



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Evaluación de nuevos anticuerpos monoclonales para
identificar antígenos de corpúsculo calcáreo de
cisticercos de *Taenia solium***

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Andrea Mercedes RIVERA SANTILLÁN

ASESOR

Oscar ACOSTA CONCHUCOS

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

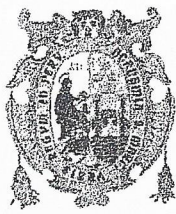
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rivera A. Evaluación de nuevos anticuerpos monoclonales para identificar antígenos de corpúsculo calcáreo de cisticerco de *Taenia solium* [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2017.

1286



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

8(2)
99

Siendo las **10:30 hrs. del 18 de octubre de 2017** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes e integrado por los siguientes miembros: Dra. Yadira Fernández Jerí, Mg. Oscar Acosta Conchucos (Asesor), Mg. Julio Reynaldo Ruíz Quiroz y la Mg. Mirtha Roque Alcarraz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"EVALUACIÓN DE NUEVOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA IDENTIFICAR ANTÍGENOS DE CORPÚSCULO CALCÁREO DEL CISTICERCO DE *Taenia Solium*"** presentado por la Bachiller en Tecnología Médica **ANDREA MERCEDES RIVERA SANTILLAN**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología** formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... *Dieciocho (18), muy bueno*

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Tecnología Médica **ANDREA MERCEDES RIVERA SANTILLAN**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología**.

Siendo las 12:00 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 12:10 hrs. del 18 de octubre de 2017.

.....
 Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
 Presidenta

.....
 Dra. Yadira Fernández Jerí (P. Asoc., T.C.)
 Miembro

.....
 Mg. Oscar Acosta Conchucos (P. Aux. T.C.)
 Miembro - Asesor

.....
 Mg. Julio Reynaldo Ruíz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
 Miembro

.....
 Mg. Mirtha Roque Alcarraz (P. Asoc., T.C.)
 Miembro

Observaciones:

DEDICATORIA

A mis amados hijos Gabriel y Leonardo,

A Jorge mi esposo y compañero de vida,

A mis Padres: Enedina y Genaro por su
amor incondicional

A mis Hermanas y a toda mi familia por su
protección, apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Mg. Adriana Paredes y Mg. Miguel Marzal, por su valiosa amistad, constante aliento y apoyo en el desarrollo de la Tesis

Mg. Oscar Acosta, por su asesoría y orientación para el logro de la presente Tesis

Dr. Hugo García, Dra. Cristina Guerra y todo el equipo del Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su valioso apoyo para llevar a cabo la ejecución de la presente Tesis

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
ANEXOS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Hipótesis	3
2. MARCO TEÓRICO	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSIÓN	51
6. CONCLUSIONES	66
7. RECOMENDACIONES	67
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
9. ANEXOS	80

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1: Concentración de proteínas obtenidas en los sobrenadantes de la disolución de los corpúsculos calcáreos	31
Cuadro 2: Proteínas (n=23) de corpúsculos calcáreos que correlacionan con las descritas para <i>Taenia solium</i> y otros céstodos de la base de datos de Uniprot, NCBI y GenBank según su peso molecular	34
Cuadro 3: Anticuerpos monoclonales seleccionados en base a su reactividad a corpúsculos calcáreos fijados en lámina	45
Cuadro 4: Resumen de proteínas detectas según su peso molecular por cada anticuerpo monoclonal	48
Cuadro 5: Información sobre las proteínas detectadas según la base de datos UniProt , NCBI , GenBank y hallazgos en artículos científicos	49
Cuadro 6. Resumen del perfil de proteínas encontradas en corpúsculos calcáreos identificadas con anticuerpos monoclonales anti - <i>Taenia solium</i>	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ciclo de Vida de <i>Taenia solium</i>	8
Figura 2: Estructura histológica del metacéstodo de <i>Taenia solium</i>	15
Figura 3: Cisticerco de <i>Taenia solium</i> teñido con una coloración especial para calcio	16
Figura 4: Producción de anticuerpos monoclonales	22
Figura 5: Tipos de estructuras de anticuerpos monoclonales	22
Figura 6: Flujograma del proceso de obtención del perfil de proteínas de corpúsculos calcáreos de cisticerco de <i>Taenia solium</i>	25
Figura 7: Obtención de cisticercos de <i>Taenia solium</i> y Fase 1: Aislamiento de corpúsculos calcáreos de cisticerco de <i>Taenia solium</i>	28
Figura 8: Corpúsculos calcáreos de <i>Taenia solium</i>	29
Figura 9: Curva de calibración con albumina sérica bovina medido por método Bradford	30
Figura 10: Electroforesis de proteínas de corpúsculo calcáreo	32
Figura 11: Comparación de Inmunofluorescencias en Tejido de cisticerco y corpúsculos calcáreos fijados a lámina.	36
Figura 12: Esquema empleado para la evaluación por inmunofluorescencia	37
Figura 13-19: Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos	38-44
Figura 20: Western Blot de antígenos de corpúsculos calcáreos y Anticuerpos monoclonales contra <i>Taenia solium</i> .	47

ANEXOS

	Página
ANEXO 1: Tabla de Anticuerpos Monoclonales producidos en el laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis –UPCH.	80
ANEXO 2: Análisis cristalográfico de la superóxido dismutasa [Cu-Zn] de <i>Taenia solium</i> a través de rayos x. (Hernández-Santoyo <i>et al.</i> , 2011).	81
ANEXO 3: Cuadro de análisis de información respecto a las proteínas descritas en el perfil de corpúsculos calcáreos de <i>Taenia solium</i> encontrados en el presente estudio en base a datos reportados en Uniprot, Interprot, Protein Data Bank, y que son identificadas por anticuerpos monoclonales.	82
ANEXO 4: Cuadro de análisis de información respecto a las proteínas descritas en el perfil de corpúsculos calcáreos de <i>Taenia solium</i> encontrados en el presente estudio en base a datos reportados en UniProt, Interprot, Protein Data Bank, y que no son identificadas por anticuerpos monoclonales.	86
ANEXO 5: Lista de materiales, reactivos y equipos utilizados.	98

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial de nuevos anticuerpos monoclonales en la detección de antígenos de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium* identificando aquellas con propiedades inmunogénicas y que puedan ser candidatos a antígenos de diagnóstico y/o de seguimiento clínico. Dieciocho anticuerpos monoclonales producidos en el laboratorio de inmunopatología en neurocisticercosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, fueron desarrollados empleando antígenos completos, fluido vesicular y de excreción - secreción del parásito, los cuales fueron evaluados en esta investigación. En la primera fase se evaluaron los anticuerpos monoclonales en tejido y corpúsculos calcáreos fijados a laminas a través de la técnica de inmunofluorescencia y se seleccionaron a los anticuerpos más reactivos a corpúsculos calcáreos, en la segunda se realizó la obtención de las proteínas de corpúsculo calcáreo y en la tercera se evaluó la reacción de anticuerpos monoclonales con las moléculas obtenidas, identificando las más destacadas. Los cálculos de pesos moleculares y análisis de proteínas se realizaron mediante el software de Biorad Image Lab 5.2.1 y la base de datos UniProt. Siete anticuerpos monoclonales fueron capaces de reconocer proteínas de corpúsculo calcáreo evidenciados a través de la técnica de Western Blot. Así también, se presenta por primera vez el perfil de proteínas obtenidos para corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*.

Palabras claves: Anticuerpos monoclonales, corpúsculos calcáreos, *Taenia solium*, biotecnología.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the potential of new monoclonal antibodies in the detection of calcareous corpuscles antigens from *Taenia solium* cysticercus identifying with immunogenic properties and used for antigen diagnostics and clinical follow up. Eighteen monoclonal antibodies produced in the immunopathology laboratory in Neurocysticercosis of the Universidad Peruana Cayetano Heredia were developed using complete antigens, vesicular fluid and excretion - secretion of the parasite, which were evaluated in this investigation. In the first phase, the monoclonal antibodies in tissue and calcareous corpuscles fixed to slides were evaluated by means of the immunofluorescence technique and the antibodies that were more reactive to calcareous corpuscles were selected. In the second phase, the isolation of calcareous corpuscle proteins, and in the third, the reaction of monoclonal antibodies with the obtained molecules was evaluated, identifying the most outstanding ones. Molecular weight calculations and protein analyzes are performed using Biorad Image Lab 5.2.1 software and the UniProt database. Seven monoclonal antibodies were able to recognize calcareous corpuscle proteins evidenced by the Western Blot technique. Also, the profile of proteins obtained for calcareous corpuscles of *Taenia solium* cysticercus is presented for the first time.

Key words: Monoclonal antibodies, calcareous corpuscles, *Taenia solium*, biotechnology.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación problemática

La Neurocisticercosis es una enfermedad causada por el estadio larval (cisticerco o metacéstodo) de *Taenia solium* que infecta el sistema nervioso central humano. Esta enfermedad es prevalente en países en vías de desarrollo. En el Perú existen áreas hiperendémicas en grandes regiones del país, sobre todo en la sierra central, costa norte y selva alta (García et al., 2003). El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo a través de la evaluación clínica, por pruebas radiológicas y de laboratorio. Las pruebas radiológicas si bien son de gran ayuda, son de costo elevado y de difícil acceso a zonas rurales. Las pruebas de laboratorio convencionales, en cambio, son más económicas y de mejor acceso, sin embargo, no presentan la misma sensibilidad y especificidad para todos los casos (Del Brutto et al., 2017). Los pacientes que tienen baja carga parasitaria, parásitos calcificados y/o cisticercos degenerados son de difícil diagnóstico. Además, en algunos casos se reporta que el tratamiento agrava la situación clínica del paciente (Nash, Bustos, García & the cisticercosis working group in Perú, 2017). Existen estructuras dentro del parásito que podrían jugar un rol importante para su viabilidad; éstos son los corpúsculos calcáreos, unas concreciones de calcio compuestas por material orgánico e inorgánico, las cuales han sido estudiadas y asociadas a funciones fisiológicas vitales para la interacción con su hospedero y medio externo (Von Brand & Nylen, 1970). Se ha descrito a detalle el componente inorgánico, sin embargo, aún se requiere profundizar en el estudio de los componentes orgánicos de la matriz de estos corpúsculos, y que podrían estar asociados con la inmunopatología de la enfermedad. El grupo de investigación en Neurocisticercosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia ha desarrollado nuevos anticuerpos monoclonales para detectar antígenos de cisticerco de *Taenia solium* (Paredes et al., 2016), los cuales están en proceso de caracterización para conocer su potencial uso en el diagnóstico clínico de esta enfermedad.

1.2. Formulación del problema

¿Los nuevos anticuerpos monoclonales serán capaces de detectar moléculas de corpúsculos calcáreos que nos permitan evaluar su potencial uso en el diagnóstico de la enfermedad por neurocisticercosis?

1.3. Justificación teórica

En pacientes que presentan baja carga de parásitos, cisticercos calcificados y/o en proceso de degeneración, no son de utilidad las pruebas de laboratorio convencionales como ELISA o WesterBlot, por la baja sensibilidad para éstos casos (Dorny, Brandt, Zoli & Geerts, 2003; García et al., 2003; DeGiorgo et al., 2004; Nash et al., 2017). Es así que se requiere identificar nuevos blancos diagnósticos capaces de poder ser empleados en este tipo de pacientes y que se puedan aplicar para todos los casos de neurocisticercosis en general. Dado que los corpúsculos calcáreos, estructuras internas del parásito, están asociadas con la viabilidad (Vargas-Parada & Laclette, 1999), es de interés identificar aquellas moléculas con potencial para ser blancos diagnósticos.

1.4. Justificación práctica

A través del desarrollo de herramientas biotecnológicas para el estudio de la neurocisticercosis, se llevó a cabo la producción de nuevos anticuerpos monoclonales capaces de identificar moléculas del parásito, antígenos de fluido vesicular y de excreción y secreción, que se encuentran en proceso de caracterización (Paredes et al., 2016). Identificar aquellos anticuerpos que detecten moléculas de corpúsculo calcáreo es importante para poder desarrollar métodos diagnósticos aplicables a pacientes con baja carga de parásitos, cisticercos calcificados y/o en proceso de degeneración (Nash et al., 2017). Así también esto permitiría desarrollar estrategias para comprender la función exacta que cumplen los corpúsculos calcáreos para el parásito y servir como base para futuros estudios sobre el desarrollo de la enfermedad relacionada con la viabilidad del parásito.

1.5. Objetivos

1.5.1. Ojetivo General

Evaluar los nuevos anticuerpos monoclonales en la identificación de antígenos de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*.

1.5.2. Objetivos específicos

- 1.5.2.1. Seleccionar los nuevos anticuerpos monoclonales con reactividad a corpúsculos calcáreos a través de inmunofluorescencia.
- 1.5.2.2. Obtener e identificar el perfil de proteínas de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium* a través de electroforesis de proteínas.
- 1.5.2.3. Determinar la capacidad de detección de los nuevos anticuerpos monoclonales con los antígenos del corpúsculo calcáreo a través de Western blot.

1.6. Hipótesis

Los nuevos anticuerpos monoclonales evaluados son capaces de identificar antígenos de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico

Uno de los motivos por desarrollar nuevas herramientas biotecnológicas son el poder combatir las enfermedades desde el punto de vista preventivo: diagnóstico oportuno con alta sensibilidad y especificidad; y del tratamiento efectivo sin riesgos colaterales.

Las herramientas biotecnológicas que se han desarrollado a lo largo de la historia del avance científico han sido variadas tanto a nivel celular como molecular. Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, ofrecen la ventaja de detectar moléculas de manera sensible y específica, siendo una herramienta útil en varios aspectos.

Por otro lado, combatir enfermedades causadas por parásitos es un desafío difícil, más aún si las condiciones socio-económicas no son del todo favorables. La neurocisticercosis es una enfermedad parasitaria prevalente en nuestro país, sin embargo, se está tratando de combatirla desde distintos niveles, por ejemplo, desde la búsqueda de mejores herramientas diagnósticas, así como alternativas más adecuadas de tratamientos.

En este sentido, los anticuerpos monoclonales ofrecen su uso potencial en la búsqueda y detección de moléculas de interés para el entendimiento, diagnóstico diferencial, y el tratamiento oportuno de esta enfermedad.

2.2. Antecedentes de la investigación

Desde que Köler & Milstein desarrollaron la técnica de producción de anticuerpos monoclonales, allá por los años 1984, se ha utilizado esta herramienta biotecnológica en distintos ámbitos de la ciencia y de la salud. Los anticuerpos monoclonales son herramientas esenciales en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas, así como también en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero y la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas (Machado, Téllez & Castaño, 2006).

La especificidad de estos anticuerpos de detectar moléculas de interés ha sido ampliamente descrita (Male, Brostoff, Roth & Roitt, 2014).

Grupos de investigación latinoamericanos que estudian la teniasis y/o cisticercosis como The Cisticercosis Working Group en Perú, liderados por el Dr. Hugo García; Grupos de investigación liderados por el Dr. Laclette en México, El grupo de investigación en Ecuador liderados por el Dr. Del Brutto, entre otros; que han servido para poder generar nuevos conocimientos respecto a fisiología, estructura y moléculas de interés para el diagnóstico de la Teniasis/cisticercosis sobretodo de la neurocisticercosis (Gripper & Welburn, 2017; Lescano et al., 2009; García, Gonzales, Martínez & Gilman, 2001; Newton & García, 2012).

Uno de los principales intereses de los países en vías desarrollo para abordar la problemática del diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad por neurocisticercosis es conocer y comprender la compleja inmunopatología de esta enfermedad, poder encontrar blancos diagnósticos y terapéuticos que sirvan para todos los pacientes con alta grado de sensibilidad y especificidad. (Coyle & Tanowitz, 2009; John et al., 2015).

El instituto nacional de salud (INS) ha desarrollado investigaciones respecto a las moléculas de interés para el diagnóstico de cisticercosis y neurocisticercosis a través del estudio de antígenos obtenidos de extractos crudos del parásito (Ayala-Sulca & Miranda-Ulloa, 2015).

Se han desarrollado investigaciones a fin de analizar el perfil de proteínas de este parásito y comparar las moléculas que podrían diferenciar un parásito proveniente de cerebro o de músculo, sin hallar mayores diferencias (Navarrete-Perea et al., 2016). Se ha tratado de estudiar las características de los corpúsculos calcáreos en otros parásitos helmintos como *Echinococcus granulosus*, encontrando proteínas afines al calcio (Rodríguez, Ferreira, Farias & Zaha, 1997), además un estudio previo a este trabajo aisló y separó una fracción proteica de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium*, la cual fue analizada con anticuerpos monoclonales específicos para *Echinococcus granulosus* que detecta la proteína afín al calcio de alto peso molecular

EgCaBP1 empleando también sueros de pacientes con neurocisticercosis detectando bandas de 260 kDa (Zurabiam, Carrero, Rodriguez-Contreras, Willms & Laclette, 2005).

En general se ha estudiado un gran grupo de moléculas del parásito en búsqueda de conocer la función de cada una de ellas, moléculas bioactivas, describiendo un gran grupo de proteínas llamadas proteínas antigénicas para serodiagnósticos, que en su mayoría son de bajo peso molecular (Bae, Xue, Lee, Kim & Kong, 2010).

El grupo de investigación en neurocisticercosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia liderado por el Dr. Hugo García y con el apoyo del NIH (Instituto Nacional de Salud de los EE. UU.), llevó a cabo la producción de nuevos anticuerpos monoclonales empleando antígenos de *Taenia solium* utilizando extracto completo, fluido vesicular y antígenos de excreción-secreción del parásito. Producto de ello, se logró obtener 18 clonas productoras de anticuerpos monoclonales con potencial uso para la enfermedad por neurocisticercosis (Paredes et al., 2016).

2.3. *Taenia solium*: Ciclo de vida

Taenia solium es un parásito platelminto de la clase céstodo cuyo ciclo de vida involucra al cerdo y al ser humano. La parasitosis por *Taenia solium* se desarrolla en varias zonas rurales de los países en desarrollo, donde los cerdos de crianza libre ingieren heces humanas que contienen huevos de *Taenia solium* desarrollando la infección larvaria, convirtiéndose en huéspedes intermediarios. Así también, los seres humanos al ingerir cerdos infectados con larvas quísticas desarrollan teniasis intestinal (García, Rodriguez, Friedland & the cisticercosis working group in Peru, 2014).

Cuando un ser humano ingiere carne de cerdo contaminado con quistes parasitarios, el escólex del quiste evagina, por acción de las enzimas biliares e intestinales, y se fija a la mucosa de la pared del intestino delgado. Aquí, el parásito crece reproduciendo sus células del cuello, desarrollando segmentos o

proglótides que maduran a medida que se hacen más distales al escólex. El parásito adulto mide entre 2 y 4 metros de longitud, la tenia es hermafrodita, y después de la fecundación, los segmentos finales son grávidos y llenos de huevos maduros. Estos huevos infectivos son expulsados al medio ambiente con las heces del portador de tenia. Una vez ingeridos por un huésped (generalmente el cerdo), los embriones contenidos en los huevos eclosionan, atraviesan la pared intestinal y son llevados por el torrente sanguíneo a todos los tejidos del cuerpo donde se establecen como estadio larvario (cisticerco o metacéstodo). Los seres humanos se infectan con cisticercosis a través de la contaminación fecal-oral. Así, los seres humanos pueden tener infecciones intestinales adultas de tenia (teniasis) o larvales (cisticercosis humana), mientras que los cerdos sólo actúan como huéspedes intermedios (cisticercosis porcina) (García et al., 2014).

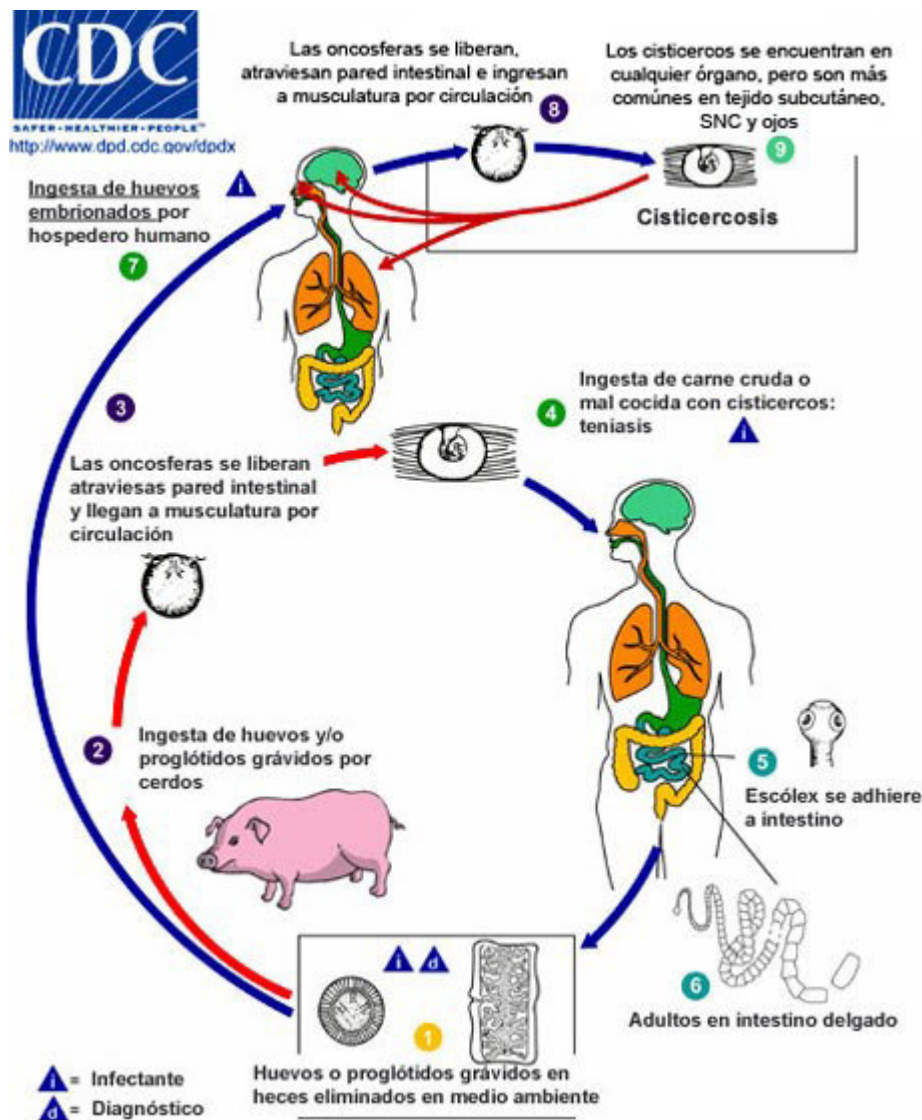


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (Imagen del Centro para el Control y prevención de enfermedades- CDC)

2.4. Neurocisticercosis (NCC)

La neurocisticercosis es la infección helmíntica más común del sistema nervioso y es una de las principales causas de epilepsia adquirida en todo el mundo (Del Brutto, 2014; Gripper & Welburn, 2017).

