombinantes de *T. solium*

Muestras	Anexina B1	Cinasa dependiente de AMPc	14-3-3
Sueros de cerdos cisticercosos	37% (16/43)	26% (11/43)	88.6% (47/53)
Sueros de cerdos no cisticercosos	2.3% (1/44)	4.6% (2/44)	0% (0/13)
Sueros de humanos con NCC	58% (15/26)	35% (9/26)	76.9% (20/26)
Sueros de humanos sanos	6% (1/16)	0% (0/16)	0% (0/19)

Tabla 6. Se comparó el porcentaje de reconocimiento de las distintas proteínas recombinantes evaluadas en nuestro grupo de trabajo. Se observa que la proteína recombinante 14-3-3 presenta un mejor reconocimiento de los sueros de cerdos cisticercosos y humanos con NCC.

14. Discusión

La fase larvaria de *T. solium* es la causante de la cisticercosis porcina y humana, en este último, cuando se localiza en el SNC causa la neurocisticercosis. En el cerdo, la cisticercosis se diagnostica mediante el método de inspección lingual, el cual es un método poco sensible, permitiendo identificar menos de la mitad de cerdos infectados. En el caso del humano, el diagnóstico de la NCC se basa en técnicas de neuroimagen apoyados en la clínica del paciente, sin embargo, estas técnicas no están al alcance de todos los pacientes, además la NCC presenta un cuadro clínico muy heterogéneo lo que dificulta aún más el diagnóstico.^{38,72,100} Debido a las dificultades mencionadas, se han desarrollado nuevas estrategias para mejorar el diagnóstico; apoyado en herramientas inmunológicas, se ha propuesto el uso de proteínas recombinantes como antígenos en búsqueda de anticuerpos, ya sea en suero o LCR.^{50,51,53,64-66}

En el presente trabajo se evaluó la capacidad inmunodiagnóstica de la proteína recombinante 14-3-3 (rTs14-3-3) del cisticerco de *Taenia solium*. Esta proteína fue seleccionada considerando que en un estudio piloto se demostró que era reconocida de manera específica los sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* y no a los sueros de cerdos infectados con otros parásitos⁷³. Adicionalmente, Santibañez *et al.* reportaron la expresión de dicha proteína en toda la superficie de la oncosfera activada de *T. solium*.⁹⁸

Se realizó un estudio bioinformático sobre las proteínas 14-3-3; buscando en el genoma de *T. solium* encontrando que habían otras 3 proteínas homólogas a la reportada en nuestro grupo de trabajo⁷³. Las secuencias de aminoácidos de dichas proteínas fueron alineadas observando que conservan las secuencias características de la familia de proteínas 14-3-3. La identidad entre ellas fue en promedio de 55% (Fig. 8).

Adicionalmente se alinearon las secuencias de las proteínas 14-3-3 de *T. solium* y las secuencias de proteínas 14-3-3 homólogas presentes en otros parásitos como *E. granulosus*, *E. multilocularis* y *T. crassiceps*, se observa que se agrupan por

isoformas y que entre isoformas presentan una gran identidad; sin embargo, esto no sería un gran problema para el uso de la proteína rTs14-3-3 para el diagnóstico de la NCC ya que *T. crassiceps* no infecta humanos y la prevalencia de *E. granulosus* y *E. multilocularis* en México es prácticamente nula, ¹⁰¹⁻¹⁰³ en cuanto a el diagnóstico en cerdos se ha reportado que la proteína 14-3-3 no da reacción cruzada con sueros de cerdos infectados con *Echinococcus* spp, *T. saginata* , *Ascaris* spp y *T. hydatigena*.⁷³

La capacidad inmunodiagnóstica de la proteína rTs14-3-3 se evaluó mediante la técnica de ELISA. Los resultados obtenidos muestran que la proteína rTs14-3-3 es capaz de diferenciar entre sueros de cerdos cisticercosos y no cisticercosos, así como de entre sueros y LCR de humanos con NCC activa, inactiva y con otros desórdenes neurológicos como se observó en las figuras 19-21.

En el caso de los sueros de cerdos, el punto de corte (0.4101) se obtuvo como el promedio de la densidad óptica de los sueros de cerdos sanos más dos desviaciones estándar. El alto valor del punto de corte obtenido podría resultar de que los cerdos no cisticercosos incluidos en el estudio, provenían de medio rural y pudieron haber estado en contacto con el parásito. Así mismo, de los 53 sueros de cerdos cisticercosos, 6 no presentaron anticuerpos contra la proteína rTs14-3-31. El estado inmunológico y nutricional de los cerdos, la carga parasitaria y lugar de infección podrían explicar la ausencia de anticuerpos. Es también factible que no la proteína no sea inmunogénica para todos los cerdos infectados.