Esta enfermedad es causada por el estadio larval (cisticerco o metacéstodo) de *Taenia solium* alojado a nivel del sistema nervioso (García, Gonzales, Evans & Gilman, 2003).

La infección es de tipo fecal-oral y se genera por la ingesta accidental de huevos de *Taenia solium* a través agua, alimentos contaminados u otros, una vez ingeridos eclosionan y las larvas atraviesan la pared intestinal, viajando por el torrente sanguíneo y llegando al sistema nervioso, donde se alojan en diversas áreas (García et al., 2003; Clinton-White, 1997; Del Brutto, 2014).

Dentro del sistema nervioso, los parásitos pueden localizarse en el parénquima cerebral, el espacio subaracnoideo, el sistema ventricular o la médula espinal, causando varios cambios patológicos que son responsables del pleomorfismo clínico de la enfermedad. Las convulsiones son la manifestación clínica más común, pero una proporción considerable de pacientes desarrollan déficits focales, hipertensión intracraneal o deterioro cognitivo (Del Brutto, 2014).

2.5. Epidemiología de la neurocisticercosis

2.5.1. En el mundo

La NCC afecta a miles de individuos de países en vías de desarrollo, así mismo se ven afectados países desarrollados que tienen un alto grado de inmigrantes provenientes de zonas endémicas. Se presenta en diferentes partes del mundo y es considerada una enfermedad de salud pública (OMS, 2016).

La infección del sistema nervioso humano por *Taenia solium* es la causa del 30% de los casos de epilepsia en muchas zonas endémicas donde existen cerdos en libertad cercanos a donde viven las personas. Más del 80% de los 50 millones de personas afectadas en el mundo por epilepsia viven en países de ingresos bajos (OMS, 2016).

La neurocisticercosis se ha convertido en una causa cada vez más importante de las convulsiones en los Estados Unidos (Degiorgo, Medina, Duron, Zee & Pietsch-Escueta, 2004) y es considerada una de las infecciones globales que causan morbilidad significativa a nivel del sistema nervioso (Gripper & Welburn, 2017; John et al., 2015).

En el norte de Tanzania, el 2,4% y 11,3% de los pacientes con epilepsia se diagnosticó como NCC definitivo y probable respectivamente (Winkler et al., 2009; Del Brutto, 2005).

En Zambia, en un estudio transversal de base comunitaria entre pacientes con epilepsia, el 4,1% podría ser diagnosticado como NCC definitivo y el 24,5% como NCC sugerente (Mwape et al., 2015).

En Brasil, se identificó NCC en 0,015% de las muertes como causa subyacente o asociada, así también, las mayores tasas de mortalidad se encontraron en ancianos y varones de zonas endémicas, la tasa de mortalidad ajustada por edad para el período fue de 0,97 muertes / 1.000.000 de habitantes. (Martins-Melo, Ramos, Cavalcanti, Alencar & Heukelbach, 2017).

En la India un tercio de los casos de epilepsia está asociado a NCC (Amudhan, Gururaj & Satishchandra, 2015). En la provincia oriental de Zambia se ha reportado una prevalencia de 57,1% de pacientes con epilepsia son causados por NCC (Mwape et al., 2015).

Las estimaciones en África oscilan entre el 11% en Burkina Faso (Ndimubanzi et al., 2010) y el 37% en la Provincia del Cabo Oriental de Sudáfrica (Foyaca-Sibat et al., 2009), con Tanzania reportando una prevalencia de 16,5% (Blocher et al., 2011).

En Latinoamérica, un reciente meta análisis de la epilepsia y la NCC reveló una proporción de NCC del 32,3% entre pacientes con epilepsia (Bruno et al., 2013), siendo la más alta 47% reportada en un estudio en Guatemala (García-Noval et al., 1996). La mayoría de los casos en países desarrollados como EE.UU. se produce en los inmigrantes hispanos, especialmente los inmigrantes mexicanos, que se presume han sido infectados antes de la inmigración. También ha habido una serie de casos de inmigrantes de Asia, especialmente Corea. Además, se han documentado en Nueva York, Chicago, Los Ángeles, y en otras partes de los Estados Unidos. Debido a la reciente afluencia de inmigrantes a los Estados Unidos, la neurocisticercosis es cada vez más reconocida como un problema también (Sorvillo, DeGiorgio & Waterman, 2007).

En Ecuador, un estudio revela que la incidencia de casos de epilepsia y NCC están asociados a las medidas de salubridad y que al aumento en la implementación de sistemas para eliminar excrementos ayudaría a reducir la incidencia de casos hospitalarios en 1,00% los casos de epilepsia y en un 5,12% los casos de neurocisticercosis (Ron-Garrido et al., 2015).

En países endémicos como: Nigeria, Sudáfrica, la India, Perú, México, Guatemala, Ecuador, Colombia, entre otros; la teniasis y cisticercosis son extremadamente comunes, así como la sintomatología neurológica (García et al., 2003).

2.5.2. En el Perú

En el Perú la infección por *Taenia solium* es hiperendémica en la sierra y en algunas zonas de la costa y selva; tal como lo muestran los resultados de los estudios realizados por The Cisticercosis Working Group en Perú (García et al., 2003; Lescano et al., 2009).

Existen zonas rurales y suburbanas hiperendémicas como Huancayo, Ayacucho, Tumbes donde se reporta que el 40% de casos de epilepsia está asociado con NCC (Lescano et al., 2009; García, Gilman, González, Verástegui, Rodríguez & Gavidia, 2003; García et al., 2003).

Existen estudios que demuestran una fuerte asociación entre la teniasis, la crianza de cerdos y el mal tratamiento de residuos fecales humanos infectados (García et al., 2003). A través de estudios serológicos se ha determinado una prevalencia de cisticercosis del 20 al 30 % en regiones endémicas. Asimismo, más del 6% de la población podría tener el parásito adulto (García et al., 2003).

2.6. Sintomatología de la neurocisticercosis

La sintomatología clínica en pacientes con NCC son cuadros de epilepsias, dolores de cabeza, problemas visuales, confusión, ataxia, déficit motor, afectación de pares craneales, síntomas de hidrocefalia, psicosis (García et al., 2003). La variabilidad de la sintomatología, como cefalea, trastornos mentales,

hidrocefalia, epilepsia que produce el parásito en el sistema nervioso central está ligada a la localización y a la respuesta inflamatoria del hospedero (DeGiorgo et al., 2004).

2.7. Inmunopatología de la neurocisticercosis

Los huevos de la *Tenia solium*, cuando son ingeridos y expuestos al ácido gástrico del estómago humano, pierden su cápsula protectora y se convierten en larvas, llamadas oncósferas. Las oncósferas cruzan el tracto gastrointestinal y migran a través del sistema vascular al cerebro, los músculos y los ojos principalmente. Una vez en el cerebro, el estadio larval (cisticercos o metacéstodo), genera una respuesta inmune mínima y puede permanecer en el cerebro en forma viable por años (DeGiorgo et al., 2004).

El cisticercos viable tiene aproximadamente de 1 a 1.5 cm de diámetro, localizado en el parénquima cerebral, que se conoce como un quiste vesicular, tiene muy poca o ninguna respuesta inmune del huésped. En esta etapa, el escólex por lo general se identifica como un nódulo excéntrico dentro del quiste. A medida que el quiste se degenera, el líquido se fuga del quiste hacia el parénquima cerebral, lo que genera una fuerte respuesta inmune (Sciutto, Chavarria, Fragoso, Fleury & Larralde, 2007).

La epileptogénesis en pacientes con Neurocisticercosis se puede atribuir a varios factores: inflamación, gliosis, la genética y la predilección del parásito de viajar a la zona frontal y los lóbulos temporales (DeGiorgo et al., 2004).

La sintomatología adversa, ocasionada por la inflamación que induce el parásito en el tejido cerebral que lo rodea, afecta al humano ocasionando cuadros de epilepsia (García et al., 2003).

Cuando el parásito se encuentra viable, es capaz de evadir la respuesta inmunológica, pero cuando éste comienza a degenerarse, fisiológicamente o por efecto del tratamiento antiparasitario, la inflamación alrededor del parásito se exagera y trae consigo todas las consecuencias antes mencionadas. (Sciutto et al., 2007; García et al., 2003).

Si bien el tratamiento actual con antihelmínticos es efectivo contra *Taenia solium*, ésta causa reacciones adversas. La respuesta del parásito al tratamiento estimula la reacción inflamatoria (Nash et al., 2015). No se conoce al detalle el mecanismo por el que se liberan ciertas moléculas fuertemente inmunógena, o la fisiopatología del parasito en tejido hospedero.

La inmunopatología de la enfermedad es compleja y está en constante estudio (Fleury, Cardenas, Adalid-Peralta, Fragoso & Sciutto, 2016).

Desde que el parásito se aloja en el cerebro hasta las primeras manifestaciones clínicas, pueden transcurrir inclusive años hasta que se presenten los primeros síntomas, esto va depender de factores como: la viabilidad del parásito, ubicación y número de cisticercos en el cerebro (Gonzales, Rivera, Garcia & the cisticercosis working group in Perú, 2016; García et al., 2003), respuesta inflamatoria alrededor del tejido (Sciutto et al., 2007) y tipo de respuesta inmune del hospedero (Clinton, 1997).

No existe un tratamiento eficaz sin riesgo de complicaciones para esta enfermedad y aquellos esquemas con antiparasitarios son aun controversiales y siguen en consenso por la variabilidad de condiciones para el desencadenamiento de esta enfermedad. En la mayoría de casos la sintomatología se ve exacerbada por el tratamiento o cuando el parásito esta degenerado y/o calcificado (García et al., 2003; DeGiorgo et al., 2004). El tratamiento antihelmíntico, usando praziquantel y albendazol, es efectivo contra *Taenia solium*, matando a un 85% de cisticercos localizados en parénquima cerebral, sin embargo, se han observado una exacerbación de síntomas neurológicos, el cual ha sido atribuido a la reacción inflamatoria causado luego de la muerte del parásito (Gonzales et al., 2016; Coyle & Tanowitz, 2009; García et al., 2011).

La viabilidad del parasito juega un papel fundamental en la inmunopatología de esta enfermedad. Los cisticercos pueden vivir en el huésped humano infectado por años y pueden calcificarse. Un quiste viable (activo), cuando está localizado en el tejido cerebral, es responsable de ciertas manifestaciones clínicas; sin embargo, al morir los parásitos provocan una intensa inflamación e infiltrados

que están asociados con las convulsiones (Nash et al., 2015; Del Brutto et al., 2001) y alteraciones de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Cangalaya et al., 2016).

Los cisticercos calcificados son los más comunes en resultados radiológicos en los países endémicos de NCC y también pueden ser responsables de las convulsiones; si bien la presencia de cisticercos calcificados en cerebro (cicatriz calcificada) son comunes en las regiones endémicas y la mayoría de ellas son clínicamente silenciosas, una proporción de individuos con cisticercos calcificados desarrollan convulsiones de estas lesiones y entre el 30 y el 65% de estos casos se asocian con edema perilesional (EP), probablemente debido a Inflamación del huésped (Nash et al., 2017).

Se ha descrito que algunos mecanismos por los que el parásito permanece viable son el enmascaramiento antigénico (Sciutto et al., 2007; Flisser, Sarti, Lightowers & Schantz, 2003; Del Brutto et al., 2001) y la osmorregulación con el medio externo a través de corpúsculos calcáreos (Von Brand, Mercado, Nylen & Scott, 1960; Vargas-Parada & Laclette, 1999; Von Brand, Nylen, Martin, & Churchwell, 1967).

El cisticerco mantiene una constante interacción con el medio externo (tejido cerebral), del cual obtiene los nutrientes necesarios para su subsistencia y además del que debe permanecer oculto “enmascarándose” con proteínas y otras moléculas propias del hospedero, para evadir la respuesta inmunológica (Obregón-Henao et al., 2003; Laclette, Merchant & Willms, 1987; Bae et al., 2010). A su vez el parásito va a liberar sustancias de desecho (Von Brand et al., 1960) como se ve también en *Equinococcus* (Agosin, 1968), otras moléculas como fosfatos y carbonatos, para mantener adecuado el medio externo u otras moléculas que podrían ejercer alguna función sobre el metabolismo o células del hospedero (Vond Brand et al., 1960).

2.8. Estructura del cisticerco de *Taenia solium*

Se han descrito diferentes estructuras y células que componen la membrana o pared quística y escólex del cisticerco de *Taenia solium* como: microtrichas, membrana basal, células cytones subtegumentales, células flamígeras, células ductales, ductos protonefridiales, corpúsculos calcáreos, fibras musculares, fibras de tejido conectivo, células flama, entre otros y muchas de las cuales se han estudiado a nivel estructural, histológico y otras a nivel bioquímico (Willms, 2008; Laclette et al., 1987) y unas pocas a nivel de función fisiológica como es el caso de los corpúsculos calcáreos. (Ver Figura. 2).



Figura 2. Estructura histológica del metacéstodo de *Taenia solium*. (1) membrana vesicular conteniendo a las células tegumentarias, microtrichas conductos protonefridiales. (2) Cuello del escólex donde se ubican las células en flama, conductos protonefridiales, corpúsculos calcáreos. Coloración H-E. (University of Sidney, 2017)

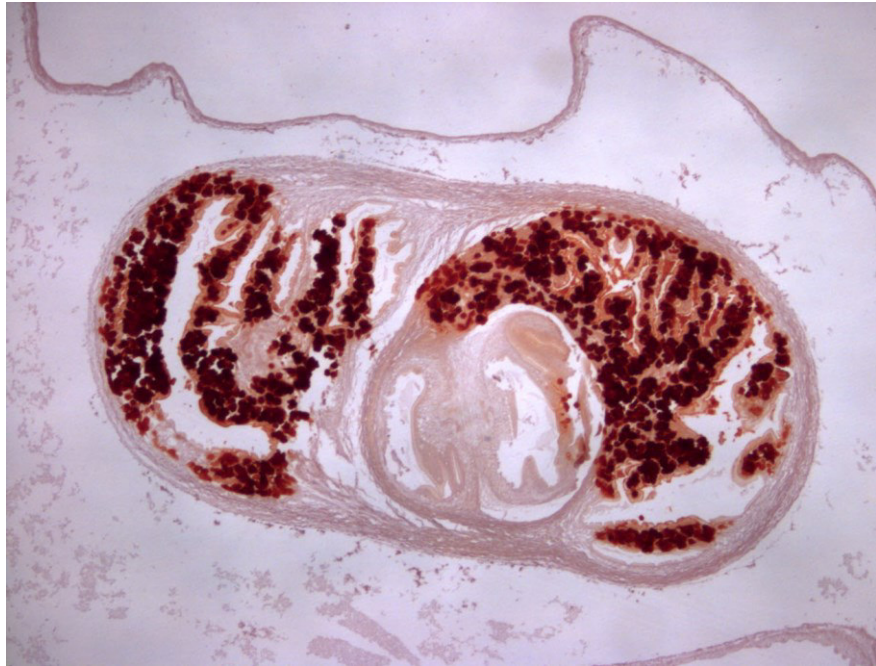


Figura 3. Cisticerco de *Taenia solium* teñido con una coloración especial para calcio. Cisticercos teñidos con la coloración Alizarin Red para evidenciar presencia de calcio, los depósitos rojisos evidencia la presencia de corpúsculos calcáreos en el parásito (Colección interna de imágenes histológicas del Laboratorio de inmunopatología en neurocisticercosis, 2016).

2.9. Corpúsculos calcáreos

Los corpúsculos calcáreos (CC) son unas estructuras que se encuentran dentro del parásito tanto en su membrana como en su escólex (ver Figura 3). Estos están conformados por calcio en mayor concentración, otros minerales y una matriz orgánica que alberga proteínas (Vond Brand et al., 1960; Von Brand et al., 1967). Estudios previos del corpúsculo calcáreo demuestran su participación en la osmorregulación del parásito con su medio externo (Vargas-Parada, Merchant, Willms & Laclette, 1999), lo que podría influir en la viabilidad del parásito y / o su tendencia a degenerarse y calcificarse (Nash et al., 2017). Los corpúsculos calcáreos son concreciones minerales, que pueden representar hasta el 41% del peso seco del parásito (Vargas-Parada & Laclette, 1999; Von Brand, Nylen, Martin, Churchwell & Stites, 1969), están formados por láminas concéntricas de material inorgánico, principalmente calcio

y fosfato de magnesio y carbonato, intercaladas con una matriz orgánica, así también la presencia de glucógeno como polisacáridos, lípidos, los residuos de aminoácidos tales como Asp, Glu y Gly (Vargas-Parada et al., 1999). Se han descrito proteínas de origen desconocido en la matriz orgánica de la *Taenia taeniaeformis* (Von Brand & Nylen, 1970).

La formación de estos corpúsculos calcáreos en *Taenia solium*, a diferencia de otros helmintos, se da a nivel de los ductos protonefridiales, de manera extracelular (Vargas-Parada et al., 1999), sin embargo, no se describe a detalle las proteínas implicadas en su formación, o las células que generan la matriz para el inicio de la formación, ni la liberación de sustancias asociadas a los corpúsculos calcáreos.

Una proteína de unión a calcio se ha descrito en CC de *Echinococcus granulosus* (EgCaBP1) (Rodríguez et al., 1997). La participación de proteínas de unión a calcio (CaBP) en la acumulación local de Ca^{2+} ha sido descrita en varios de los filos de invertebrados y de los organismos vertebrados (Marsh, 1986; Illies, Peeler, Dechtiaruk & Etensohn, 2002).

Una fracción proteica fue aislada de corpúsculos calcáreos de cisticercos de *Taenia solium*, en los cuales se encontró antígenos que fueron reconocidos por sueros de pacientes con Neurocisticercosis activa a través ELISA y WesternBlot y no por sueros de pacientes con otros desórdenes neurológicos. Los resultados mostraban que se trataban de proteínas de alto peso molecular, diferentes a los usados en las pruebas de diagnóstico. (Zurabiam et al., 2005).

Las proteínas de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* que aún no han sido aisladas ni descritas en su totalidad podrían estar asociadas con el desencadenamiento de los síntomas e inmunopatología de la enfermedad. En otros parásitos como *Echinococcus granulosus* se ha descrito una proteína con un dominio de unión a calcio asociada a CC (Rodríguez et al., 1997) o proteínas similares en otros parásitos (Marsh, 1986; Illies et al., 2002). Se ha descrito una proteína de corpúsculo calcáreo de cisticerco de *Taenia solium* identificada con un anticuerpo monoclonal producido para detectar antígenos de *Equinococcus granulosus*, encontrándose similitudes entre ambas y donde se

sugiere ahondar en el estudio de las demás proteínas en corpúsculo calcáreo de *Taenia solium* (Zurabian et al., 2005).

Se conoce que existen proteínas asociadas a estos corpúsculos y que son fuertemente antigénicas (Vargas-Parada et al., 1999; Víctor et al., 2012), sin embargo, aún no se han descrito o detectado con anticuerpos monoclonales específicos anti *Taenia solium* y así poder estudiarlas, conocer su potencial para el diagnóstico, tratamiento o seguimiento de la enfermedad.

2.10. Diagnóstico de neurocisticercosis

El diagnóstico de NCC es difícil y generalmente se basa en los datos clínicos-epidemiológicos del paciente, ayudados por varios métodos, tales como resonancia magnética, tomografía computarizada y pruebas serológicas, considerando también los criterios establecidos como absolutos, mayores y menores (Del Brutto et al., 2017; García et al., 2014). Sin embargo, el diagnóstico basado en imágenes tiene inconvenientes debido a la disponibilidad para zonas endémicas y a su alto costo.