En el caso de pacientes con NCC, se evaluaron muestras de suero y LCR. Al igual que en los casos de cisticercosis porcina, también se observó una heterogeneidad inmunológica en los pacientes con NCC, para el punto de corte de los sueros se utilizaron los sueros de control negativo (personas sanas) (corte= 0.1303) y en el caso de LCR se utilizaron las muestras de pacientes con otros desórdenes neurológicos (corte=0.1148). En el caso de los sueros, ninguna de las muestras de pacientes sanos pasaron el punto de corte, mientras que de las muestras de NCC activa 12 sueros no fueron reconocidos como positivos y de las 29 muestras de

suero de pacientes con ODN, 20 están por encima del punto de corte. En cambio con las muestras de LCR se obtuvo una sensibilidad de 76.92% y una especificidad de 100%.

Estos resultados pueden deberse a la heterogeneidad de la enfermedad misma, lo que nos llevó a analizar la base de datos para ver qué características compartían tanto los sueros como el LCR de los pacientes con NCC activa que no fueron reconocidos como positivos. Las muestras presentaron características como la presencia de múltiples parásitos y localización en parénquima y espacio subaracnoideo, es decir, presentaban características que no permitieron agruparlas y ver algún patrón del por qué no hubo reconocimiento. Analizando la base de datos, se encontró que las muestras de LCR que mayor absorbancia presentaban eran aquellas que presentaban una mayor celularidad (mayor a 0.5 se considera un líquido inflamatorio).¹⁰⁴

Así mismo, en el presente trabajo no se observó relación alguna en cuanto a que el reconocimiento de sueros y LCR de humanos con NCC estuviera afectado por la carga parasitaria o la localización, ya que observamos que hubo muestras no reconocidas como positivos y que presentaron múltiples parásitos en parénquima y espacio subaracnoideo al igual que las muestras que si fueron reconocidas como positivas y que compartían las mismas características.

En cuanto a las muestras de pacientes con NCC inactiva, solo 3 muestras de LCR están por encima del punto de corte, mientras que 7 muestras de suero sí pasan dicho corte. Este resultado puede explicarse porque, como se ha mencionado, los anticuerpos persisten como anticuerpos memoria y debido a que hay mayor concentración de anticuerpos en suero que en LCR, nos da mayor densidad optica en las muestras de suero.^{105,106} Utilizando las muestras de pacientes con otros desórdenes neurológicos, solo una muestra de LCR está por encima del punto de corte, el diagnóstico para dicho paciente fue de neuromielitis óptica, mientras que 20 muestras de sueros de pacientes con otros desórdenes están por encima del punto de corte. Esto es de gran relevancia ya que se utilizaron algunas muestras pareadas y con el uso de LCR se observa una considerable ventaja para

discriminar entre los que presentan NCC u ODN ya que pacientes que con suero resultaban como positivos a NCC, con el LCR se catalogaban como negativos. Es decir, el uso del LCR permite una mejor diferenciación entre pacientes con NCC y otros desórdenes neurológicos a diferencia de lo observado con suero.

Se han reportado trabajos en los cuales se menciona que generalmente se obtendrá una reacción cruzada cuando la técnica de inmunodiagnóstico se aplica a un grupo grande y heterogéneo de pacientes con distintos desórdenes neurológicos y que sean originarios de un área endémica de cisticercosis.^{107,108} ya que se puede presentar el fenómeno de difusión de epítopes o “epitope spreading”, el cual menciona que una respuesta inmune típica contra una proteína suele centrarse en uno o dos epítopes dentro de esa proteína, que se denominan epítopes dominantes. La difusión de epítopes se define como la diversificación de la especificidad del epítope de la respuesta inicial a los epítopes subdominantes de la proteína o auto-epítopes, es decir, los anticuerpos se unirán a epítopes subdominantes y no sólo al dominante; este fenómeno se observa frecuentemente en enfermedades autoinmunes o con procesos inflamatorios crónicos.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Teniendo en cuenta lo anterior, las muestras de sueros y LCR de personas con otros desórdenes neurológicos que evaluamos en este trabajo provienen de pacientes con enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple o que presentan un proceso de inflamación crónica como neuromielitis óptica, por lo cual generan anticuerpos dirigidos a diversos epítopes que pueden reconocer regiones de la proteína rTs 14-3-3.

También se realizó una prueba de Spearman para ver si existía algún grado de correlación entre las muestras de suero y LCR que fueron positivas, encontramos un coeficiente de correlación (R) de 0.356 y $p=0.074$, lo que indica que no existe ninguna correlación entre los resultados obtenidos, es decir, si aumenta la absorbancia obtenida con LCR no necesariamente debe aumentar o disminuir la de los sueros, ya que se comportan como variables independientes. Sin embargo, esto puede deberse a que nuestro número de muestras es pequeño y por lo tanto no tiende a distribuirse de manera normal, por lo que lo ideal sería obtener un

mayor número de muestras y repetir el estadístico para observar su comportamiento.

Cabe mencionar que tanto el reconocimiento por parte de sueros de cerdos como suero y LCR de humanos se puede ver afectado debido a que la proteína utilizada en este trabajo se clonó y expresó en un sistema bacteriano el cual no permite las modificaciones postraduccionales, las cuales pueden tener un papel importante para el reconocimiento por parte de los anticuerpos de los hospederos, por lo cual sería interesante expresar esta proteína en algún sistema donde si se puedan llevar a cabo estas modificaciones para ver si mejoran la sensibilidad y especificidad.

En nuestro grupo de investigación se ha trabajado con otras proteínas recombinantes y sus péptidos para el inmunodiagnóstico de cisticercosis porcina y humana, se utilizaron las proteínas Anexina B1 y Cinasa dependiente de AMP cíclico ⁹⁹ las cuales previamente habían sido identificadas y propuestas como posibles blancos para el inmunodiagnóstico de cisticercosis. ⁷³ En dicho estudio previo se utilizaron muestras de sueros de cerdos cisticercosos no cisticercosos y de sueros de cerdos con otras parasitosis, se probaron con péptidos de anexina B1 de los cuales el mejor de los péptidos reconoció el 37% de los sueros de cerdos positivos. Al utilizar la proteína recombinante Anexina B1 el 36% de los sueros de cerdos positivos fueron reconocidos como tal. ⁹⁹

También se evaluaron 5 péptidos de la proteína cinasa dependiente de AMPc e igualmente el mejor péptido reconoció solo el 37% de los sueros, mientras que con la proteína recombinante Cinasa dependiente de AMPc sólo hubo un reconocimiento del 26%. ⁹⁹ Mientras que con los sueros de cerdos no cisticercosos los péptidos de ambas proteínas permitieron discriminar en promedio un 95% de las muestras.

Recientemente se publicó un trabajo en el cual utilizaban la proteína Cinasa dependiente de AMPc para el diagnóstico de cisticercosis porcina, utilizaron 50 cerdos que infectaron con 3000 huevos de *T. solium*, los autores reportan una sensibilidad de 93.88% y unas especificidad de 96.40%. ¹¹² A diferencia de los

resultados obtenidos con los péptidos y proteínas recombinantes (Anexina B1 y Cinasa dependiente de AMPc) con la proteína rTs 14-3-3 se obtuvo una sensibilidad del 88.67% y una especificidad de 100%, lo cual sugiere que la rTs 14-3-3 puede ser un gran candidato para el inmunodiagnóstico.

También se evaluó la capacidad diagnóstica de las proteínas Anexina B1 y Cinasa dependiente de AMPc utilizando muestras de sueros de humanos sanos, con NCC activa y con otros desórdenes neurológicos. La Anexina B1 presentó un reconocimiento del 58 % de los sueros con NCC y 94% de los sueros de pacientes sanos; mientras que la Cinasa dependiente de AMPc reconoció un 35% los sueros positivos y un 100% de los sueros negativos.⁹⁹ Nuestros resultados utilizando la proteína rTs14-3-3 muestran una mayor sensibilidad y especificidad (76.92% y 100% respectivamente) utilizando sueros, mientras que utilizando muestras de LCR se obtuvo una sensibilidad de 69.23% y una especificidad de 100%.

Cabe resaltar que a diferencia de los trabajos publicados^{99,112} en el presente trabajo obtenemos un 100% en cuanto a la discriminación entre los sueros de cerdos negativos, sueros de humano sanos y LCR de pacientes con NCC, lo que resulta de gran importancia ya que nos permitiría catalogar y diagnosticar a los pacientes negativos como tal.

Los resultados generados a partir de este trabajo aportan información relevante en cuanto al diagnóstico de la cisticercosis porcina y humana, ya que la proteína rTs 14-3-3 podría ayudar a la optimización del diagnóstico, así como ser útil para el seguimiento de pacientes tratados por NCC y estudios de seroprevalencia. También se observó que al utilizar la rTs 14-3-3 con LCR de pacientes con otros desórdenes neurológicos no se presentó ninguna reacción cruzada a diferencia de lo que se obtiene al utilizar sueros, esto resultaría muy útil en el diagnóstico.