Los métodos serológicos de inmunodiagnóstico son asequibles y útiles para epidemiología, aunque tienen limitaciones asociadas con la sensibilidad y especificidad (Dorny et al., 2003). Las pruebas inmunológicas (ELISA, Western Blot) se realizan en líquido céfalo raquídeo (LCR) y suero. Las pruebas diagnósticas en LCR parecen ser más precisas sin embargo la obtención de muestra es dificultosa e incómoda para el paciente.

Las pruebas serológicas son más económicas, sin embargo el inconveniente que presenta la técnica de ELISA en suero es la reactividad cruzada con otros parásitos y la detección de anticuerpos circulantes no provee información por sí sola respecto a la viabilidad del parásito. La técnica de ELISA para la detección de antígenos se ha ido mejorando con la utilización de anticuerpo monoclonales, se ha desarrollado un test de ELISA para detección de antígenos de excreción circulantes en suero, a través del uso de anticuerpos monoclonales para antígenos de *Taenia saginata*, con buenos resultados. Aun así, se mejoraría el diagnóstico si se emplearan anticuerpos monoclonales

producidos específicamente para *Taenia solium* (Dorny et al., 2003; Sciutto et al., 2007).

También se han desarrollado ensayos de inmunoelectrotransferencia para evaluar anticuerpos circulantes en sueros de pacientes con NCC y en LCR, empleando fracciones proteicas de antígeno de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* con potencial uso en el diagnóstico de neurocisticercosis activa (Da Silva et al., 2017).

2.11. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos son glucoproteínas especializadas y son parte del sistema inmune, producidas por los linfocitos B, con la capacidad de reconocer moléculas específicas (antígenos). Los anticuerpos monoclonales son aquellos anticuerpos que provienen a partir de un único tipo de célula B (García-Merino, 2011).

La producción de anticuerpos monoclonales *in vitro* se lleva a cabo a través de la fusión celular de dos tipos de células: El linfocito B y una célula tumoral de estirpe linfoide, que dan paso a una célula híbrida llamada Hibridoma, a partir de la cual se genera los anticuerpos monoclonales (Köler & Milstein, 1975) (ver Figura 3). La producción de anticuerpos monoclonales es una herramienta esencial en el ámbito clínico y biotecnológico, y han probado ser útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas, inmunológicas y neoplásicas, así como también en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero a través de la detección y cuantificación de diversas moléculas. Así también, la incorporación de las técnicas de biología molecular e ingeniería genética y proteica han permitido ampliar el horizonte de la generación de anticuerpos monoclonales y sus usos, y se han encontrado técnicas como la hibridación, la quimerización, la humanización y la producción de anticuerpos monoclonales totalmente humanos (Machado et al., 2006) (ver Figura 4).

Los anticuerpos monoclonales son una poderosa herramienta para el diagnóstico de laboratorio y un instrumento cada vez más utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades (García-Merino, 2011), en el mercado se

encuentran cerca de 29 anticuerpos monoclonales aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para uso en humanos (Machado *et al.*, 2006).

Los anticuerpos son proteínas que tienen una estructura bioquímica compleja demarcada por la unión de cuatro cadenas proteicas: dos pesadas, y dos ligeras, unidas mediante puentes disulfuro. Funcionalmente, los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab, y una fracción cristalizable (Fc). Las regiones Fab están conformadas por una región variable y otra conservada. La región variable tiene una diversidad casi infinita para el reconocimiento de antígenos, gracias a las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los anticuerpos monoclonales son componentes fundamentales del sistema inmune y pueden ser empleadas como herramientas biotecnológicas en el diagnóstico, tratamiento e investigación de diversas enfermedades (Machado *et al.*, 2006).

2.11.1. Tipos de Anticuerpos monoclonales

El primer uso de anticuerpos monoclonales en terapia humana fue en 1982 para el tratamiento de un linfoma (Miller, Maloney & Warnke, 1982). Pronto se vio que el uso de monoclonales murinos arrastraba el problema de la tolerancia con producción de anticuerpos humanos antimurinos que disminuían su eficacia. Para solventar estas dificultades se exploraron diversas alternativas, como son la quimerización y la humanización.

La quimerización se desarrolló en 1984 (Morrison, Johnson & Herzenberg, 1984), y se trata de la producción de anticuerpos monoclonales en los que solamente la región variable es de origen murino, y el resto de las cadenas pesadas y ligeras es de origen humano. En los anticuerpos humanizados sólo son murinas las regiones hipervariables de las cadenas ligeras y pesadas (Gorman, & Clark, 1991; Mountain, & Adair, 1992) (Figura 5).

Otra alternativa son los monoclonales humanos que se producen en animales transgénicos portadores de genes de inmunoglobulinas (Ig) humanas; los transgenes incluyen fragmentos de las regiones variables en línea germinal, lo que les facilita la capacidad recombinatoria de los anticuerpos humanos. Las

vías de introducción de esos segmentos son los miniloci, los cromosomas artificiales de levadura o humanos, y los vectores P1 (Brüggemann, & Neuberger, 1996). Los monoclonales humanos son más ventajosos por su menor antigenicidad y mejor tolerancia, y por su mayor tiempo en circulación en relación con los quiméricos. Es así que, los anticuerpos monoclonales murinos son de mayor uso en el área diagnóstica.

2.12. Anticuerpos monoclonales producidos en el laboratorio de inmunopatología experimental en neurocisticercosis

En el laboratorio de inmunopatología en neurocisticercosis de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, se ha llevado a cabo con éxito la producción de anticuerpos monoclonales contra diversos antígenos del metacéstodo de *Taenia solium*. Estos anticuerpos son de suma importancia por su potencial aplicación en el diagnóstico y/o tratamiento de la enfermedad. La producción de anticuerpos monoclonales in vitro se llevó a cabo a través de la fusión celular de linfocitos de ratones inmunizados con antígenos del parásito (del parásito completo, de fluido vesicular y antígenos de excreción/secresión) con células tumorales llamadas SP2; obteniendo con éxito 18 hibridomas con capacidad de producir anticuerpos, los cuales se encuentran en proceso de caracterización (Paredes et al., 2016).

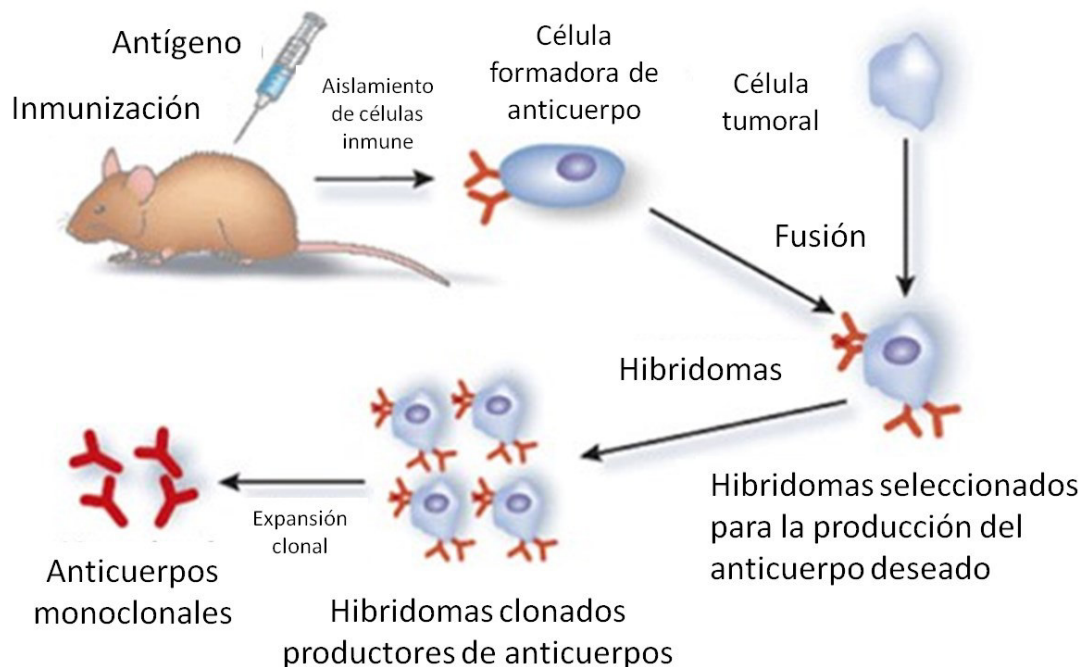


Figura 4. Producción de anticuerpos monoclonales
(Modificado de Michnick & Sidhu, 2008)

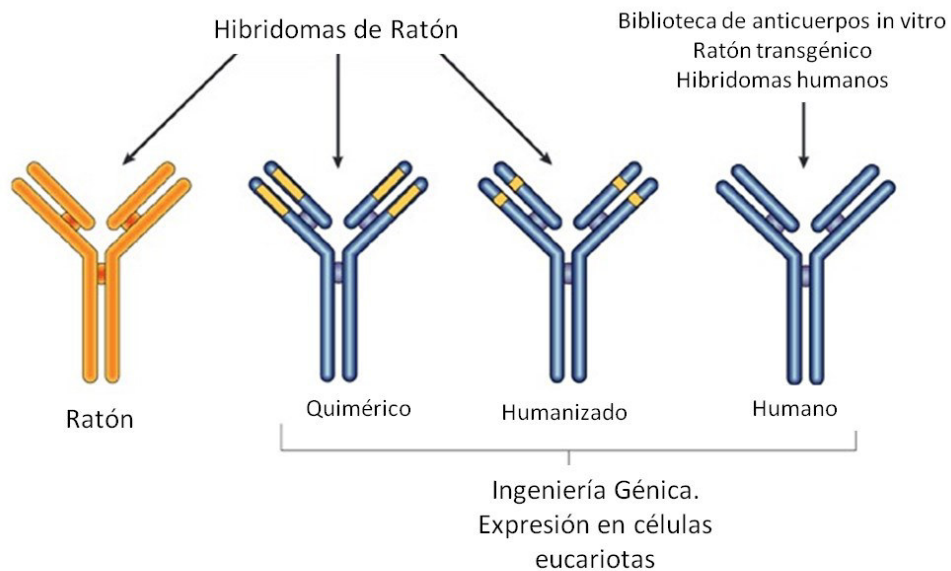


Figura 5. Tipos de estructuras de anticuerpos monoclonales
(modificado de Research Gate, 2017)

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención del perfil de proteínas de corpúsculos calcareos de cisticerco de *Taenia solium*

3.1.1. Obtención de cisticercos de *Taenia solium*

Los cisticercos de *Taenia solium* fueron extraídos de músculo esquelético de tres cerdos naturalmente infectados (provenientes de regiones endémicas del Perú, pertenecientes al proyecto "Eliminación de cisticercosis en Perú", del Centro de Salud Global UPCH, Tumbes, con autorización del Comité Institucional de Ética para Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia : SIDISI 03101), los cerdos fueron sacrificados de acuerdo con un protocolo aprobado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se recolectaron en promedio 200 metacéstodos por cerdo, haciendo un total de 600. Los parásitos se colectaron y transportaron al laboratorio en solución salina tamponada con fosfato estéril pH7.4 (Gibco-Invitrogen, Gaithersburg, MD) conteniendo antibióticos de amplio espectro como amoxicilina, estreptomina y cloranfenicol e inhibidores de proteasas 1X PMSF.

3.1.2. Obtención proteínas de corpúsculos calcareos (Zurabian *et al.*, 2005; Park, Guk, Shin & Chain, 2005)

Se desarrolló un nuevo procedimiento de obtención de las proteínas de corpúsculo calcáreo en base a lo descrito por ambos autores.

Los parásitos fueron lavados 10 veces con solución salina tamponada con fosfato estéril pH7.4 (Gibco-Invitrogen, Gaithersburg, MD) conteniendo antibióticos de amplio espectro e inhibidores de proteasas 1X PMSF.

Fase 1: Aislamiento de cospusculos calcareos. Los cisticercos fueron homogenizados con la solución de buffer fosfato antes descrita, empleando un homogenizador Polytron (Kinematica PCU) bajo la máxima intensidad de 1 a 2 min a 4 °C. El homogenizado fue centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C, a fin de sedimentar los corpúsculos calcáreos.

Se retiró el sobrenadante y detritus celulares quedándonos con el precipitado blanquecino donde se encontraron los corpúsculos calcáreos. Se realizaron tres lavados adicionales con buffer fosfato para mejorar la separación y limpieza de los corpúsculos calcáreos.

Fase 2: Disolución de corpúsculos calcareos. Los corpúsculos calcáreos ya limpios fueron sometidos a disolución del material que lo compone a fin de liberar las proteínas, a través del uso una solución de ácido sulfámico 0,1M (9,7%) a pH 1,2; en proporción de 2:1 (dos volúmenes de la solución de ácido sulfámico con 1 de la cantidad de corpúsculo calcáreo obtenido) y se disolvió usando un vortex a máxima velocidad por 1 min. Luego se procedió a centrifugar a 15000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante fue colectado y el precipitado residual fue tratado nuevamente con 0,1 M de solución de ácido sulfámico y así sucesivamente hasta la disolución completa de los corpúsculos calcáreos. Durante este proceso, los corpúsculos fueron observados al microscopio para confirmar la disolución. Todos los sobrenadantes obtenidos fueron congelados a -70 °C hasta su requerimiento y evaluación.

3.1.3. Medición de proteínas (Field & Field, 2010)

La medición de proteínas se realizó de los sobrenadantes obtenidos en la disolución de corpúsculos calcáreos. Se realizó el ensayo en microplaca de 96 pocillos. Para ello, se tomaron 20 µL de muestra con 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) diluido 1:50 con agua destilada, se incubo la mezcla por 5 min a temperatura ambiente, en oscuridad y se midieron colorimétricamente las concentraciones de proteínas a 660 nm. Se realizó la curva de calibración empleando albumina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones: 0; 5; 10; 20; 40; 80; 100 y 200 µg/mL. Se realizó la lectura en lector de microplaca (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA).

3.1.4. Electroforesis para la detección de proteínas asociadas a corpúsculos calcáreos (Yábar, 2003)

Se realizó la electroforesis para proteínas, conforme al “manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN” (Instituto Nacional de Salud del Perú), en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (gel de apilamiento y de corrida) al 10%. Una vez preparado el gel y dentro de la cámara electroforética (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell - BioRad) con el buffer de corrida (Tris-Base 0,25 M, glicina 2 M, SDS 1%) se agregaron 20 μ L de cada muestra preparada (35 μ L sobrenadante, 10 μ L buffer de muestra 5X y 5 μ L glicerol) y marcador de peso molecular (pre-teñido de Bio-Rad 161-0318) a cada carril. La electroforesis se realizó a 80 V por 15 min para el gel de apilamiento y 130 V por 2 horas para la corrida electroforética. Se evidencio la presencia de las bandas proteicas utilizando el kit de tinción de plata (Silver Stain Plus-BioRad).

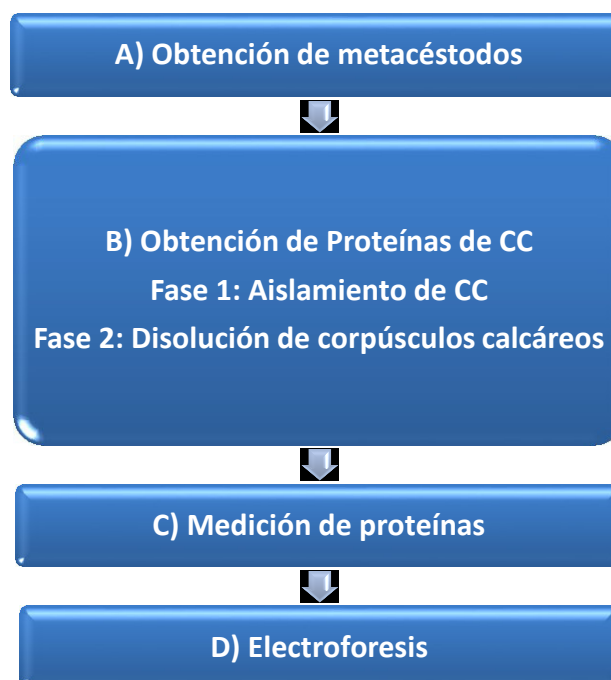


Figura 6. Flujograma del proceso de obtención del perfil de proteínas de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*

3.2. Selección de anticuerpos monoclonales contra corpúsculos calcáreos de *Taenia Solium*: Inmunofluorescencia (Yang, 2004)

Se cuenta con un total de 18 anticuerpos monoclonales (ver Anexo 1)

Para realizar la selección de los anticuerpos monoclonales que reconozcan proteínas asociadas a corpúsculos calcáreos se realizó una evaluación por inmunofluorescencia. Para ello se utilizaron dos tipos de muestras: Tejido de parásito y corpúsculos fijados a láminas portaobjeto.

3.2.1. Inmunofluorescencia en Tejido parásito (Yang, 2004)

Se emplearon cortes (4 μm) de tejido de cisticercos fijados en formol 4% y parafinados, para luego transferidos a láminas portaobjeto pre-tratadas con poli-L-lisina. Las muestras fueron desparafinadas hasta ser rehidratadas. El desenmascaramiento antigénico se realizó con buffer citrato pH 6,0 a 90 °C por 30 min. Se utilizaron como anticuerpos primarios a los nuevos monoclonales producidos en el Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis (18 anticuerpos monoclonales), como segundo anticuerpo se utilizó un anti-ratón (anti IgG+anti IgM) marcado con DyLigh. Las muestras fueron evaluadas en un microscopio de Inmunofluorescencia Carl Zeiss, y las imágenes capturadas por una cámara Canon PowerShot A3300 IS de 8,2 mega pixels.

3.2.2. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos (Yang, 2004)

Se realizó la fijación de corpúsculos calcáreos (aislados previamente de metacéstodos de *Taenia solium* hasta tenerlos puros en solución), se colocó una gota de 15 μL en láminas portaobjetos tratadas previamente con poli-L-lisina, para luego dejarlas secar a temperatura ambiente y fijarlas en alcohol 70° por 20 min. Se realizó la prueba de Inmunofluorescencia en estas muestras empleando el mismo esquema utilizado para tejido. Los anticuerpos primarios fueron los nuevos anticuerpos monoclonales (18 anticuerpos monoclonales), como

anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón (anti IgG+ anti IgM) marcado con DyLigh. Las muestras fueron evaluadas en un microscopio de Inmunofluorescencia Carl Zeiss, y las imágenes capturadas por una cámara Canon PowerShot A3300 IS de 8,2 mega pixels.

3.3. Inmunodetección de proteínas usando anticuerpos monoclonales TsW por Western blot (Ayala-Sulca & Miranda-Ulloa, 2015)

Se desarrolló la electrotransferencia de proteínas del gel de electroforesis a papel de nitrocelulosa. Se emplea el buffer de transferencia (Tris-Base 25mM, glicina 192 mM, metanol 20 % en un litro de agua miliQ) a 70V por 1 hora. Se cortaron las tiras de papel nitrocelulosa conteniendo las proteínas transferidas para realizar la inmunodetección.

Se incubaron las tiras en solución de bloqueo (PBS, leche 10 %, Tween 20 0,05 %) en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS – tween 20 0,05 %. Seguidamente se incubó con los anticuerpos monoclonales seleccionados a la concentración de 10 µg/mL diluidos en PBS Tween 20 0,05 % a temperatura ambiente en agitación constante por 2 horas. Posteriormente se realizaron tres lavados y se agregó anticuerpo secundario de cabra anti ratón marcado con biotina y peroxidasa (Goat anti mouse biotin ab6788) diluido a 1:5000 en PBS tween 20 0,05 % y leche 2 %, en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas y revelado con estreptavidina sustrato precipitante de 10 a 15 minutos, conforme aparecen las bandas.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención del perfil de proteínas de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*

4.1.1. Obtención proteínas de corpúsculo calcáreo

La metodología propuesta, basada en dos métodos diferentes, fue desarrollada y aplicada con éxito para la obtención de corpúsculos calcáreos y sus proteínas asociadas en cisticerco de *Taenia solium*. La metodología consta de dos fases: la primera es la extracción de los corpúsculos calcáreos y la segunda la obtención de sus proteínas. En la figura 7 se muestra el esquema utilizado para la extracción de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*

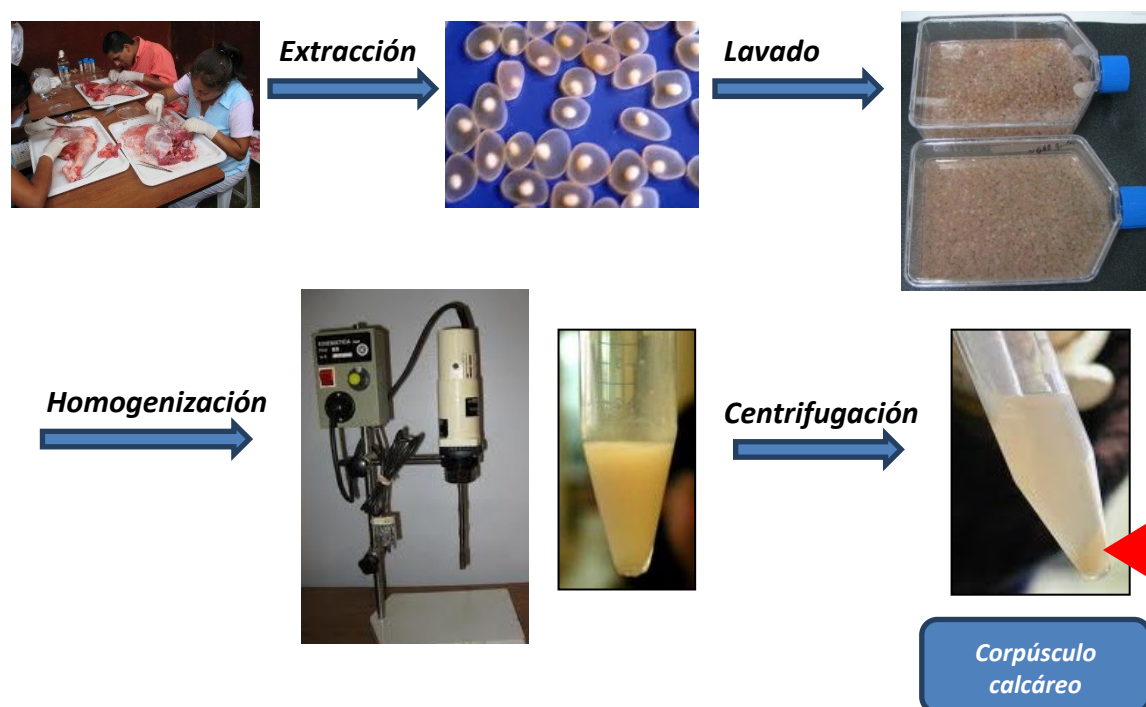


Figura 7. Obtención de cisticercos de *Taenia solium* y Fase 1: Aislamiento de corpúsculos calcáreos de cisticerco de *Taenia solium*.

Luego de varios pasos de lavado se obtuvo un sedimento limpio sin restos celulares, tal como se puede apreciar en la figura 8.

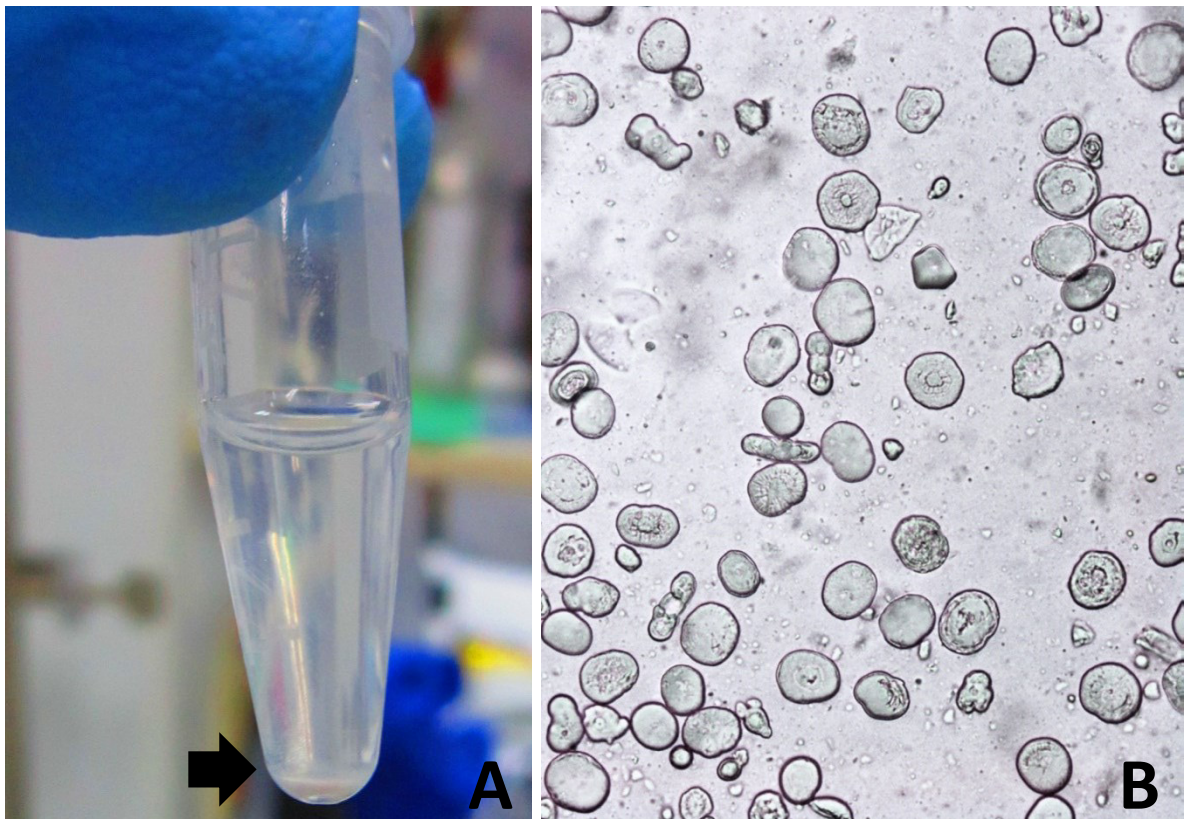


Figura 8. Corpúsculos calcáreos de *Taenia solium*. (A) Precipitado blanquecino correspondiente a corpúsculos calcáreos (flecha negra). (B) Corpúsculos calcáreos vistos al microscopio con resolución a 400 X.

Posterior a la obtención de corpúsculos calcáreos, se procedió con la disolución empleando la solución de ácido Sulfámico. Obteniéndose 15 sobrenadantes hasta la completa disolución. En el precipitado numero 15 ya no se observó corpúsculos calcáreos visto por microscopio óptico.

4.1.2. Medición de proteínas de corpúsculo calcáreo

Se realizó la medición de proteínas de los 15 sobrenadantes obtenidos por duplicado. Se calcularon los resultados según la curva de calibración obtenida con BSA (Figura 9)

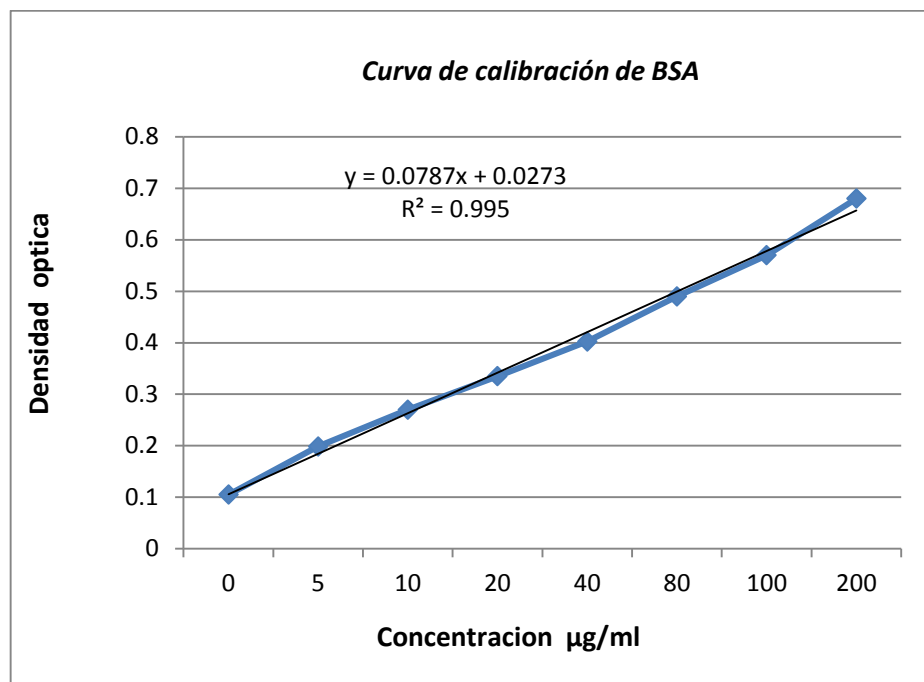


Figura 9. Curva de calibración con albumina sérica bovina medido por método Bradford

Cuadro 1. Concentración de proteínas obtenidas en los sobrenadantes de la disolución de los corpúsculos calcáreos

Sobrenadante numero	Densidad óptica \bar{X}	Concentración $\mu\text{g/mL}$
1	0,333	32,317
2	0,324	30,540
3	0,332	32,120
4	0,311	27,973
5	0,322	30,145
6	0,322	30,145
7	0,334	32,515
8	0,985	161,071
9	0,692	103,211
10	0,49	63,321
11	0,38	41,598
12	0,337	33,107
13	0,312	28,170
14	0,365	38,636
15	0,29	23,826

En el cuadro 1 los sobrenadantes 8 y 9 presentan la mayor concentración de proteínas de corpúsculos con **161,07 y 103,21 $\mu\text{g/mL}$** respectivamente. Los cuales fueron utilizados en la identificación electroforetica utilizando la máxima concentración.

4.1.3. Identificación de proteínas de corpúsculo calcáreo

Se tomaron alícuotas de los sobrenadantes números: 1, **8, 9**, 13, 14, 15 para evaluar las proteínas de corpúsculos calcáreos por electroforesis, en su máxima concentración (ver Figura 10).

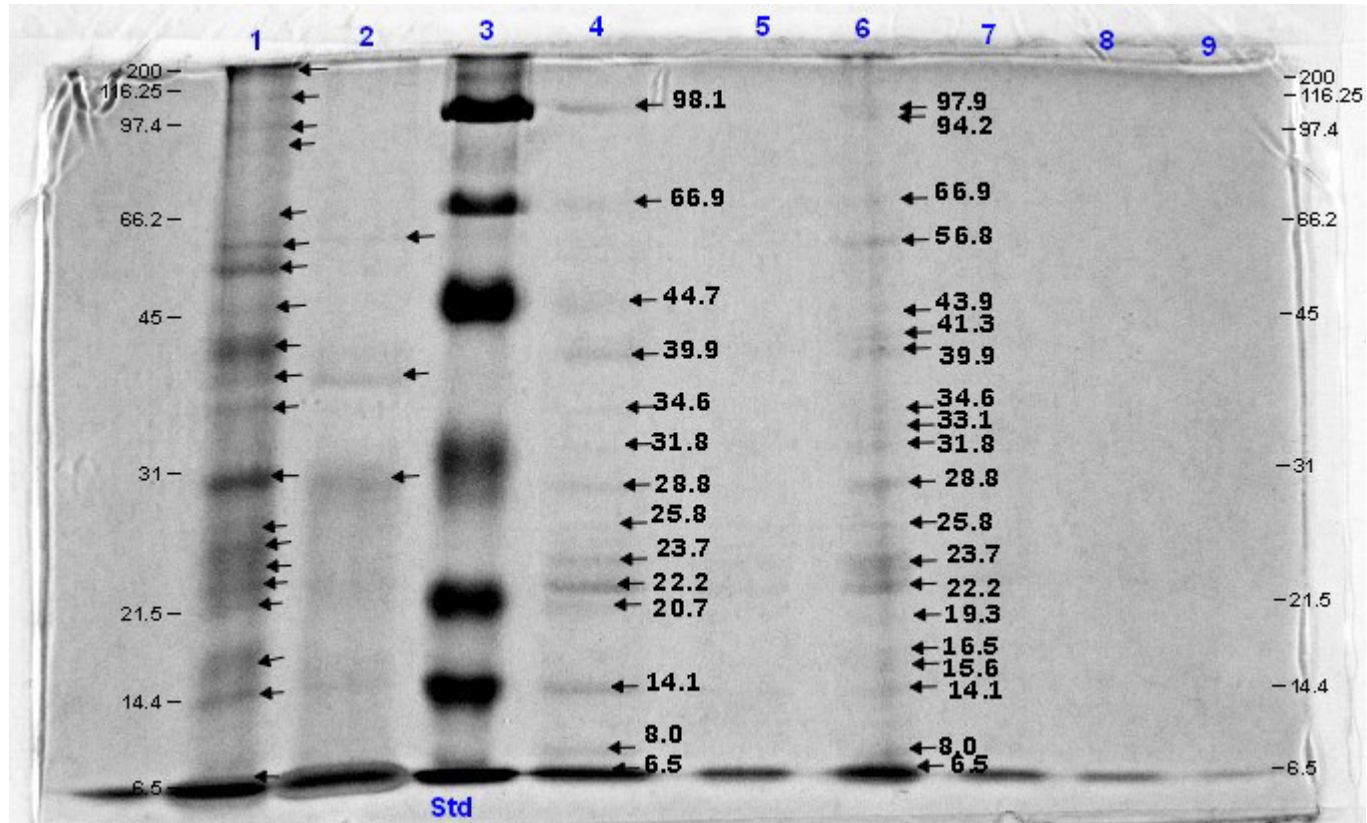


Figura 10. Electroforesis de proteínas de corpúsculo calcáreo. Carril número 1: Antígenos de cisticerco completo de *Taenia solium*; **2:** Antígenos de Fluido vesicular de cisticerco de *Taenia solium*; **3:** Marcador de Peso molecular; **4:** Sobrenadante 8; **5:** Sobrenadante 1; **6:** Sobrenadante 9; **7:** Sobrenadante 13; **8:** Sobrenadante 14; **9:** Sobrenadante 15. Visualizados con tinción de plata.

Se identificaron 14 proteínas en el sobrenadante 8 con los siguientes pesos moleculares: 98,1; 66,9; 44,7; 39,9; 34,6; 31,8; 28,8; 25,8; 23,7; 22,2; 20,7; 14,1; 8,0; 6,5 kDa. En el 9 se observan las proteínas de: 66,9; 39,6; 34,6; 31,8; 28,8; 25,8; 23,7; 22,2; 14,1; 8,0; y 6,5 kDa, similares al sobrenadante 8 y 9 moléculas adicionales de: 97,9; 94,2; 56,8; 43,9; 41,3; 33,1; 19,3; 16,5 y 15,6 kDa (Figura 10).

Se identificaron en total 23 proteínas de corpúsculo calcáreo. Se juntaron los sobrenadantes con mayor concentración de proteínas (Sobrenadantes 8 y 9) para obtener el total de proteínas de corpúsculos calcáreos aisladas y realizar la electrotransferencia, a papel de nitrocelulosa a fin de poder identificarlos con los anticuerpos monoclonales.

Se realizó el análisis de las proteínas encontradas en corpúsculos calcáreos, en base a su peso molecular, con las proteínas descritas para *Taenia solium* según la literatura y base de datos Unipot, NCBI y GenBank (Ver cuadro 2).

Se seleccionaron las proteínas, reportadas para *Taenia solium*, que concordaban con los pesos moleculares encontrados en corpúsculos calcáreos. Aquellas moléculas cuyos pesos moleculares no se encontraban dentro del grupo de proteínas de *Taenia solium*, fueron analizadas en la base de datos para otros céstodos.

Cuadro 2. Proteínas (n=23) de corpúsculos calcáreos que correlacionan con las descritas para *Taenia solium* y otros céstodos de la base de datos de Uniprot, NCBI y GenBank según su peso molecular.

PM proteínas de CC (kDa)	Nombre proteína (*)	Código UniProt	Origen	Función / Proceso biológico
98,1	Periodic tryptophan protein 2	A0A068Y9K0	<i>Echinococcus multilocularis</i>	No Descrito
97,9	Proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF	A0A068YCD5	<i>Echinococcus multilocularis</i>	No Descrito
94,2	Supresor de la señalización de citoquina 7	A0A068YIB8	<i>Echinococcus multilocularis</i>	No Descrito
66,9	c-fos	Q6T525	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
56,8	Mariner Mos1 transposasa	A0A068XKM7	<i>Hymenolepis microstoma</i>	No Descrito
44,7	Citocromo C oxidasa subunidad 1	A0A9I5	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
43,9	Proteína putativa similar a peroxidasa	A0PFW1	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
41,3	Citocromo B	Q94PH7 A0A068X7Z4	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
39,9	Proteína quinasa dependiente de AMPc subunidad catalítica	A0A1L2EDK1	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
34,6	NADH deshidrogenasa subunidad 2	Q8M6L0	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
33,1	Antígeno diagnóstico GP50a	Q6XR70	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
31,8	Proteína de oncósfera Tso22e (Fragmento)	Q08EV9	<i>Taenia solium</i>	Regulación de la contracción muscular
28,8	Oxidoreductasa NADH-ubiquinona cadena 1	A0A1L2DBR2	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
25,8	Ts1	A7U7M1	<i>Taenia solium</i>	Transporte vacuolar
23,7	Citocromo C oxidasa subunidad 3 (Fragmento)	Q957Q4	<i>Taenia solium</i>	Cadena de transportadores de electrones aeróbicos
22,2	Citocromo C oxidasa subunidad 2	A0A1L2DBR1	<i>Taenia solium</i>	Cadena de transporte de electrones
20,7	Proteína putativa no caracterizada (Fragmento)	Q8MPD8	<i>Taenia solium</i>	No descrito
19,3	Proteína putativa similar a la insulina	V5NC99	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
16,5	ATP sintasa F0 subunidad 6 (Fragmento)	A0A1L2DBU0	<i>Taenia solium</i>	Síntesis de ATP acoplado al transporte de protones
15,6	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] **	Q8WRF5	<i>Taenia solium</i>	Destruye los radicales que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos.
14,1	Citocromo c oxidasa subunidad 1	A0A076E590	<i>Taenia solium</i>	Respiración aerobias, fosforilación oxidativa
8,0	Proteína antigénica (Fragmento)	Q9BJX0	<i>Taenia solium</i>	No Descrito
6,5	Proteína putativa no caracterizada	Q8MPD9	<i>Taenia solium</i>	No Descrito

(*) El nombre de la proteína es adoptado del Gen Bank Data Base

(**) Es la proteína mayor descrita de la lista presentada, presenta además su estructura cristalográfica en 3D.

PM: Peso molecular, CC: corpúsculo calcáreo

4.2. Selección de anticuerpos monoclonales de *Taenia solium* (AcMo Ts)

4.2.1. Inmunofluorescencia en tejido del parásito

Se realizó la inmunolocalización empleando los nuevos anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos de CC en cortes de tejido de parásito a través de inmunofluorescencia. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados ya que durante el desarrollo de la técnica se desprendían los corpúsculos calcáreos presentes en el tejido, lo que no permitía diferenciar a los anticuerpos que reaccionaban de manera positiva o negativa a corpúsculos calcáreos. Por ello, el método de selección, o evaluación de los nuevos anticuerpos, empleó como muestra corpúsculos calcáreos fijados en lámina. Se realizó la evaluación en tejido de todos los anticuerpos, en la figura 11 se muestran algunos de ellos.

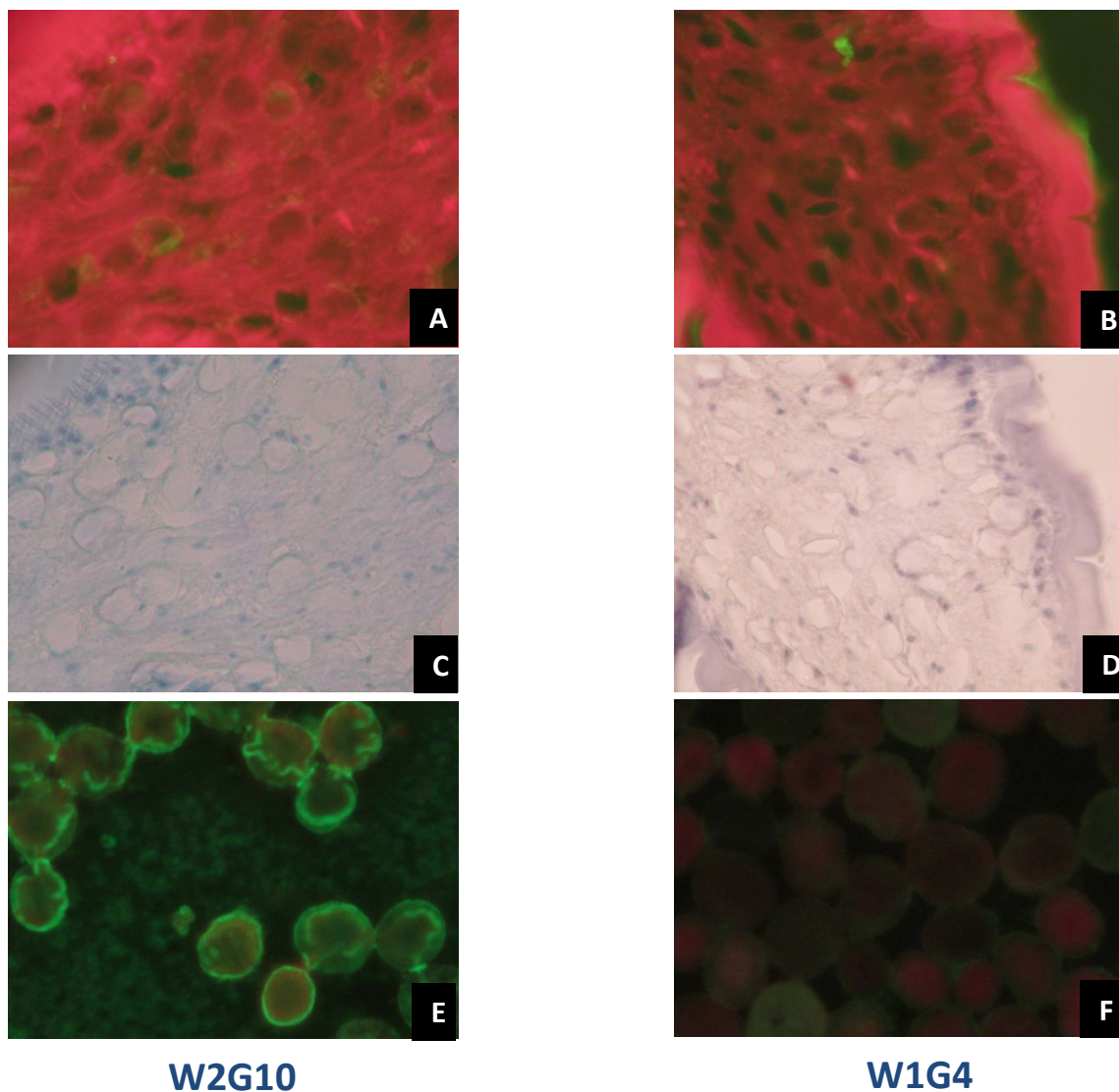


Figura 11. Comparación de Inmunofluorescencias en Tejido de cisticerco y corpúsculos calcáreos fijados en lámina.