Es factible que la combinación de antígenos recombinantes logre aumentar la capacidad predictiva de ensayos inmunodiagnósticos. Este trabajo contribuye a este objetivo.

Conclusiones

- La proteína 14-3-3 de *T. solium* contiene epítomos que son reconocidos por sueros y LCR de pacientes con NCC activa, y por sueros de cerdos cisticercosos
- Se clonó, expresó y purificó la proteína recombinante 14-3-3 de *T. solium*.
- Al evaluar la proteína recombinante 14-3-3 de *T. solium* con LCR de pacientes con otros desórdenes neurológicos, no se presenta reacción cruzada como si sucede al utilizar muestras de suero.

15. Referencias

1. Slais J. The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms. *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. *Acad Praga*. 1970:175.
2. Verster A. "A taxonomic revision of the genus *Taenia* linnaeus, 1758." *Onderstepoort J Vet Res*. 1988;31(1):3-58. doi:10.1111/j.1095-8339.1988.tb01066.x.
3. Larralde C, Aluja AS De. *Cisticercosis. Guía Para Profesionales de La Salud*. 1°. México, D.F.: Fondo de Cultura Economica; 2006.
4. Becerril MA. Teniasis y cisticercosis. In: *Parasitología Médica*. ; 2014:179-186. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
5. Flisser A, Rodríguez-Canul R, Willingham AL. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments. *Vet Parasitol*. 2006;139(4):283-292. doi:10.1016/j.vetpar.2006.04.019.
6. Flisser A, Vargas-Parada L, Lacleste JP. *Taenia solium* : Un parásito cosmopolita. *Investig Cienc*. 2006:24-33.
7. Deckers N, Dorny P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Trends Parasitol*. 2010;26(3):137-144. doi:10.1016/j.pt.2009.12.008.
8. Bernard Bouteille. Epidemiologie de la cysticercose et de la neurocysticercose. *Med Santé Trop*. 2014;24:367-374.
9. Donadeu M, Lightowers MW, Fahrion AS, Kessels J, Abela-Ridder B. *Taenia solium*: WHO endemicity map update. *Weekly Epidemiol Rec*. 2016;91:595-600. doi:10.1016/j.actatropica.2012.04.013.
10. Mafojane NA, Appleton CC, Krecek RC, Michael LM, Willingham AL. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop*. 2003;87(1):25-33. doi:10.1016/S0001-706X(03)00052-4.
11. Bern C, Garcia HH, Evans C, et al. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis*. 1999;29(5):1203-1209. doi:10.1086/313470.
12. Sarti-Gutierrez EJ, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gomez Dandoy H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop Med Parasitol*. 1988;39(3):194-198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3194663>. Accessed January 24, 2017.
13. Diaz Camacho S, Candil Ruiz A, Uirbe Beltran M, Willms K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infectious in a rural community in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1990;84(4):563-566. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=5067953>. Accessed January 24, 2017.

14. Rodriguez-Canul R, Fraser A, Allan JC, Dominguez-Alpizar JL, Arguez-Rodriguez F, Craig PS. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999;93(1):57-67. doi:10.1080/00034989958807.
15. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, et al. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(1):49-52. doi:10.1016/0035-9203(94)90493-6.
16. Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. *Int J Parasitol*. 2005;35(11-12):1221-1232. doi:10.1016/j.ijpara.2005.07.015.
17. Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P. Neurocysticercosis: Regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003;87(1):43-51. doi:10.1016/S0001-706X(03)00054-8.
18. Jiménez-Marcial ME, Velásquez-Pérez L. Morbilidad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” 1995-2001. *Gac Med Mex*. 2004;140(2):155-162.
19. Jiménez-Marcial ME, Velásquez-Pérez L. Mortalidad hospitalaria en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” 1995-2001. *Gac Med Mex*. 2004;140(2):155-162.
20. Garcia-Noval J, Allan JC, Fletes C, et al. Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(3):282-289. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842116>. Accessed January 24, 2017.
21. Sakai H, Sone M, Castro DM, et al. Seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs in a rural community of Honduras. *Vet Parasitol*. 1998;78(3):233-238. doi:10.1016/S0304-4017(98)00144-7.
22. Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, et al. Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the highlands of Cusco, Peru. *Acta Trop*. 1999;73(1):31-36. doi:10.1016/S0001-706X(99)00011-X.
23. Garcia HH, Araoz R, Gilman RH, et al. Increased prevalence of cysticercosis and taeniasis among professional fried pork vendors and the general population of a village in the Peruvian highlands. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(6):902-905. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886197>. Accessed January 24, 2017.
24. García HH, Gilman RH, Tsang VCW, Gonzalez AE. Clinical significance of neurocysticercosis in endemic villages. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91(2):176-178. doi:10.1016/S0035-9203(97)90213-3.
25. Moyano LM, O'neal SE, Ayvar V, et al. High Prevalence of Asymptomatic Neurocysticercosis in an Endemic Rural Community in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;142:1-11. doi:10.1371/journal.pntd.0005130.