La figura describe los dos tipos de muestras que fueron empleadas para la evaluación de los anticuerpos monoclonales. A, B, C y D corresponden a tejido del parásito, mientras que E y F a corpúsculos calcáreos. Las figuras del lado izquierdo muestran la reacción con el anticuerpo W2G10 que es positivo a CC, las del lado derecho muestran la reacción con el anticuerpo W1G4 negativo a CC. Se observa que no hay una diferencia entre un anticuerpo positivo o negativo a CC en tejido de parásito. Mientras que la diferencia de la reacción es evidente en las figuras E y F que son la que contiene CC fijados a la lámina. A, B, C y E a 200X y E y F a 400X.

4.2.2. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos fijados en lámina

Se realizó la inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos fijados en lámina marcando con anticuerpos monoclonales Ts (anticuerpo primario) y anticuerpo anti ratón + Dylight (anticuerpo secundario) (ver Figura 12). Se obtuvieron siete anticuerpos con reacción positiva a corpúsculos calcáreos, uno anticuerpo con reacción indeterminada y 10 anticuerpos negativos (ver Figuras 13-19). Los corpúsculos calcáreos tienen cierta inmunofluorescencia natural, que es muy distinta, inespecífica y menos intensa que la reacción con el fluoróculo Dy Light. Se seleccionaron 10 anticuerpos monoclonales (ver Cuadro 3) siete anticuerpos con reactividad positiva, uno con reactividad indeterminada, y dos reactividad negativa seleccionados al azar; para realizar la siguiente evaluación a través de western Blot. La evaluación de la reactividad a corpúsculos calcáreos empleando estas estructuras fijadas a láminas sin mayor tratamiento previo, resultó ser mejor que utilizar tejido de parásito con tratamiento histológico fijado a lámina, ya que permitió visualizar mejor los resultados debido a que no había pérdida de muestra permitiendo seleccionar adecuadamente a los anticuerpos monoclonales reactivos a proteínas de corpúsculo calcáreo.

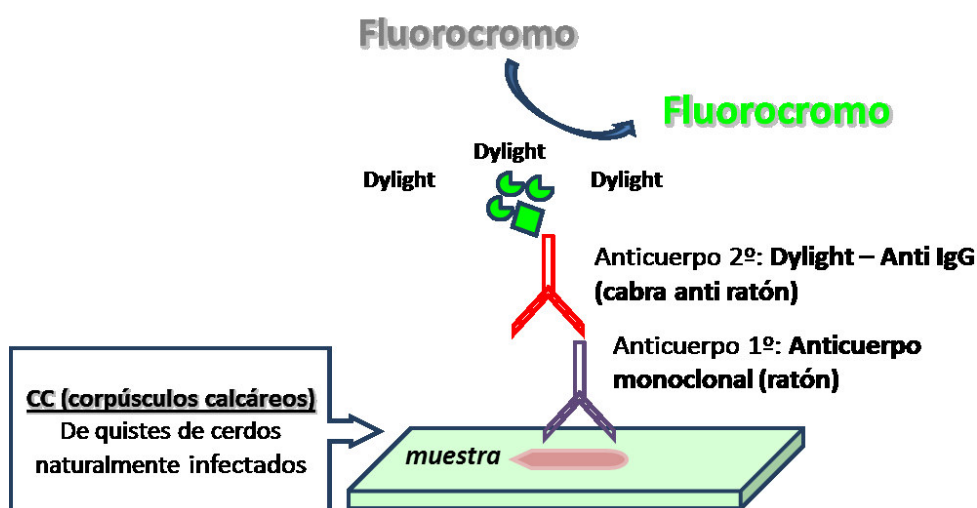


Figura 12. Esquema empleado para la evaluación por inmunofluorescencia.

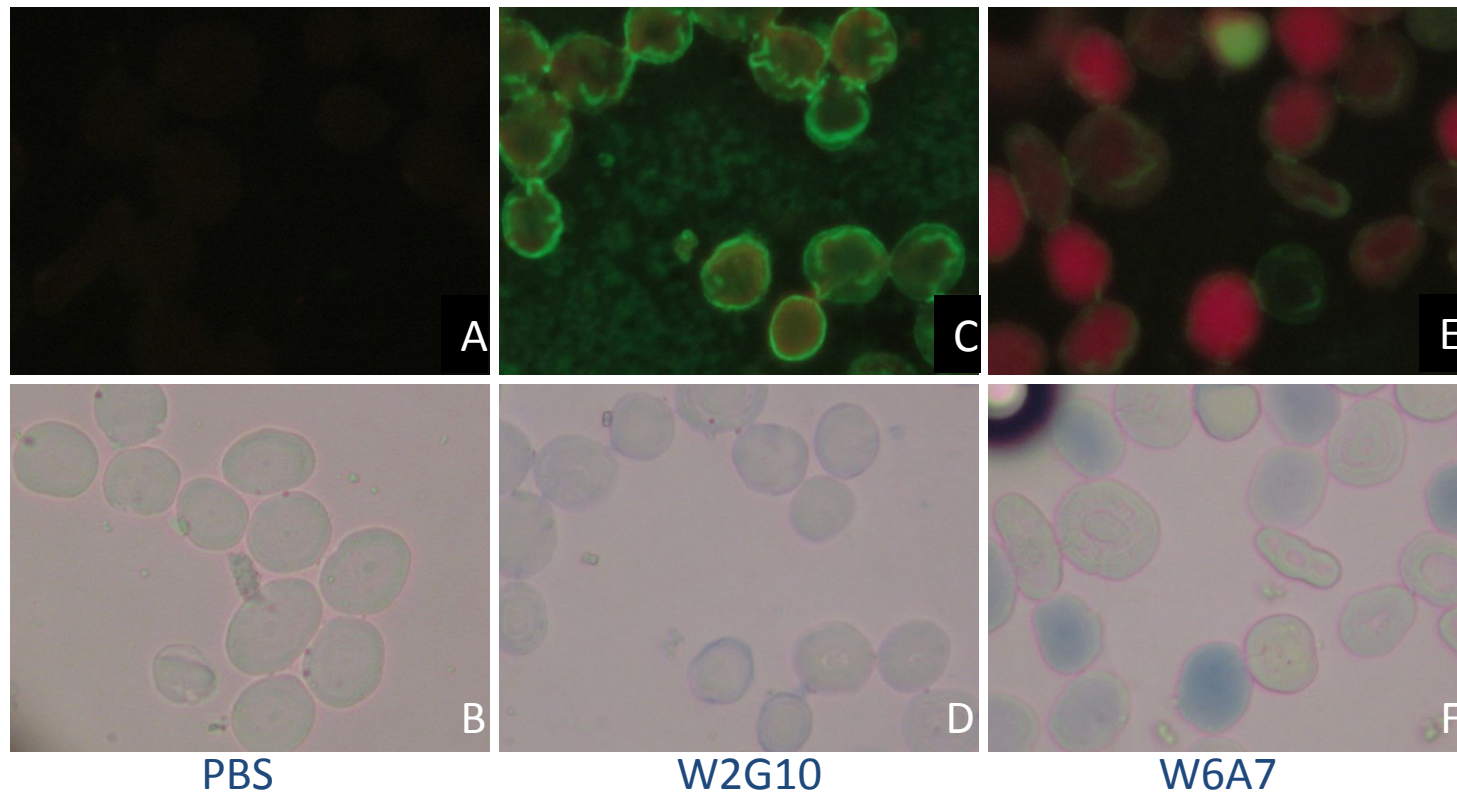


Figura 13. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Control de PBS; C y D, Reacción positiva con anticuerpo **W2G2**; E y F, Reacción Positiva con anticuerpo **W6A7**, Las imágenes superiores vistas con filtro fluorescente y las inferiores con luz visible. Aumento 400X

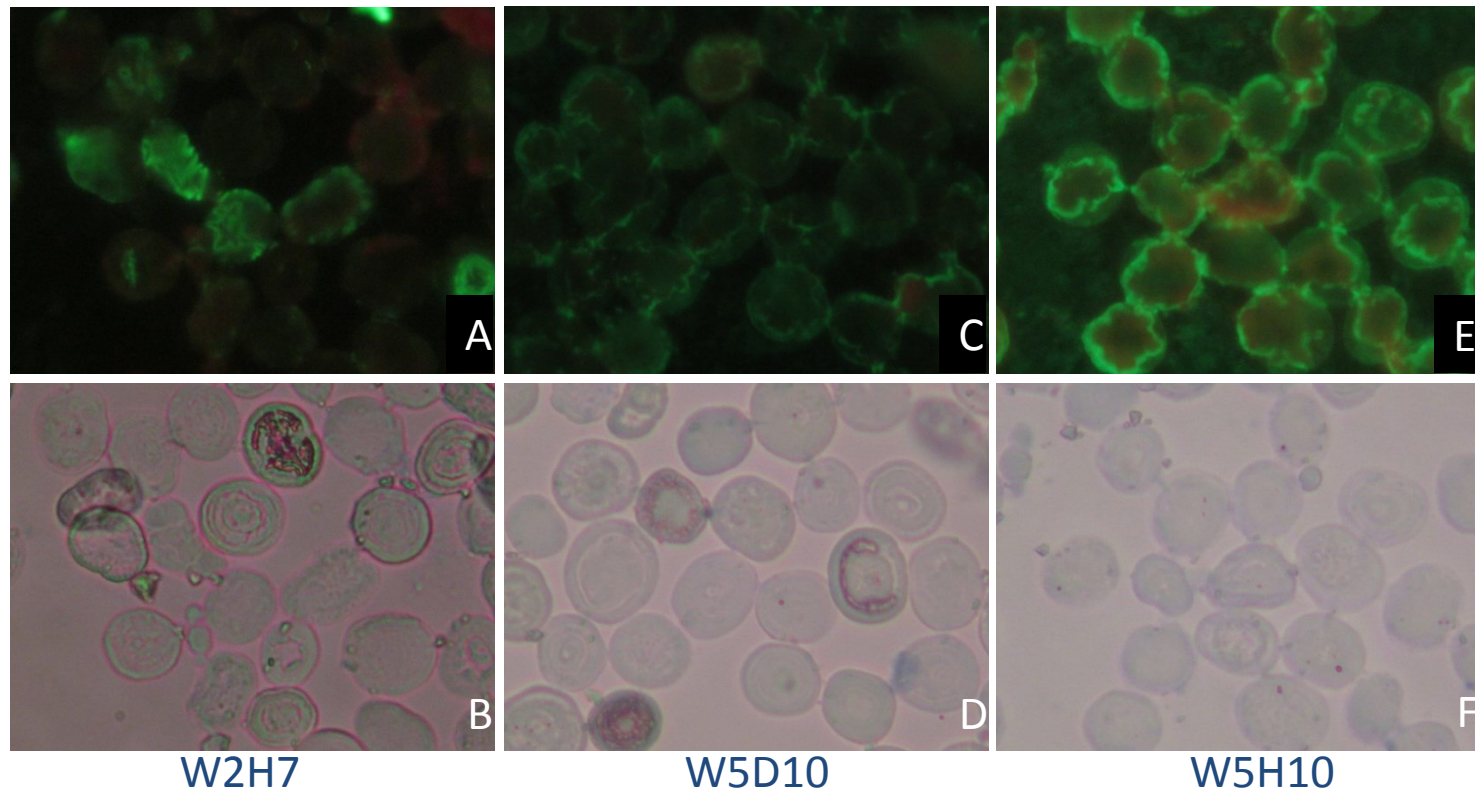


Figura 14. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Reacción Positiva con anticuerpo **W2H7**; C y D, Reacción positiva con anticuerpo **W5D10**; E y F, Reacción Positiva con anticuerpo **W5H10**; Las imágenes superiores vistas con filtro fluorescente y las inferiores con luz visible. Aumento 400X

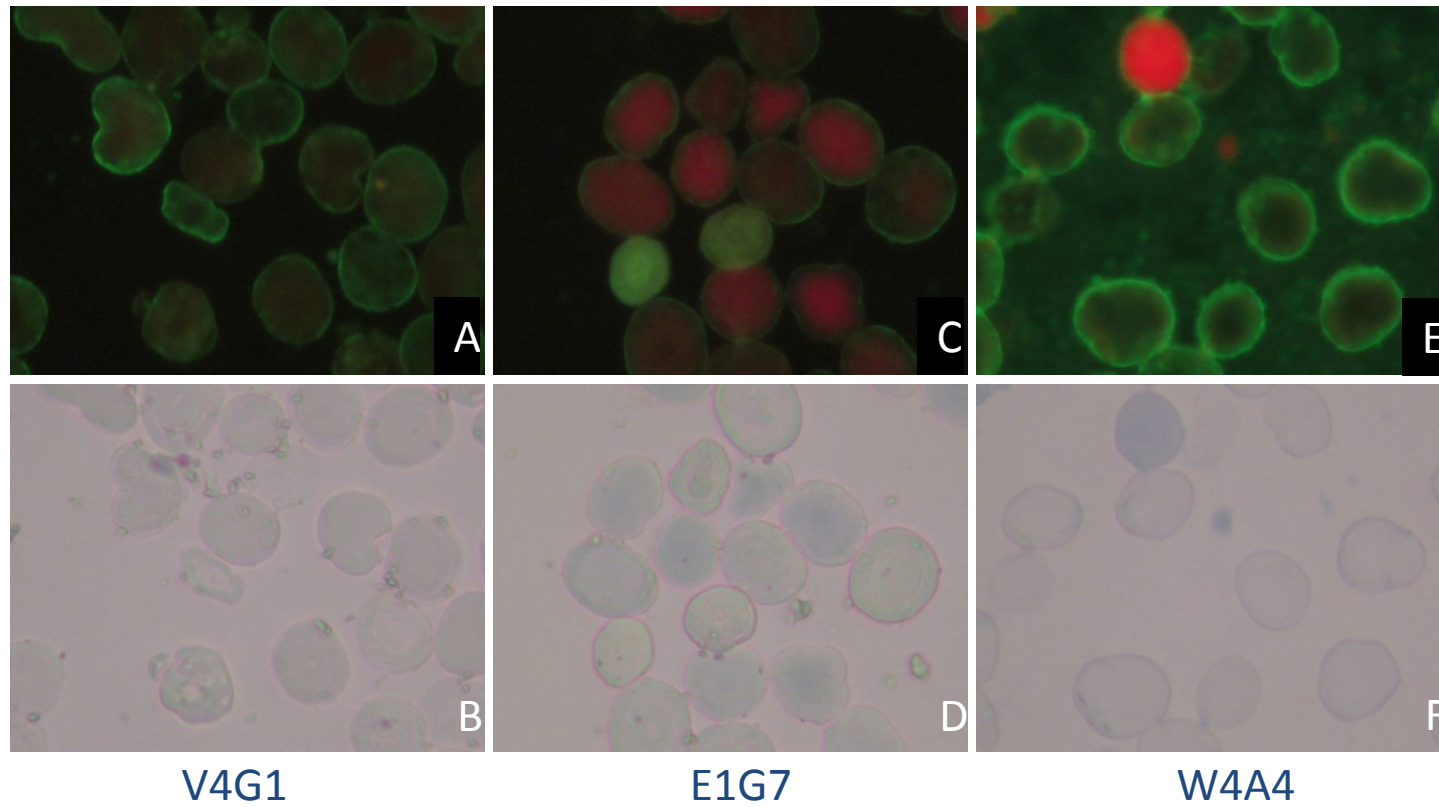


Figura 15. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Reacción Positiva con anticuerpo **V4G1**; C y D, Reacción positiva con anticuerpo **E1G7**; E y F, Reacción indeterminada con anticuerpo **W4A4**; Las imágenes superiores vistas con filtro fluorescente y las inferiores con luz visible. Aumento 400X

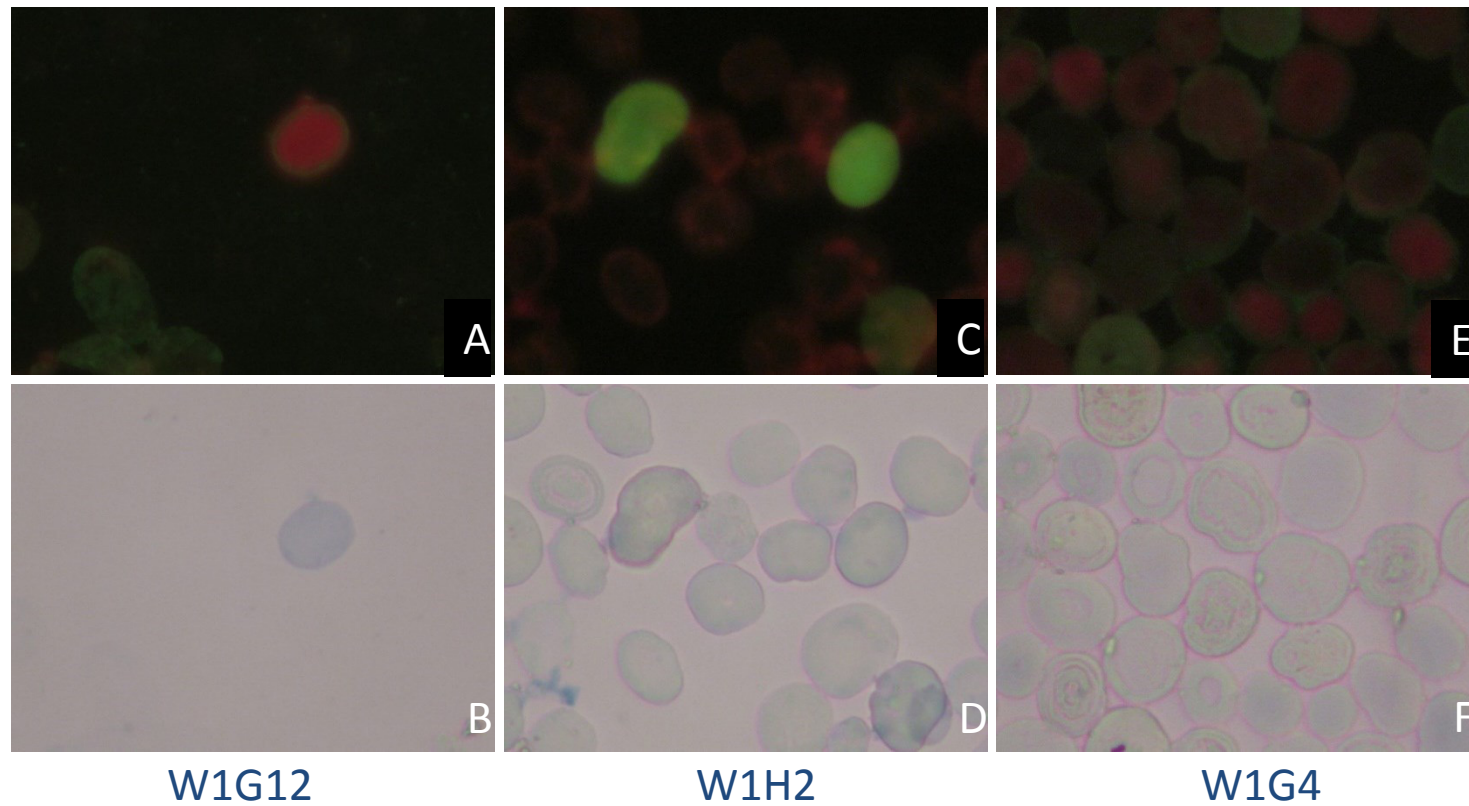


Figura 16. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Reacción negativa con anticuerpo **W1G12**; C y D, Reacción negativa con anticuerpo **W1H2**; E y F, Reacción negativa con anticuerpo **W1G4**; Las imágenes superiores vistas con filtro fluorescente y las inferiores con luz visible. Aumento 400X

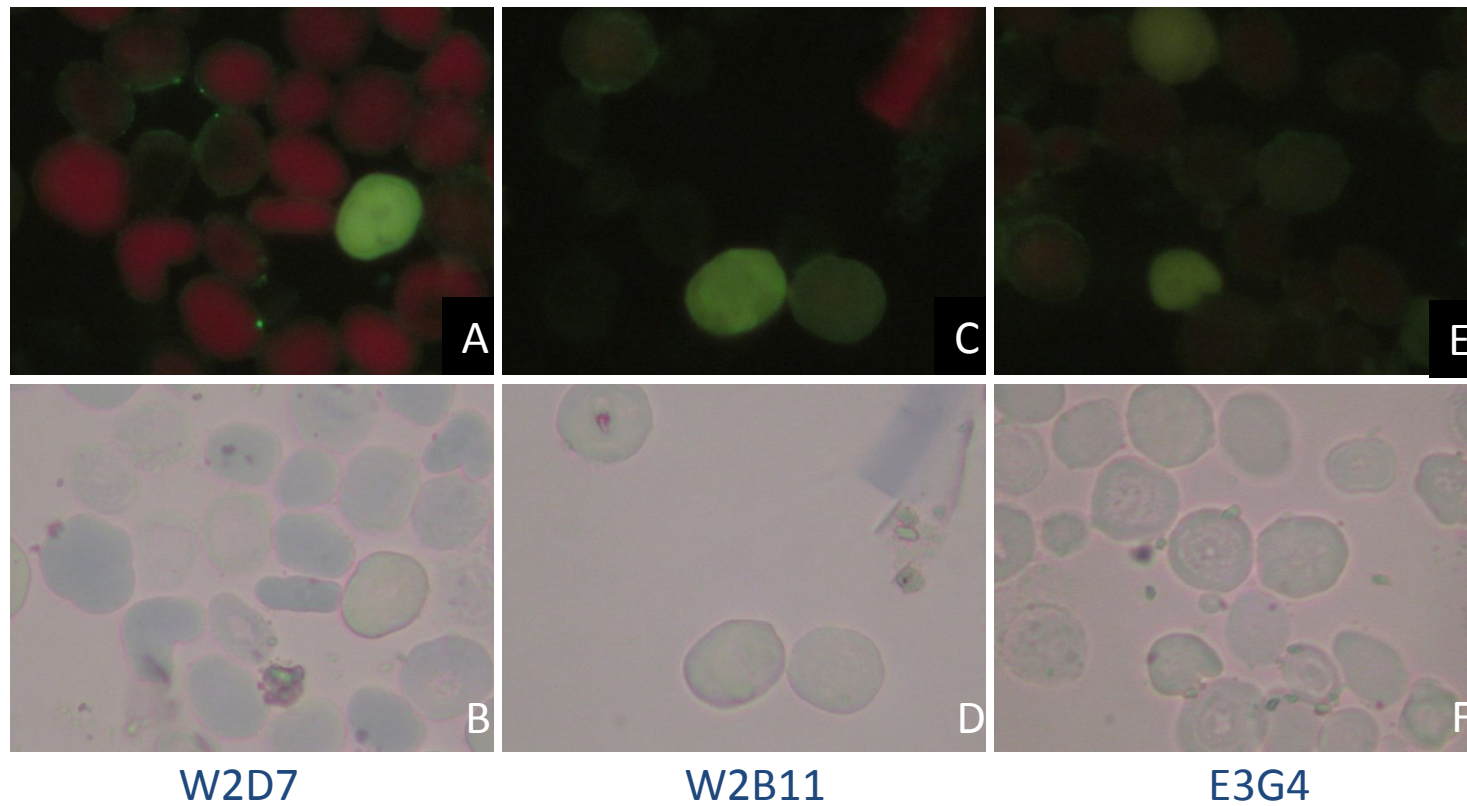


Figura 17. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Reacción negativa con anticuerpo **W2D7**; C y D, Reacción negativa con anticuerpo **W2B11**; E y F, Reacción negativa con anticuerpo **E3G4**; Las imágenes superiores vistas con filtro fluorescente y las inferiores con luz visible. Aumento 400X

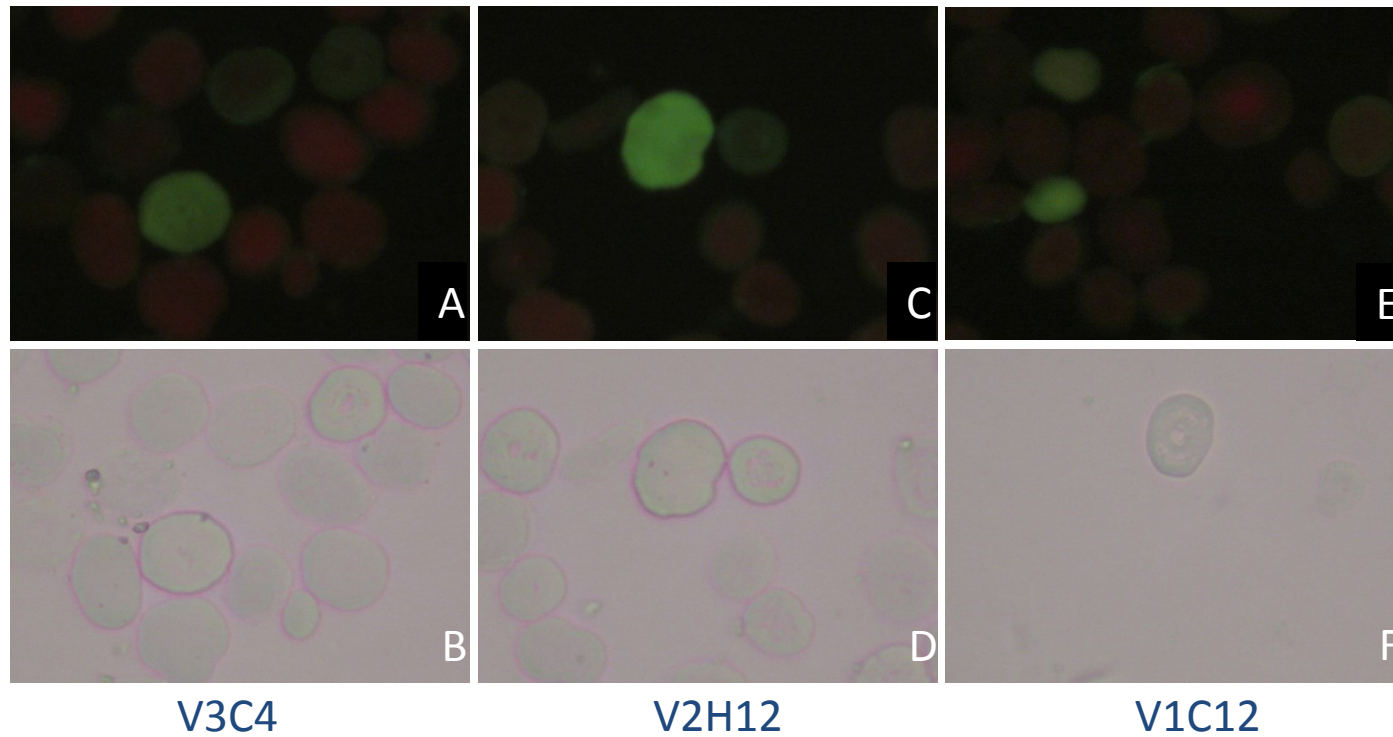


Figura 18. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Reacción negativa con anticuerpo **V3C4**; C y D, Reacción negativa con anticuerpo **V2H12**; E y F, Reacción negativa con anticuerpo **V1C12**; Las imágenes superiores vistas con filtro fluorescente y las inferiores con luz visible. Aumento 400X

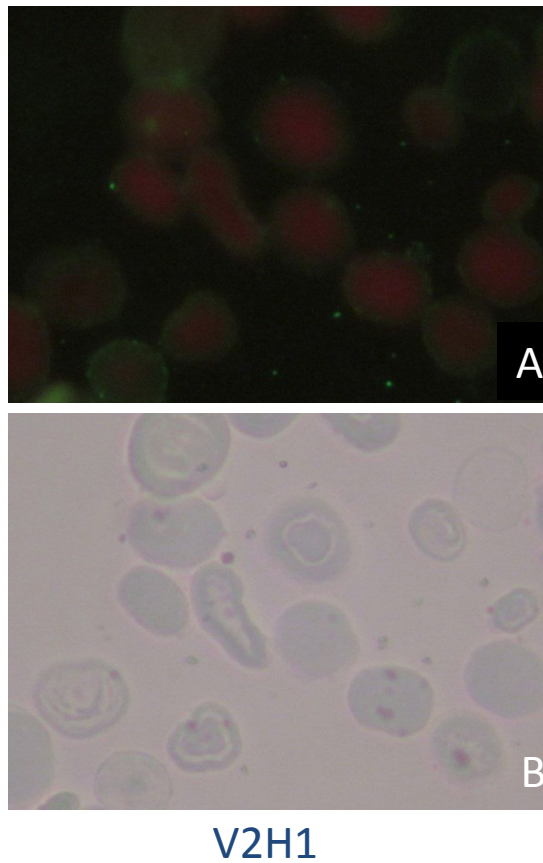


Figura 19. Inmunofluorescencia en corpúsculos calcáreos. A y B, Reacción negativa con anticuerpo **V2H1**; La imagen superior vista con filtro fluorescente y la inferior con luz visible. Aumento 400X

Cuadro 3. Anticuerpos monoclonales seleccionados en base a su reactividad a corpúsculos calcáreos fijados en lámina

Clona	Código Interno	Antígeno empleado para su producción	Isotipo	Resultado de Fluorescencia	Para su evaluación en Western Blot(*)
TsW1	W2G10	Antígeno Completo	IgM	Positiva	Seleccionado
TsW2	W4A4	Antígeno Completo	IgM	Parcial	Seleccionado
TsW3	W1G12	Antígeno Completo	IgG1	Negativa	No seleccionado
TsW4	W2D7	Antígeno Completo	IgM	Negativa	No seleccionado
TsW5	W1H2	Antígeno Completo	IgG1	Negativa	No seleccionado
TsW6	W2B11	Antígeno Completo	IgG3	Negativa	Seleccionado
TsW7	W1G4	Antígeno Completo	IgM	Negativa	No seleccionado
TsW8	W6A7	Antígeno Completo	IgM	Positiva	Seleccionado
TsW9	W2H7	Antígeno Completo	IgG3	Positiva	Seleccionado
TsW10	W5D10	Antígeno Completo	IgG1	Positiva	Seleccionado
TsW11	W5H10	Antígeno Completo	IgM	Positiva	Seleccionado
TsV1	V4G1	Fluido Vesicular	IgG1	Positiva	Seleccionado
TsV2	V1C12	Fluido Vesicular	IgG1	Negativa	No seleccionado
TsV3	V2H12	Fluido Vesicular	IgG1	Negativa	Seleccionado
TsV4	V3C4	Fluido Vesicular	IgG4	Negativa	No seleccionado
TsV5	V2H1	Fluido Vesicular	IgG2a	Negativa	No seleccionado
TsE1	E3G4	Excreción / Secreción	IgM	Negativa	No seleccionado
TsE2	E1G7	Excreción / Secreción	IgG3	Positiva	Seleccionado

(*) Selección de todos los resultados positivos, parciales y de manera al azar los 2 negativos

4.3. Inmunodetección de proteínas antigénicas de corpúsculo calcáreo

Se realizó el Western Blot empleando los anticuerpos seleccionados previamente (Cuadro 3). Como control positivo se usó suero de ratón inmunizado con antígeno completo del parásito (metacéstodo), como control negativo solución PBS. Todos los anticuerpos monoclonales seleccionados como “positivos” en lámina, marcaron bandas en el western blot. El anticuerpo seleccionado como “reacción indeterminada” en lámina, no marco ninguna banda, lo que sugiere que la reactividad evidenciada al microscopio se trató sólo de sobre concentración del anticuerpo lo que ocasiona un depósito inespecífico mejorándose con mayor tiempo de bloqueo.

Los anticuerpos W2H7, W5D10, W2G10, W5H10 y W6A7 identificaron las moléculas de 66,9; 56,8; y 6,5 kDa. El Anticuerpo E1G7 identificó moléculas de 98,1; 97,9; 94,2; 66,9; 6.5 kDa. El anticuerpo V4G1, muy similar al anterior identifico moléculas de 97,9; 94,2; 66,9 y 6.5 kDa y de manera intensa la molécula de 66,9 kDa. Los anticuerpos W4A4, V2H12 y W2B11 no marcaron ninguna banda (ver Figura 20 y Cuadro 4).

El análisis de las moléculas identificadas por los nuevos anticuerpos monoclonales, así como las moléculas que no fueron detectadas pero que se encuentran presentes en corpúsculos calcáreos fueron realizados utilizando la base de datos Uniprot para *Taenia solium*, así como para otros céstodos, en base al peso molecular (ver Cuadro 5 y 6).

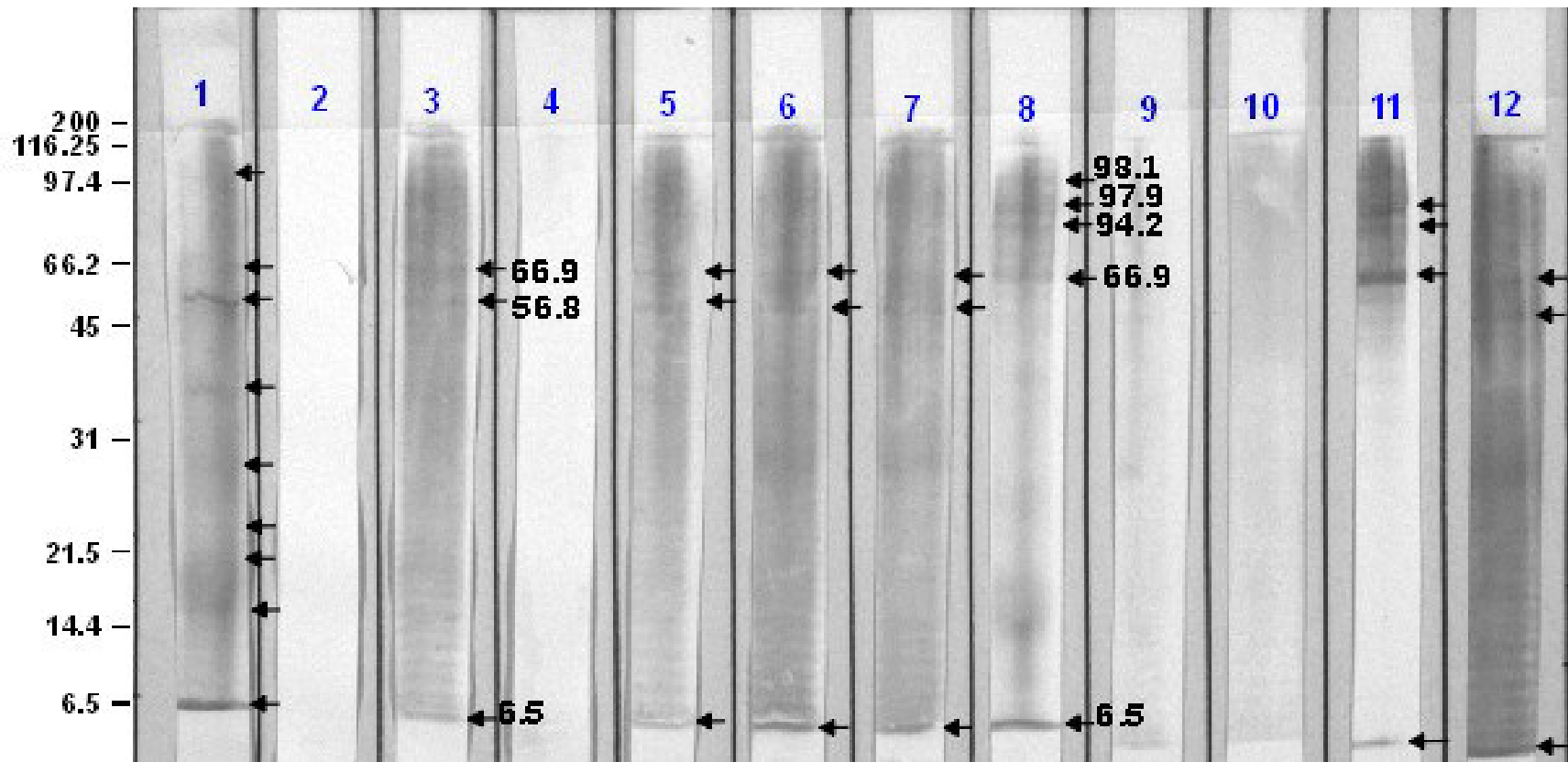


Figura 20. Western Blot de antígenos de corpúsculos calcáreos y Anticuerpos monoclonales contra *Taenia solium*. Carriles: (1) Suero +, (2) Control de PBS, (3) W2H7, (4) W4A4, (5) W5D10, (6) W2G10, (7) W5H10, (8) E1G7, (9) V2H12, (10) W2B11, (11) V4G1, (12) W6A7.

Cuadro 5. Información sobre las proteínas detectadas según la base de datos UniProt, NCBI, GenBank y hallazgos en artículos científicos

PM	Uniprot/GenBank/NCBI		Artículos científicos	
	Nombre	Origen	Origen	Referencia
98,1	Periodic tryptophan protein 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	<i>Taenia crassiceps</i>	Da Silva, 2017
97,9	Proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Ayala-Sulca 2015
			<i>Taenia solium</i>	Bae, 2010
			<i>Taenia crassiceps</i>	Da Silva, 2017
94,2	Supresor de la señalización de citoquina 7	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Ayala-Sulca 2015
			Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Yang, 2004
66,9	c-fos	<i>Taenia solium</i>	Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Ayala-Sulca 2015
			Corpusculos calcareos de <i>Echinococcus granulosus</i>	Saboulard 2003
			Extracto crudo de <i>Taenia solium</i>	Pinilla, 2003
			<i>Taenia solium</i>	Navarrete-Perea, 2006
56,8	Mariner Mos1 transposasa	<i>Hymenolepis microstoma</i>	<i>Taenia solium</i>	Rodriguez-Contreras, 1998
			<i>Taenia saginata</i>	Vicentini-Oliveira, 2010
			<i>Taenia saginata</i>	Harrison, 1989
6,5	Proteína putativa no caracterizada	<i>Taenia solium</i>	<i>Taenia solium</i>	Victor, 2012
			Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Ayala-Sulca 2015
			Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Yang, 2004
			Fluido vesicular de <i>Taenia solium</i>	Cho, 1989
			<i>Taenia saginata</i>	Vicentini-Oliveira, 2010

Cuadro 6. Resumen del perfil de proteínas encontradas en corpúsculos calcáreos identificadas con anticuerpos monoclonales anti- *Taenia solium*

PROTEÍNAS	PM	ANTICUERPOS TsW										ANTICUERPOS TsV					ANTICUERPO TsE		
		(+)					(-)					(+)	(-)				(+)	(-)	
		W2G10	W5H10	W6A7	W2H7	W5D10	W4A4	W2D7	W1G4	W1H2	W1G12	W2B11	V4G1	V3C4	V2H12	V1C12	V2H1	E1G7	E3G4
IgM	IgM	IgM	IgG3	IgG1	IgM	IgM	IgM	IgG1	IgG1	IgG3	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG3	IgM		
Periodic tryptophan protein 2	98,1																	+	
Proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF	97,9											+						+	
Supresor de la señalización de citoquina 7	94,2											+						+	
C-fos	66,9	+	+	+	+	+						+						+	
Mariner Mos1 transposasa	56,8	+	+	+	+	+													
Citocromo C oxidasa subunidad 1	44,7																		
Proteína putativa similar a peroxidasa	43,9																		
Citocromo B	41,3																		
Proteína quinasa dependiente de AMPc subunidad catalítica	39,9																		
NADH deshidrogenasa subunidad 2	34,6																		
Antígeno diagnóstico GP50a	33,1																		
Proteína de oncósfera Tso22e (Fragmento)	31,8																		
Oxidoreductasa NADH-ubiquinona cadena 1	28,8																		
Ts1	25,8																		
Citocromo C oxidasa subunidad 3 (Fragmento)	23,7																		
Citocromo C oxidasa subunidad 2	22,2																		
Proteína putativa no caracterizada (Fragmento)	20,7																		
Proteína putativa similar a la insulina	19,3																		
ATP sintasa F0 subunidad 6 (Fragmento)	16,5																		
Superóxido dismutasa [Cu-Zn] **	15,6																		
Citocromo c oxidasa subunidad 1	14,1																		
Proteína antigénica (Fragmento)	8,0																		
Proteína putativa no caracterizada	6,5	+	+	+	+	+						+						+	

Casilleros sombreados: proteínas NO detectadas por los anticuerpos monoclonales
 Casilleros en blanco: proteínas detectadas por los anticuerpos monoclonales

5. DISCUSIÓN

La neurocisticercosis es una enfermedad del sistema nervioso central, causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, muchas veces el tratamiento antiparasitario agrava la situación del paciente, es por ello que conocer y detectar moléculas implicadas en la interacción hospedero - parásito es de amplio interés.

La obtención de proteínas de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* tiene dos fases, para ello se estandarizó y empleó un método mixto. La primera fase consistió en aislar los corpúsculos calcáreos del parásito y la segunda en disolver los corpúsculos quedándonos solo con las proteínas. Para llevarlo a cabo nos basamos en las técnicas empleadas por Zurabian et al., 2015 y Park et al., 2005. El primero en mención, ofrece una técnica en la que se puede obtener los corpúsculos calcáreos de manera más concentrada, homogénea y limpia de debris celular; y Park et al., 2005 por otro lado, propone la disolución de los corpúsculos empleando ácido sulfámico 1M que permite una mayor concentración de proteínas en la muestra. Cabe resaltar que Zurabian et al., 2015 hace el aislamiento de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* mientras que Park et al., 2005 lo hace de *Spirometra erinacei*, ambos céstodos.

En nuestro caso, luego de 15 pasos de disolución obtuvimos la mayor concentración de proteínas en el sobrenadante 8 y 9 mientras que Park et al., 2005 lo obtuvo en el último sobrenadante (nº19). Todo ello evidenciado a través de la medición de proteínas de cada sobrenadante mediante la técnica de Bradford.