26. Rodriguez-Hidalgo R, Benitez-Ortiz W, Praet N, et al. Taeniasis-cysticercosis in Southern Ecuador: assessment of infection status using multiple laboratory diagnostic tools. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):779-782. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160287>. Accessed January 24, 2017.
27. Praet N, Kanobana K, Kabwe C, et al. Taenia solium cysticercosis in the democratic Republic of Congo: How does pork trade affect the transmission of the parasite? *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9). doi:10.1371/journal.pntd.0000817.
28. Krecek RC, Michael LM, Schantz PM, et al. Prevalence of Taenia solium cysticercosis in swine from a community-based study in 21 villages of the Eastern Cape Province, South Africa. *Vet Parasitol*. 2008;154(1):38-47. doi:10.1016/j.vetpar.2008.03.005.
29. Pondja A, Neves L, Mlangwa J, et al. Prevalence and risk factors of porcine cysticercosis in Angónia District, Mozambique. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(2):e594. doi:10.1371/journal.pntd.0000594.
30. Eshitera EE, Githigia SM, Kitale P, et al. Prevalence of porcine cysticercosis and associated risk factors in Homa Bay District, Kenya. *BMC Vet Res*. 2012;8(1):234. doi:10.1186/1746-6148-8-234.
31. Komba EVG, Kimbi EC, Ngowi HA, et al. Prevalence of porcine cysticercosis and associated risk factors in smallholder pig production systems in Mbeya region, southern highlands of Tanzania. *Vet Parasitol*. 2013;198(3-4):284-291. doi:10.1016/j.vetpar.2013.09.020.
32. Guyatt HL, Fèvre EM. Lingual palpation for porcine cysticercosis: a rapid epidemiological tool for estimating prevalence and community risk in Africa. *Trop Med Int Heal*. 2016;21(10):1319-1323. doi:10.1111/tmi.12760.
33. Burneo JG, Plener I, Garcia HH. Neurocysticercosis in a patient in Canada. *Cmaj*. 2009;180(6):639-642. doi:10.1503/cmaj.081452.
34. Serpa JA, Graviss EA, Kass JS, White AC. Neurocysticercosis in Houston, Texas: an update. *Medicine (Baltimore)*. 2011;90(1):81-86. doi:10.1097/MD.0b013e318206d13e.
35. Del La Garza Y, Graviss EA, Daver NG, et al. Epidemiology of neurocysticercosis in Houston, Texas. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(4):766-770. doi:73/4/766 [pii].
36. DeGiorgio C, Pietsch-Escueta S, Tsang V, et al. Sero-prevalence of Taenia solium cysticercosis and Taenia solium Taeniasis in California, USA. *Acta Neurol Scand*. 2005;111(2):84-88. doi:10.1111/j.1600-0404.2005.00373.x.
37. Zammarchi L, Strohmeyer M, Bartalesi F, et al. Epidemiology and Management of Cysticercosis and Taenia solium Taeniasis in Europe, Systematic Review 1990-2011. *PLoS One*. 2013;8(7):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0069537.
38. Carabin H, Ndimubanzi PC, Budke CM, et al. Clinical manifestations