La identificación de proteínas se realizó a través de electroforesis donde se pudieron observar 23 bandas las cuales estaban distribuidas y concentradas en los sobrenadantes 8 y 9. Se apreciaron 14 bandas en el sobrenadante N° 8 y 20 bandas para el sobrenadante N° 9, identificando 11 bandas idénticas para ambos sobrenadantes. La importancia de disolver los corpúsculos calcáreos

completamente es debido a que a medida que estos se disuelven las proteínas son liberadas al medio, aquellas que posean alta afinidad al calcio se unirán nuevamente a aquellos fragmentos de corpúsculos calcáreos aún por disolver (Park et al., 2005). Las 23 bandas descritas corresponden en su mayoría a proteínas de *Taenia solium* y otras a proteínas de otros parásitos helmintos. (Ver Cuadro 2).

Se realizó el análisis de las proteínas encontradas en corpúsculos calcáreos en base a su peso molecular. Se realizó la búsqueda a través de la base de datos Uniprot, encontrándose cerca de 359 moléculas específicas de *Taenia solium*. Las cuales se compararon con las encontradas en corpúsculo calcáreo. Aquellas moléculas presentes en corpúsculos calcáreos que no correspondían con ninguna de la base de datos para *Taenia solium* fueron analizadas con las reportadas para otros cestodos como *Echinococcus*, *Hymenolepis*, *Taenia Saginata*, *Taenia Crassiceps*, etc. similar a lo descrito por Víctor et al., 2012.

Se encontraron varias moléculas asociadas con funciones de óxido reducción, como citocromos, NADH ubiquinona oxidoreductasa y, la proteína mejor descrita y caracterizada, la enzima superóxido dismutasa [Cu-Zn] (SOD). La enzima SOD es un Homodimero, tiene varios sitios de unión de cofactores (Cu y Zn ²⁺). Cada subunidad de la proteína se une a un ión de Cobre o Zinc. La SOD destruye los radicales que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos. Esta enzima ha sido caracterizada en función y morfología, por lo que se conoce su estructura en 3D.

Así también moléculas relacionadas con la producción de energía como ATP sintasa, moléculas antigénicas como antígeno diagnóstico GP50, familia de proteínas antigénicas 8 kDa, moléculas con actividad inmunomoduladora como supresor de señal de citoquinas 7, entre otras moléculas más con función aún desconocida.

La presencia de proteínas con capacidad antioxidante refuerza la teoría sobre la función de los corpúsculos calcáreos con respecto a la mantención de la homeostasis del medio externo, y que en tal caso no se llevaría a cabo únicamente por la secreción de material inorgánico para amortiguación de pH (Vargas-Parada & Laclette, 1999), sino también su material orgánico (Von bran & Nylen, 1970) como moléculas encargadas en hacer frente a los radicales libres que pudiera generarse por la respuesta inmunológica del hospedero.

A lo largo de estos últimos 30 años se han identificado varias proteínas de *Taenia solium* de distintos pesos moleculares y con funciones bioactivas para el diagnóstico y/o la interacción hospedero-parásito. Moléculas como enzimas, transportadores de glucosa, familia proteínas antigénicas, proteínas constitutivas de músculo, etc. (Victor et al., 2012)

La proteína superóxido dismutasa y otras enzimas antioxidantes han sido previamente reportadas en *Taenia solium* (Vaca-Paniagua, Torres-Rivera, Parra-Unda & Landa, 2008; Hernandez-Santoyo et al., 2011) y se encuentran en el genoma de este parásito. Estos hallazgos sugieren que las enzimas antioxidantes tienen un papel importante en la fisiología de *Taenia solium* y la infección, por lo tanto, podrían representar el punto de inflexión del parásito y de estar presente en los corpúsculos calcáreos reafirma la idea de que estos median y regulan el medio externo de los ataques inmunológicos. No se ha reportado en que parte o células del parásito exactamente se encuentra. Sugiere que uno de esos lugares donde está presente es en los corpúsculos calcáreos. Se sabe también que esta enzima, superóxido dismutasa, es un blanco terapéutico antiparasitario para los bencimidazoles, (Vaca-Paniagua et al., 2008).

Cabe resaltar que la formación de los corpúsculos calcáreos en *Taenia solium* que se desarrolla, a diferencia de otros céstodos, de manera extracelular en los

ductos secretorios del parásito, mediado o regulado por las células ductales que generan proyecciones hacia el interior de los ductos (microvellosidades) y que además desprenden vacuolas portando material celular, evidenciado a través del microscopio electrónico (Vargas-Parada et al., 1999). La formación de los corpúsculos en el lumen protonefridial de los ductos de excreción de *Taenia solium* sugieren que están involucrados en la neutralización de productos ácidos, osmorregulación, conservación de material inorgánico y protección contra calcificación (Vargas-Parada et al., 1999; Zurabian et al., 2005)

Los componentes de los corpúsculos calcáreos también han sido estudiados, por ejemplo, se ha reportado la presencia de aminoácidos (Von Brand & Nylen, 1970) y proteínas (Rodríguez et al., 1997) de corpúsculos calcáreos en otros parásitos como *Taenia teniformes* y *Equinococcus granulosus* respectivamente. Se postula que los corpúsculos calcáreos también pueden servir como fuente de iones para procesos como ciclo celular, control y diferenciación en el parásito (Rodríguez et al., 1997). Se ha descrito ya anteriormente que los iones de calcio participan en la diferenciación de platelmintos como *Schistosoma mansoni* (Hara, Hara, Fusco, Salafsky & Shibuya, 1993)

El estado amorfo de los corpúsculos calcáreos observados por los patrones de difracción de rayos X, permite diferentes grados de hidratación (Smith & Richards, 1993). Esto también refuerza la idea de que sus componentes podrían estar fácilmente disponibles cuando sea necesario y se podrían liberar proteínas al medio externo.

Si bien el análisis de proteínas encontradas en corpúsculos calcáreos, del presente trabajo, fue solo en base al peso molecular, nos da una aproximación de las características y perfil proteico de esta estructura del parásito y puede aportar a dilucidar la función que podría estar cumpliendo para la viabilidad e interacción hospedero-parásito.

Otros investigadores reportan proteínas encontradas en extractos antigénicos de *Taenia solium* y otros helmintos, ya sea extracto completo, fluido vesicular, o fase soluble del antígeno de metacéstodo, encontrando bandas de proteínas que son similares con lo reportado en el presente estudio como: antígenos de *Taenia saginata* de 65 y 55 kDa (Vicentini et al., 2010); glicoproteínas de *Taenia solium* de naturaleza secretoria de fluido vesicular de 22 y 95 kDa (Yang, 2004; Yang, 2000); glicoproteínas del extracto soluble de metacéstodo de *Taenia solium* de 28 kDa (Restrepo et al., 2000).

Se reportó también un antígeno de 14 kDa de extracto crudo de *Taenia solium* (Greene, Hancock, Wilkins & Tsang, 2000), también proteínas de metacéstodo de 20 kDa entre otras, potenciales para diagnóstico evaluadas por ELISA en muestras de LCR de pacientes con neurocisticercosis (Da Silva et al., 2017). Además se ha reportado glicoproteínas de diagnóstico de 24 y 14 kDa obtenidas de *Taenia solium* a las que se le cambio la conformación para exponer más epítomos antigénicos mejorando la sensibilidad diagnóstica para pacientes con un solo quiste y que tienen bajos niveles de anticuerpo en sangre frente a antígenos de *Taenia solium* (Prabhakaran, Rajshekhar, Murrell & Oommen, 2007). También fue reportado una glicoproteína de 22 kDa en fluido vesicular de *Taenia solium* (Yang, 2000).

El metacéstodo de *Taenia solium* normalmente sobrevive por más de 5 años en huéspedes humanos inmunocompetentes, con el fin de adoptar y hacer frente al ambiente hostil del huésped, el parásito debe sintetizar continuamente moléculas bioactivas que pueden modular las interacciones huésped-parásito específicas, así como regular su propia homeostasis metabólica (Bae et al., 2010). El presente trabajo se busca también estudiar la antigenicidad de las proteínas asociadas con corpúsculos calcáreos de metacéstodo de *Taenia solium*.

Zurabian et al., 2005 demostró que sueros de pacientes con Neurocisticercosis activa tenían títulos altos de anticuerpos que reconocían de 43 a más de 200 kDa, entre ellos 6 antígenos de más de 200 kDa de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* a través de ELISA y Western Blot. Así también, sugiere que las proteínas de alto peso molecular son candidatos a ser utilizados como antígenos diagnósticos, ellos utilizaron 3 gramos de parásito por lo que sugieren que es mejor emplear al parásito adulto en lugar de metacéstodo. En este trabajo empleamos metacéstodo ya que la cantidad de parásito que se recolectó fue 120 g aproximadamente.

Hemos identificado las proteínas de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* con pesos moleculares menores a 100 kDa, similar a lo reportado en otras investigaciones (Bae et al., 2010). También se ha descrito proteínas antigénicas de altos pesos moleculares (260 kDa) con capacidad de unión a calcio, en *E. granulosus*-EgCaBP1 (Rodríguez et al., 1997) y su homólogo en *Taenia solium*, fracción recombinante -TsCaBP de 32 kDa (Zurabian et al., 2005), siendo esta última sin característica antigénica frente a sueros de pacientes con neurocisticercosis, todo ello refuerza la importancia de las moléculas menores de 100 kDa identificadas en nuestro estudio como candidatos antigénicos.

La caracterización de las moléculas bioactivas del metacéstodo *Taenia solium*, que podrían estar implicadas en las alteraciones fisiopatológicas, así como el mantenimiento de la homeostasis metabólica del parásito, puede ser beneficiosa para la comprensión inclusiva de la progresión de la Neurocisticercosis (Bae et al., 2010).

Los antígenos de corpúsculos calcáreos identificados en el presente trabajo pueden ser usados para el desarrollo de pruebas diagnósticas para neurocisticercosis tal como lo proponen diversos autores (Dorny et al., 2003).

Además de su potencial uso para el diagnóstico serológico y/o en LCR, será importante determinar el papel de los componentes del corpúsculo calcáreo en la fisiología del metacésto.

La comprensión de las propiedades inmunológicas, biofísicas y biológicas detalladas de las moléculas, que podrían estar implicadas de forma crucial en las funciones celulares del metacésto de *Taenia solium*, puede contribuir no sólo a la identificación y generación de antígenos potentes, sino también a la información prometedora sobre la interacción huésped-parásito, lo cual podrían utilizarse para nuevos blancos diagnósticos y candidatos de quimioterapia y / o vacuna, (Bae et al., 2010). La investigación para caracterizar diversos patrones de reconocimiento inmunológico de individuos infectados nos permitirá demostrar nuevos biomarcadores que tienen una importancia práctica. Así también la identificación de biomarcadores y moléculas bioactivas pueden producir nuevos conocimientos esenciales en alteraciones fisiopatológicas, así como en diagnóstico precoz de neurocisticercosis (Bae et al., 2010).

Los anticuerpos monoclonales estudiados reaccionan a tres tipos de antígenos, dependiendo de su fuente de origen, estos son: antígenos de parásito completo, antígenos de fluido vesicular y antígenos de excreción-secreción. Estos anticuerpos dependiendo del antígeno que reconocen fueron catalogados como TsW, TsV y TsE, respectivamente (Paredes et al., 2016).

En la investigación evaluamos por inmunofluorescencia, a manera de seleccionar entre todos los anticuerpos presentes, aquellos que reaccionen de manera positiva a los corpúsculos calcáreos. Se seleccionaron todos aquellos que reaccionaron positivamente, y algunos negativos a fin de corroborar este resultado. Se tomó en cuenta que los corpúsculos calcáreos presentan una fluorescencia natural al observarlos por el microscopio con filtro UV. Esta fluorescencia es baja y no brillante diferenciable de la observada por el marcaje con fluoróforo DyLight (Figuras 10-16).

Los anticuerpos fueron evaluados empleando dos tipos de muestras, la primera de tejido de parásito y la segunda un concentrado de corpúsculos calcáreos fijados a lámina. Se optó por seleccionar el segundo tipo de muestra ya que en la primera los corpúsculos calcáreos se desprenden, la fijación de ellos a la lámina es ligera incluso empleando aditivos como Poli-L-lisina. Los que ocurría en menor medida en el segundo tipo de muestras, al tener una mayor cantidad de corpúsculos estos permanecían fijos en lámina a pesar de algunos desprendimientos.

Los anticuerpos monoclonales seleccionados bajo este primer paso, fueron empleados para la detección de antígenos de corpúsculos calcáreos a través de western Blot. Según los resultados encontrados, los anticuerpos monoclonales tienen la característica de ser poliespecíficos, es decir son capaces de reconocer varias moléculas. Esta característica ha sido anteriormente reportada en varias investigaciones, como las de Yan, Kuhn, & Traub, 1994; que describen la producción de un conjunto de anticuerpos monoclonales poliespecíficos, entre ellos el anticuerpo XY12 que se une tanto a la vimentina de la proteína de filamento intermedio como a los ácidos nucleicos, concluyendo que los hallazgos sugieren que la reacción cruzada de XY12 realmente ocurre en la región de unión al antígeno en lugar de otras porciones del anticuerpo. Así también Hohmann, Coleman, Comacchio, Skinner & Bradley, 1988; describen que generaron una clona de células que secretaban un anticuerpo contra antígenos epidérmicos a partir de un paciente con una lesión cutánea con ampollas. El anticuerpo IgM secretado por esta clona reaccionó con la región intercelular de la epidermis de la piel humana normal de una manera similar a los autoanticuerpos de pénfigo, además, en riñón humano normal, el anticuerpo se une a glomérulos y túbulos. También reaccionó con un antígeno presente en el citoplasma de una amplia variedad de líneas celulares incluyendo tipos epiteliales, linfoides y mieloides. No se encontró ninguna reacción con la superficie de ninguna de las líneas celulares, ni con antígenos

de ADN o fosfolípidos. Las bases moleculares para la generación de este tipo de anticuerpos se han estudiado en varias investigaciones afirmando que la característica de esta poliespecificidad estaría sujeta a la porción FAB (región variable del anticuerpo), a los genes que codifican el CDR de la molécula y las fuerzas fisicoquímicas de interacción entre el anticuerpo y el antígeno. (Wing, 1995).

Los anticuerpos TsW, TsV y TsE que reconocen proteínas de corpúsculos calcáreos, identificaron más de una banda en el perfil proteico del corpúsculo calcáreo; encontrándose que la mayoría de ellos reaccionaron frente a la banda 66.9 y 6.5 kDa, por lo que se sugiere que esta molécula es fuertemente inmunógena.

La proteína identificada como c-Fos no tiene función descrita aún para *Taenia solium*. Sin embargo, un homólogo de esta proteína descrita en humanos, es un proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida. La transcripción de proteínas c-Fos, en humanos, se ve aumentada en respuesta a multitud de señales extracelulares, como por ejemplo los factores de crecimiento. Además, la fosforilación efectuada por MAP quinasas, Protein quinasa A o C altera significativamente la actividad y la estabilidad de c-Fos. Los miembros de la familia c-Fos dimerizan con la proteína c-Jun para formar el factor de transcripción AP-1, el cual activa la transcripción de numerosos y diversos genes implicados en todos aquellos procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular con el fin de evitar procesos de invasión y daño celular (Van Elzaker, Fevurly, Breindel & Spencer, 2008). En algunos estudios, utilizan la medición de la expresión de c-Fos como un marcador de actividad neuronal, ya que c-Fos suele expresarse cuando las neuronas se ven sometidas a potenciales de acción. Si el ARNm de c-Fos es activado en una neurona, esto indica que ha habido actividad reciente (Day, Kryskow, Nyhuis, Herlihy & Campeau, 2008).

Los anticuerpos que reconocen antígenos del parásito completo (Anticuerpos TsW) y que fueron seleccionados como positivos en inmunofluorescencia detectan las moléculas de 66.9, 56.8 y 6.5 kDa. Estos pesos moleculares identificados corresponden a c-Fos, Mariner Mos 1 transposasa y una proteína putativa no caracterizada, respectivamente. Los anticuerpos seleccionados como negativos no reaccionaron a ningún antígeno del corpúsculo calcáreo, lo que verifica su negatividad a este tipo de antígenos.

Los anticuerpos TsW positivos a moléculas del corpúsculo calcáreo, podrían estar detectando alguna región similar entre las proteínas y que son fuertemente inmunógenas. Cabe resaltar que la proteína de 56.8 kDa (Mariner Mos1 Transposas) es una proteína de *Hymenolepis microstoma*, este peso molecular no se encontraba descrito en la base de datos para *Taenia solium*, por lo que la proteína que más se aproximaba fue la de este otro céstodo. Sin embargo, se han reportado en otras investigaciones bandas de proteínas de *Taenia solium* similares a este peso molecular (Rodríguez- Contreras, Skelly, Landa, Shoemaker & Lacleite, 1998) y otros céstodos como *Taenia saginata* (Vicentini-Oliveira et al., 2010).

Si bien la proteína Mariner Mos1 Transposas de *Hymenolepis microstoma*, no tiene función definida aún, un homólogo de esta proteína presente en *Drosophila mauritiana*, describe como función molecular unión a DNA y actividad endonucleasa, como procesos biológicos: integración y recombinación de DNA, (ver Anexo 3), media la transposición del transposón Mos1 por un mecanismo de "cortar y pegar" dentro del ADN. Las transposasas son nucleasas específicas de secuencias y transferencias de cadena que catalizan la transposición a través de una serie ordenada de eventos: unión específica de secuencia de transposasa a las repeticiones terminales invertidas (RTI) presentes en cada extremo del transposón, emparejamiento de las RTSs de transposón en una secuencia de pares, la escisión de una o ambas cadenas de ADN en cada extremo del transposón, la captura del ADN diana y la

transferencia de la cadena para insertar el transposón en un nuevo sitio. (Richardson, Colloms, Finnegan & Walkinshaw, 2009).

Es de esperarse que antígenos del corpúsculo calcáreo sean reconocidos por anticuerpos monoclonales TsW ya que estos deben estar presentes en el extracto completo del parásito y sirven de estímulo para su producción. Por otro lado, tenemos los anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de fluido vesicular (TsV), uno de ellos el anticuerpo V4G1 que reconoce a las moléculas de: 97.9, 94.2, 66.9 y 6.5 kDa. Esto indicaría que estas moléculas están presentes en fluido vesicular y que se encuentran en ambos lugares o en algún proceso de flujo entre fluido vesicular y corpúsculos calcáreos. Además, este anticuerpo reconoce fuertemente las bandas 66.9 y 6.5, correspondiente a c-Fos y una proteína putativa no caracterizada, lo que refuerza la fuerte antigenicidad de estas moléculas, tal como se describe en tejido (Paredes et al., 2016), este sería un nuevo aporte para el desarrollo de una herramienta diagnóstica.

Los anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de excreción - secreción del parásito (TsE), este anticuerpo E1G7 seleccionado como positivo, reconoce las moléculas de: 98.1, 97.9, 94.2, 66.9 y 6.5 kDa. Estos antígenos se encontrarían como parte de las moléculas de excreción - secreción del parásito, es decir que son liberadas al medio externo fisiológicamente. Similar con lo reportado en estudios con secretomas (Víctor et al., 2012). Estas moléculas identificadas corresponden a periodic tryptophan protein 2 (98.1 kDa), proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF (97.9 kDa), supresor de la señalización de citoquina 7 (94.2 kDa), c-Fos (66.9 kDa), y una proteína putativa no caracterizada (6.5 kDa).

La proteína periodic tryptophan protein 2, descrita para *Echinococcus multilocularis*, no tiene función específica aún. Sin embargo, la información que se tiene de esta proteína presente en microorganismos como levaduras o el ser

Humano describe que envuelta en el procesamiento nucleolar del RNA ribosomal Pre-18s (Dragon et al., 2002; Shafaatian, Payton & Reid, 1996; Yamakawa, Gao & Korenberg, 1996). En *Saccharomyces Cerevisiae* es requerido para la selección del sitio del brote y la separación de la célula (Shafaatian et al., 1996; Dragon et al., 2002).

La proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF, es una proteína integral de membrana (transmembrana). El dominio EF, es un dominio estructural de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice que se encuentra en una gran familia de proteínas de unión a calcio (Ver anexo 3). En el ser humano este tipo de proteínas ha sido mejor descrito, éste es necesario para la migración celular radial y tangencial durante el desarrollo del cerebro, posiblemente actuando como un regulador de la morfología celular y la formación del proceso durante la migración. Puede aumentar la afluencia de calcio a través del gen CACNA1E (calcium voltage-gated channel subunit alpha1 E) y estimular la muerte celular programada (Suzuki et al., 2014; De Nijs et al., 2012).

La proteína supresor de la señalización de citoquina 7 de *Echinoccus multilocularis*, tiene la función transducción de señal intracelular, proceso en el que una señal es transmitida a los componentes descendentes dentro de la célula, los cuales se activan para propagar la señal y finalmente activan un cambio en la función o estado de la célula; así también esta relacionada con la regulación del crecimiento, proceso que modula la frecuencia, velocidad o extensión del crecimiento de todo o parte de un organismo para que se produzca a su velocidad adecuada, ya sea globalmente o en una parte específica del desarrollo del organismo (Ver anexo 3). En el ser humano, este tipo de proteína regula las cascadas de señalización probablemente a través de ubiquitinación y / o secuestro de proteínas, participa en la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa a través de la ubiquitinación IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) y posterior degradación proteasomal. Inhibe también la prolactina, la hormona del crecimiento y la señalización de la leptina

mediante la prevención de la activación STAT3 y STAT5, secuestrando en el citoplasma y reduciendo su unión al ADN. Puede ser un componente de reconocimiento de sustrato de un complejo E3 ubiquitina-proteína ligasa de tipo SCF (Skp1-cullin-F-complejo proteico de caja o box) que media la ubiquitinación y posterior degradación proteasomal de las proteínas diana. Se ubica en el Citoplasma, Membrana celular y Núcleo (Martens et al., 2005).