- associated with neurocysticercosis: A systematic review. Flisser A, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e1152. doi:10.1371/journal.pntd.0001152.
39. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol*. 2014;13(12):1202-1215. doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8.
 40. DeGiorgio M, Houston I, Oviedo S, Sorvillo F. Deaths associated with cysticercosis. Report of three cases and review of the literature. *Neurosurg Focus*. 2002;12(6):e2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15926781>. Accessed January 27, 2017.
 41. Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(1):123-133. doi:10.1586/eri.10.150.
 42. Rajshekhar V, Jeyaseelan L. Seizure outcome in patients with a solitary cerebral cysticercus granuloma. *Neurology*. 2004;62(12):2236-2240. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210888>. Accessed January 27, 2017.
 43. Trevisan C, Mkupasi EM, Ngowi HA, Forkman B, Johansen M V. Severe seizures in pigs naturally infected with *Taenia solium* in Tanzania. *Vet Parasitol*. 2016;220:67-71. doi:10.1016/j.vetpar.2016.02.025.
 44. Sáenz B, Ramírez J, Aluja A, et al. Human and porcine neurocysticercosis: differences in the distribution and developmental stages of cysticerci. *Trop Med Int Heal*. 2008;13(5):697-702. doi:10.1111/j.1365-3156.2008.02059.x.
 45. Prasad KN, Chawla S, Prasad A, Tripathi M, Husain N, Gupta RK. Clinical signs for identification of neurocysticercosis in swine naturally infected with *Taenia solium*. *Parasitol Int*. 2006;55(2):151-154. doi:10.1016/j.parint.2006.01.002.
 46. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in Peru CWG in. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet (London, England)*. 2003;362(9383):547-556. doi:10.1016/S0140-6736(03)14117-7.
 47. Del Brutto OH, Rajshekhar V, White AC, et al. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*. 2001;57(2):177-183. doi:10.1212/WNL.57.2.177.
 48. Brutto OH Del, Nash TE, Jr ACW, et al. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J Neurol Sci*. 2017;372:202-210. doi:10.1016/j.jns.2016.11.045.
 49. Carpio A, Fleury A, Romo ML, et al. New diagnostic criteria for neurocysticercosis: Reliability and validity. *Ann Neurol*. 2016;80(3):434-442. doi:10.1002/ana.24732.
 50. Arruda GC, Quagliato EMAB, Rossi CL. Intrathecal synthesis of specific immunoglobulin G antibodies in neurocysticercosis: evaluation of antibody concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay using a whole cysticercal extract and cyst vesicular fluid as antigens. *Diagn Microbiol Infect*

- Dis.* 2006;54(1):45-49. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2005.08.007.
51. Malla N, Kaur R, Ganguly NK, Sawhney IMS, Mahajan RC. Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis. *Nepal Med Coll J.* 2005;7(1):1-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16295711>. Accessed January 31, 2017.
 52. Sahu PS, Parija SC, Sahu PK. Tear IgA-ELISA: A novel and sensitive method for diagnosis of ophthalmic cysticercosis. *Acta Trop.* 2008;106(3):168-174. doi:10.1016/j.actatropica.2008.03.004.
 53. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis.* 1989;159(1):50-59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2909643>. Accessed January 31, 2017.
 54. Singh G, Kaushal V, Ram S, Kaushal RK, Dhanuka AK, Khurana S. Cysticercus Immunoblot Assay in Patients with Single, Small Enhancing Lesions and Multilesional Neurocysticercosis. *J Assoc Physicians India.* 1999;47(5):476-479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778553>. Accessed February 1, 2017.
 55. Hell RCR, Amim P, de Andrade HM, et al. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. *Clin Immunol.* 2009;131(1):129-138. doi:10.1016/j.clim.2008.10.012.
 56. Ferrer E, Bonay P, Foster-Cuevas M, 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. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.12.003.
 57. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, et al. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;133(1):115-124. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.10.001.
 58. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, et al. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Mol Biochem Parasitol.* 2011;180(2):115-119. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.08.003.
 59. Salazar-Anton F, Tellez A, Lindh J. Evaluation of an immunodot blot technique for the detection of antibodies against *Taenia solium* larval antigens. *Parasitol Res.* 2012;110(6):2187-2191. doi:10.1007/s00436-011-2747-z.
 60. Ferrer E, Sánchez J, Milano A, et al. Diagnostic epitope variability within *Taenia solium* 8 kDa antigen family: implications for cysticercosis immunodetection. *Exp Parasitol.* 2012;130(1):78-85. doi:10.1016/j.exppara.2011.10.010.
 61. Sahu PS, Parija SC, Jayachandran S. Antibody specific to 43kDa excretory–secretory antigenic peptide of *Taenia solium* metacestode as a potential diagnostic marker in human neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2010;115(3):257-

261. doi:10.1016/j.actatropica.2010.04.006.
62. Parija M, Biswas R, Harish BN, Parija SC. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop*. 2004;92(3):253-260. doi:10.1016/j.actatropica.2004.08.007.
 63. Castillo Y, Rodriguez S, García HH, et al. Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80(3):379-383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270285>. Accessed February 3, 2017.
 64. Fleury A, Hernández M, Avila M, et al. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(9):970-974. doi:10.1136/jnnp.2006.107243.
 65. Harrison LJS, Joshua GWP, Wright SH, Parkhouse RME. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol*. 1989;11(4):351-370. doi:10.1111/j.1365-3024.1989.tb00673.x.
 66. Bobes RJ, Hernández M, Márquez C, et al. Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: Application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. *Trop Med Int Heal*. 2006;11(6):943-950. doi:10.1111/j.1365-3156.2006.01642.x.
 67. Rodriguez S, Dorny P, Tsang VCW, 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):1345-1352. doi:10.1086/597757.
 68. Mwape KE, Praet N, Benitez-Ortiz W, et al. Field evaluation of urine antigen detection for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011;105(10):574-578. doi:10.1016/j.trstmh.2011.05.010.
 69. Pardini AX, Vaz AJ, Dos Ramos Machado L, Livramento JA. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3368-3372. doi:10.1128/JCM.39.9.3368-3372.2001.
 70. Sahu PS, Parija S, Kumar D, Jayachandran S, Narayan S. Comparative profile of circulating antigenic peptides in CSF, serum & urine from patients with neurocysticercosis diagnosed by immunoblotting. *Parasite Immunol*. 2014;36(10):509-521. doi:10.1111/pim.12124.
 71. Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos NM, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol*. 1998;79(4):299-313. doi:10.1016/S0304-4017(98)00180-0.
 72. Subba V, Atluri R, Singhi PD, Khandelwal N, Malla N. 2D-PAGE analysis of *Taenia solium* metacestode 10 – 30 kDa antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. *Acta Trop*. 2011;118(2):165-169.

doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.009.

73. Diaz-Masmela Y, Fragoso G, Ambrosio JR, et al. Immunodiagnosis of porcine cysticercosis : Identification of candidate antigens through immunoproteomics. *Vet J.* 2013;198(3):656-660. doi:10.1016/j.tvjl.2013.09.056.
74. Salazar-Anton F, Lindh J. Taenia solium: A two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. *Exp Parasitol.* 2011;128(4):371-376. doi:10.1016/j.exppara.2011.05.010.
75. Moore BW, Perez VJ. Specific Acidic Proteins of the Nervous System. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration.* Prentice Hall; 1967:343-359.
76. Wang W, Shakes DC. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol.* 1996;43(4):384-398.
77. Aitken A, Jones D, Soneji Y, Howell S. 14-3-3 Proteins: Biological Function and Domain Structure. *Biochem Soc Trans.* 1995;23(3):605-611.
78. Jones DH, Ley S, Aitken A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett.* 1995;368(1):55-58. doi:10.1016/0014-5793(95)00598-4.
79. Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C, Sommarin M. Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiol.* 2001;127(1):142-149. doi:10.1104/pp.127.1.142.
80. Tzivion G, Shen YH, Zhu J. 14-3-3 Proteins; Bringing New Definitions To Scaffolding. *Oncogene.* 2001;20:6331-6338. doi:10.1038/sj.onc.1204777.
81. Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell.* 1997;91(7):961-971. doi:10.1016/S0092-8674(00)80487-0.
82. Rittinger K, Budman J, Xu J, et al. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell.* 1999;4(2):153-166. doi:10.1016/S1097-2765(00)80363-9.
83. Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F. Crystal structure of the 14-3-3 ζ :serotonin N-acetyltransferase complex: A role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell.* 2001;105(2):257-267. doi:10.1016/S0092-8674(01)00316-6.
84. Bridges D, Moorhead GBG. 14-3-3 Proteins: a Number of Functions for a Numbered Protein. *Sci STKE.* 2005;2005(296):re10. doi:10.1126/stke.2962005re10.
85. Darling DL, Yingling J, Wynshaw-Boris A. Role of 14-3-3 Proteins in Eukaryotic Signaling and Development. *Curr Top Dev Biol.* 2005;68(05):281-

315. doi:10.1016/S0070-2153(05)68010-6.
86. Tinti M, Madeira F, Murugesan G, Hoxhaj G, Toth R, MacKintosh C. ANIA: ANnotation and Integrated Analysis of the 14-3-3 interactome. *Database*. 2014;2014:1-15. doi:10.1093/database/bat085.
 87. Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett*. 2002;513(1):53-57. doi:10.1016/S0014-5793(01)03288-4.
 88. Siles-Lucas MDM, Gottstein B. The 14-3-3 protein: A key molecule in parasites as in other organisms. *Trends Parasitol*. 2003;19(12):575-581. doi:10.1016/j.pt.2003.10.003.
 89. Aitken A. Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol Biol*. 2002;50(6):993-1010. doi:10.1023/A:1021261931561.
 90. Al-Khedery B, Barnwell JW, Galinski MR. Stage-specific expression of 14-3-3 in asexual blood-stage Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;102(1):117-130. doi:10.1016/S0166-6851(99)00090-0.
 91. Lally C, Jenkins C, Dubey JP. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;75:169-178.
 92. Liberator P, Anderson J, Anderson J, et al. Molecular Cloning and Functional Expression of Mannitol-1-phosphatase from the Apicomplexan Parasite *Eimeria tenella*. *Mol Biol*. 1998;273(7):4237-4244.
 93. Koyama T, Ohsawa T, Shimada S, et al. A 14-3-3 protein homologue is expressed in feline enteroepithelial-stages of *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol*. 2001;96(1):65-74. doi:10.1016/S0304-4017(00)00424-6.
 94. Siles-Lucas M, Nunes CP, Zaha A, Breijo M. The 14-3-3 protein is secreted by the adult worm of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol*. 2000;22(10):521-528. doi:10.1046/j.1365-3024.2000.00334.x.
 95. Assossou O, Besson F, Rouault JP, et al. Subcellular localization of 14-3-3 proteins in *Toxoplasma gondii* tachyzoites and evidence for a lipid raft-associated form. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;224(2):161-168. doi:10.1016/S0378-1097(03)00479-8.
 96. Siles-Lucas M, Merli M, Mackenstedt U, Gottstein B. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine*. 2003;21(5-6):431-439. doi:10.1016/S0264-410X(02)00517-0.
 97. Schechtman D, Tarrab-Hazdai R, Arnon R. The 14-3-3 protein as a vaccine candidate against schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2001;23(0141-9838 (Print)):213-217.
 98. Santibañez S, Gonzalez AE, Gilman R, Garcia HH, Merinas CC De.

- Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. *Mol Biochem Parasitol.* 2011;171(1):40-52.
doi:10.1016/j.molbiopara.2010.01.004.Proteomic.
99. Diaz-Masmela Y. Evaluación de los antígenos inmunodominantes específicos de *Taenia solium* en su capacidad diagnóstica de cisticercosis humana y porcina. 2016.
 100. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* 2014;13(12):1202-1215.
doi:10.1016/S1474-4422(14)70094-8.
 101. Flisser A, Maravilla P, Mata-Miranda P, Martinez-Hernandez F. Echinococcosis in Mexico — A Story Worth Sharing. In: *Current Topics in Echinococcosis.* InTech; 2015. doi:10.5772/60868.
 102. Eguía-Aguilar P, Cruz-Reyes A, Martínez-Maya JJ. Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. *Vet Parasitol.* 2005;127(2):139-146. doi:10.1016/j.vetpar.2004.10.004.
 103. Steta J, Torre A. Mexican-native human echinococcosis: case report of an underestimated disease. *Ann Hepatol.* 2009;8(3):251-254.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841507>. Accessed May 22, 2017.
 104. Michelet L, Fleury A, Sciutto E, et al. Human Neurocysticercosis : Comparison of Different Diagnostic Tests Using Cerebrospinal Fluid □. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):195-200. doi:10.1128/JCM.01554-10.
 105. Minelli C, Takayanagui OM. Evaluation of intrathecal synthesis of IgG in neurocysticercosis. *J Neurol Sci.* 2005;238(1-2):83-86.
doi:10.1016/j.jns.2005.06.016.
 106. Braga FM, Reis-Filho JB dos, Camargo-Lima JG de. Gradiente ventrículo-lombar de concentração das proteínas totais do líquido cefalorraquiano: 1 - Mecanismo de origem. *Arq Neuropsiquiatr.* 1983;41(3):254-265.
doi:10.1590/S0004-282X1983000300006.
 107. Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, et al. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1596199>. Accessed May 22, 2017.
 108. Ramirez-Bermudez J, Higuera-Calleja J, Espinola-Nadurille M, Corona T. Neuropsychiatric disorders in patients with neurocysticercosis. *Asia-Pacific Psychiatry.* 2017;9(2):e12250. doi:10.1111/appy.12250.
 109. Vanderlugt CL, Miller SD. EPITOPE SPREADING IN IMMUNE-MEDIATED DISEASES: IMPLICATIONS FOR IMMUNOTHERAPY. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(2):85-95. doi:10.1038/nri724.
 110. Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol.* 1996;8(6):831-836. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994863>. Accessed

May 23, 2017.

111. Monneaux F, Muller S. Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: Identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1430-1438. doi:10.1002/art.10263.
112. Liu G, Liang P, Zhang S, et al. Ts PKA-r: a potential immunodiagnostic antigen for the detection of porcine cysticercosis. *Acta Trop.* 2017;171:80-85. doi:10.1016/j.actatropica.2017.03.026.