La proteína c-Fos, descrita líneas arriba, con función desconocida para *Taenia solium* pero que en humanos es un proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida. Se describe también una proteína putativa no caracterizada de 6.5 kDa, ésta es una proteína con función desconocida tanto para *Taenia solium* como para otro microorganismo, no existe reporte de su función aún.

Las tres proteínas de mayor peso molecular identificadas por Anticuerpos TsE corresponden a proteínas descritas para *Echinococcus multiloculares*. Un homólogo a la proteína supresor de señalización de citoquina 7 presente en *Taenia solium*, podría estar siendo secretada al medio externo a través de los corpúsculos calcáreos a fin de contrarrestar el ataque inmunológico asociado a la función de esta citoquina. Se conoce que esta citoquina 7, cumple la función de estimular a los progenitores linfoides inmaduro, induciendo su desarrollo (Goodwin et al., 1989).

Para el caso de las moléculas de corpúsculo calcáreo identificadas por anticuerpos monoclonal Ts E, otros grupos de investigación encontraron glicoproteínas de 96 kDa en fluido vesicular y de naturaleza secretoria (Yang, 2004; Yang, 2000), también una glicoproteína de 95 kDa en la lamella de corpúsculo calcáreo de *Trilocularia acanthiaevulgaris* (McCullough & Fairweather, 1987). Antígenos inmunogénicos de 66 kDa en *Taenia saginata* identificado con anticuerpos monoclonales contra ese mismo parásito (Vicentini-Oliveira et al., 2010).

En esta perspectiva, todas estas moléculas aisladas de corpúsculos calcáreos identificadas por los anticuerpos TsE serían liberadas al medio externo y poseerían propiedades inmunógenas ya que son reconocidas por los anticuerpos monoclonales y podrían estar asociadas a la inmunopatología de la Neurocisticercosis.

Por otro lado, tenemos proteínas de corpúsculo calcáreo que no han sido reconocidas por los anticuerpos monoclonales estudiados pero que podrían participar en la fisiología del parásito. Tal es el caso de las moléculas: 41.7, 43.9, 41.3, 39.9, 34.6, 33.1, 31.8, 28.8, 25.8, 23.7, 22.2, 20.7, 19.3, 16.5, 15.6, 14.1 y 8 kDa (Ver Anexo 4). Destacando la presencia de la molécula de 15.6 kDa correspondiente con la subunidad de la enzima superóxido dismutasa, descrita y caracterizada para *Taenia solium* (Gonzales, Mendoza-Hernandez & Plancarte, 2002; Castellanos-Gonzales, Jimenez, Landa, 2002) y que cumpliría una función importante en la neutralización del daño a través de radicales libres (Vaca-Paniagua et al., 2008).

Otras glicoproteínas de *Taenia solium* de 28 y 24 kDa que fueron reconocidas por suero de pacientes con NCC (Restrepo et al., 2000), también antígenos de 14 kDa halladas en extracto crudo de *Taenia solium* (Greene et al., 2000). Otra proteína descrita de 8 kDa es usada para el diagnóstico (Hancock, Khan, Williams & Yushak, 2003).

Los anticuerpos monoclonales que fueron seleccionados como negativos probablemente sean específicos para proteínas que nos están relacionadas con corpúsculos calcáreos o reconozcan moléculas específicas de otras estructuras del parásito.

El potencial de aplicación de los anticuerpos monoclonales y su evaluación en la detección de antígenos, tal como muestran los resultados obtenidos, proponen una herramienta para el diagnóstico de neurocisticercosis, con

ventajas con respecto a la detección de anticuerpos circulantes, (Dorny et al., 2003, García, Del Brutto, 2000).

Los anticuerpos estudiados comprenden un nuevo grupo de anticuerpos monoclonales producidos para antígenos de metacéstodo de *Taenia solium*, a fin de poder ser utilizados como herramienta biotecnológica para la detección, de moléculas de interés para la investigación de la fisiología del parásito y por tanto su potencial aplicación en el diagnóstico de la enfermedad por neurocisticercosis, basado en la detección de antígenos de corpúsculos calcáreos.

6. CONCLUSIONES

- Se evaluaron 18 nuevos anticuerpos monoclonales, 7 de ellos (TsW: **W2G10**, **W6A7**, **W2H7**, **W5D10**, **W5H10**; TsV: **V4G1** y TsE: **E1G7**) son reactivos a corpúsculos calcáreos y capaces de detectar de manera específica proteínas del mismo.
- El perfil de proteínas de corpúsculo calcáreo de *Taenia solium*, descrito en el presente trabajo, está conformado por 23 proteínas: 98.1, 97.9, 94.2, 66.9, 56.8, 44.7, 43.9, 41.3, 39.9, 34.6, 33.1, 31.8, 28.8, 25.8, 23.7, 22.2, 20.7, 19.3, 16.5, 15.6, 14.1, 8.0 y 6.5 kDa.
- Las proteínas identificadas por los anticuerpos monoclonales son: 98.1, 97.9, 94.2, 66.9, 56.8 y 6.5 kDa.
- Todos los anticuerpos detectaron a las proteínas de 66.9 y 6.5 kDa, lo que indica que son altamente antigénicas.
- Las proteínas de corpúsculos calcáreos que son identificadas por el anticuerpo E1G7 son de interés por su naturaleza antigénica y su propiedad de ser liberada al medio externo como: Periodic tryptophan protein 2 (98.1 kDa), Proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF (97.9 kDa), Supresor de la señalización de citoquina 7 (94.2 kDa), c-Fos (66.9 kDa) y una proteína putativa no caracterizada (6.5 kDa).
- Los anticuerpos monoclonales estudiados son poliespecíficos y tienen potencial para ser usados como herramienta en la detección de moléculas antigénicas de corpúsculos calcáreos.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir con la investigación de las proteínas halladas en corpúsculos calcáreos, caracterizarlas e identificar la función biológica para el parásito.
- Se recomienda realizar el análisis proteico de otras estructuras del parásito a fin de poder comparar con las descritas en corpúsculos calcáreos y poder tener mayor entendimiento de la presencia y ubicación de estas proteínas dentro del parásito.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosin, M. (1968). Biochemistry and Physiology of *Echinococcus*. *Notes*, 2(1), 115-120.
- Amudhan, S., Gururaj, G., & Satishchandra, P. (2015). Epilepsy in India: Epidemiology and public health. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 18(3), 263–277.
- Ayala-Sulca, D., & Miranda-Ulloa, E. (2015). Evaluación de Electroinmunotransferencia utilizando antígeno mix nativo purificado de líquido de cisticerco de *Taenia solium* para el diagnóstico de cisticercosis humana. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 32(3), 485-491.
- Bae, Y., Xue, Y., Lee, E., Kim, S., & Kong, Y. (2010). Bioactive molecules of *Taenia solium* metacestode, a causative agent of neurocysticercosis. *Expert Review of Proteomics* 7, 691–707.
- Blocher, J., Schmutzhard, E., Wilkins, P., Gupton, P., Schaffert, M., Auer, H.,...Winkler, A. (2011). A Cross-Sectional Study of People with Epilepsy and Neurocysticercosis in Tanzania: Clinical Characteristics and Diagnostic Approaches. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1185. Doi: 10.1371 / journal.pntd.0001185.
- Brüggemann, M.& Neuberger, M. (1996). Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice. *Immunology today*, 17(8), 391-397.
- Bruno, E., Bartoloni, A., Zammarchi, L., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Bustos, J.,...and the COHEMI Project Study Group. (2013). Epilepsy and Neurocysticercosis in Latin America: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2480. Doi: 10.1371/journal.pntd.0002480.
- Cangalaya, C., Bustos, J., Calcina, J., Vargas-Calla, A., Suarez, D., Gonzales, A.,...Garcia H. and The cisticercosis working Group in Peru. (2016). Perilesional Inflammation in Neurocysticercosis –

Relationship Between contrast-enhanced magnetic resonance imaging, Evans Blue staining and Histopathology in the pig model. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 10(7): 1-3.

Castellanos-González, A., Jiménez, L., & Landa, A. (2002). Cloning, production and characterization of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology*, 32, 1175-1182.

Centro para el control y prevencion de enfermedades- CDC. (2017) Taeniasis. Ciclo de Vida. [Figura] Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/taeniasis/index.html>

Clinton-White, A. (1997). Neurocysticercosis: A Mayor cause of Neurological Disease Worldwide. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 101-115.

Coyle, CM, y Tanowitz, HB (2009). Diagnóstico y tratamiento de la neurocisticercosis. *Perspectivas interdisciplinarias sobre enfermedades infecciosas*, 2009, 180742. <http://doi.org/10.1155/2009/180742>.

Da Silva, G., Nunes, D., De Sousa, J., Gonçalves-Pires, M., Levenhagen, M., & Costa-Cruz, J. (2017). Antigenic fractions from *Taenia crassiceps* metacestodes obtained by hydrophobicity for the immunodiagnosis of active and inactive forms of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid samples. *Parasitol International*, 66(2),134-138.

Day, HEW, Kryskow, EM, Nyhuis, TJ, Herlihy, L., y Campeau, S. (2008). El miedo condicionado inhibe la expresión de mRNA de c-fos en la amígdala extendida central. *Brain Research*, 1229, 137-146. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.085>

DeGiorgo, C., Medina, M., Duron, R., Zee, Ch., & Pietsch-Escueta, S. (2004). Neurocysticercosis. *Epilepsy Currents*, 4(3), 107-111.

Del Brutto, O. (2014). Neurocysticercosis. *The Neurohospitalist*, 4(4), 205-212.

- Del Brutto, O., Rajshekhar, V., White, A., Tsang, V., Nash, T., & Takayanagui, O. (2001). Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*, 57(2), 177-183.
- Del Brutto, O., Nash, T., White, A., Rajshekhar, V., Wilkins, P., Singh, ... Garcia, H. (2017). Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Journal of the neurological science*, 15(372), 202-210.
- Del Brutto, O. (2005). Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited. *Pathogen and Global Health*, 106(5), 299–304.
- De Nijs, L., Wolkoff, N., Coumans, B., Delgado-Escueta, A.V., Grisar, T., & Lakaye, B. (2012). Mutations of EFHC1, linked to juvenile myoclonic epilepsy, disrupt radial and tangential migrations during brain development. *Human Molecular Genetics*, 21, 5106-5117
- Dorny, P., Brandt, J., Zoli, A., & Geerts, S. (2003). Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica*, 87(1), 79-86.
- Dragon, F., Gallagher, J., Compagnone-Post, P., Mitchell, B., Porwancher, K., Wehner, K., ... Baserga, S. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967-970.
- Ferrero, G., Velazquez, F., & Caputto, B. (2012). The kinase c-Src and the phosphatase TC45 coordinately regulate c-Fos tyrosine phosphorylation and c-Fos phospholipid synthesis activation capacity. *Oncogene*, 31, 3381-3391.
- Fleury, A., Cardenas, G., Adalid-Peralta, L., Fragoso, G., & Sciutto, E. (2016). Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunology*, 38(3), 147-57.
- Field, A., & Field, J. (2010). Melamine and Cyanuric Acid do not interfere with Bradford and Ninhydrin assays for protein determination. *Food Chemistry*, 121(3), 912–917.

- Flisser, A., Sarti, E., Lightowers, M., & Schantz, P. (2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica*, 87, 43-51.
- Foyaca-Sibat, H., Cowan, L., Carabin, H., Targonska, I., Anwary, M., Serrano-Ocaña, G.,...Willingham, A. (2009). Accuracy of Serological Testing for the Diagnosis of Prevalent Neurocysticercosis in Outpatients with Epilepsy, Eastern Cape Province, South Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12), e562. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000562.
- Garcia, H., & Del Brutto, O. (2000). *Taenia solium* cysticercosis. *Infectious disease clinics of the North America*, 14(1), 97-119.
- García, H., Gilman, R., Gonzalez, A., Verastegui, M., Rodriguez, S., & Gavidia, C. (2003). Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Perú. *The American Journal of tropical medicine and hygiene*, 68(3), 268–275.
- García, H., Gonzales, A., Martínez, M., & Gilman, R. (2001). Teniasis/cisticercosis por *Taenia Solium*, un serio problema de salud pública en el Perú. *Ministerio de Salud del Perú. Serie informes técnicos de investigación Epidemiológica*, 25, 1-92.
- García, H., Gonzalez, A., Evans, C., & Gilman, R. (2003). *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*, 362(9383), 547-556.
- García, H., Gonzalez, A., Gilman, R., Bernal, T., Rodriguez, S., Pretell, E.,... and Cysticercosis Working Group in Peru. (2002). Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(4), 427-30.
- García, H., Rodriguez, S., Friedland, J., & the Cysticercosis working Group in Peru. (2014). Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. *Parasite Immunology*, 36, 388-396.
- García, H., Gilman, R., Gonzalez, A., Verastegui, M., Rodriguez, S., Gavidia, C.,...Cysticercosis Working Group in Perú. (2003). Hyperendemic

human and porcine *Taenia solium* infection in Perú. *The American Journal of Tropical medicine and Hygiene*, 68(3), 268-275.

García-Merino, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301-306.

García-Noval, J., Allan, J., Fletes, C., Moreno, E., DeMata, F., Torres-Alvarez, R.,...Craig, P. (1996). Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(3), 282-9.

Gonzales, I., Rivera, J., Garcia, H., & the cisticercosis working Group in Peru. (2016). Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunology*, 38, 136-146.

González, R., Mendoza-Hernández, G., & Plancarte, A. (2002). Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitology Research*, 88(10), 881-887.

Goodwin, R., Lupton, S., Schmierer, A., Hjerrild, K., Jerzy, R., Clevenger, W.,...Namen, A. (1989). Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(1), 302–306.

Gorman, S. & Clark, M. (1990). Humanisation of monoclonal antibodies for therapy. *Seminars in immunology*, 2(6), 457-466.

Greene, R., Hancock, K., Wilkins, P., & Tsang, V. (2000). *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *The Journal of Parasitology*, 86(5), 1001-1007.

Gripper, L., & Welburn, S. (2017). Neurocysticercosis infection and disease- A review. *Acta Tropica*, 166, 218-224.

Hancock, K., Khan, A., Williams, F., & Yushak, M. (2003). Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *The journal of Clinical Microbiology*, 41, 2577–2586.

- Hara, I., Hara, S., Fusco, A., Salafsky, B., & Shibuya, T. (1993). Role of calcium ion in *Schistosoma mansoni* cercarial tail loss induced by unsaturated fatty acids. *The Journal of Parasitology*, 79(4), 504-509.
- Hernández-Santoyo, A., Landa, A., González-Mondragón, E., Pedraza-Escalona, M., Parra-Unda, R., & Rodríguez-Romero, A. (2011). Crystal structure of Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium* reveals metal-mediated self-assembly. *The FEBS Journal*, 278, 3308-3318.
- Hohmann, A., Coleman, M., Comacchio, R., Skinner, J., & Bradley, J. (1988). Production of a polyspecific human monoclonal antibody reacting with an epidermal antigen. *Immunology and Cell Biology*, 66(3), 239-45.
- Illies, M., Peeler, M., Dechtiaruk, A., & Etensohn, C. (2002). Identification and developmental expression of new biomineralization proteins in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Development genes and evolution*, 212(9), 419-431.
- John, C., Carabin, H., Montano, S., Bangirana, P., Zunt, J., & Peterson, P. (2015). Global research priorities for infections that affect the nervous system. *Nature*, 527(7578), 178–186.
- Köler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fuses cell secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-501.
- Laclette, J., Merchant, M., & Willms, K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *The Journal of Parasitology*, 73(1), 121-129.
- Lescano, A., Garcia, H., Gilman, R., Gavidia, C., Tsang, V., & Rodriguez, S. (2009). *Taenia solium* cysticercosis hotspots surrounding tapeworm carriers: clustering on human seroprevalence but not on seizures. *Plos Neglected tropical diseases*, 3(1), e371. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000371.
- Machado, N., Téllez, G., & Castaño, J. (2006). Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*, 10(3), 186-197

- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., & Roitt, D. (2014). *Inmunologia*. (8va edicion) Barcelona: Elsevier, España.
- Marsh, M. (1986). Biomineralization in the presence of calcium-binding phosphoprotein particles. *The Journal of Experimental Zoology*, 239(2), 207-20.
- Martens, N., Uzan, G., Wery, M., Hooghe, R., Hooghe-Peters, E. & Gertler A. (2005). Suppressor of cytokine signaling 7 inhibits prolactin, growth hormone, and leptin signaling by interacting with STAT5 or STAT3 and attenuating their nuclear translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 13817-13823.
- Martins-Melo, F., Ramos, A., Cavalcanti, M., Alencar, C., & Heukelbach, J. (2017). Reprint of Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000-2011: Epidemiology of a neglected neurologic cause of death. *Acta Tropica*, 165, 170-178.
- McCullough, J., & Fairweather, I. (1987). The structure, composition, formation and possible functions of calcareous corpuscles in *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson 1867 (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitology Research*, 74(2), 175-182.
- Michnick, S. & Sidhu, S. (2008). Submitting antibodies to binding arbitration. *Nature Chemical Biology*, 4, 326-329.
- Miller, R., Maloney, D., Warnke, R. & Levy, R. (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *The new england journal of medicine*, 306, 517-522.
- Mwape, K., Blocher, J., Wiefek, J., Schmidt, K., Dorny, P., Praet, N.,...Gabriël, S. (2015). Prevalence of Neurocysticercosis in People with Epilepsy in the Eastern Province of Zambia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), e0003972. Doi: 10.1371/journal.pntd.0003972.
- Morrison, S., Johnson, M. & Herzenberg, L. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human

constant region domains. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 81, 6851-6855.

Mountain, A. & Adair, J. (1992). Engineering antibodies for therapy. *Biotechnology & genetics engineering reviews*, 10,1-142.

Nash, T., Mahanty, S., Loeb, J., Theodore, W., Friedman, A., Sander, J.,...Garcia H. (2015). In response: Multifactorial basis of epilepsy in patients with neurocysticercosis. *Epilepsia*, 56(6), 975-6.

Nash, T., Bustos, J., Garcia, H. & the Cysticercosis Working Group in Perú. (2017). Disease Centered Around Calcified *Taenia solium* Granuloma. *Trends Parasitology*, 33(1), 65-73.

Navarrete-Perea, J., Moguel, B., Bobes, R., Villalobos, N., Carrero, J., Sciutto,...Laclette, J. (2016). Protein profiles of *Taenia solium* cysts obtained from skeletal muscles and the central nervous system of pigs: Search for tissue-specific proteins. *Experimental Parasitology*, 172, 23-29.

Newton, Ch., & Garcia, H. (2012). Epilepsy in por regions of the world. *Lancet*, 380, 1193-1201.

Ndimubanzi, P., Carabin, H., Budke, C., Nguyen, H., Qian, Y., Rainwater, E.... Stoner, J. A. (2010). A Systematic Review of the Frequency of Neurocysticercosis with a Focus on People with Epilepsy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e870. Doi: 10.1371/journal.pntd.0000870.

Obregón-Henao, A., Londoño, D., Gómez, D., Trujillo, J., Teale, J., & Restrepo, B. (2003). In situ detection of antigenic glycoproteins in *Taenia solium* metacestodes. *The Journal of Parasitology*, 89(4), 726-732.

Organización Mundial de la Salud (2016-2017). Teniasis y cisticercosis. Mediacentre. EE.UU y el Mundo. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>

Paredes, A., Sáenz, P., Marzal, M., Orrego-Solano, M., Castillo, Y., Rivera, A.,...Nash T. (2016). Anti-*Taenia solium* monoclonal antibodies for the

detection of parasite antigens in body fluids from patients with Neurocysticercosis. *Experimental Parasitology*, 166, 37–43.

- Park, Y., Park, J., Guk, S., Shin, E., & Chai, J. (2005). A new method for concentration of proteins in the calcareous corpuscles separated from the spargana of *Spirometra erinacei*. *The Korean Journal of Parasitology*, 43(3), 119–122.
- Portal, M., Ferrero, G., & Caputto B. (2007). N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene*, 26, 3551-3558.
- Prabhakaran, V., Rajshekhar, V., Murrell, K., & Oommen, A. (2007). Conformation-Sensitive immunoassays improve the serodiagnosis of solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 570-577.
- Research Gate. (2017). Antibody engineering. [Figura]. Recuperado de https://www.researchgate.net/figure/10966215_fig3_Figure-2-Antibody-engineeringMouse-hybridoma-technology-generates-mouse-monoclonal.
- Restrepo, B., Obregón-Henao, A., Mesa, M., Gil, D., Ortiz, B., Mejía, J.,...Teale JM. (2000). Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *International Journal of Parasitology*, 30(6), 689-96.
- Richardson, J., Colloms, S., Finnegan, D., & Walkinshaw, M. (2009). Molecular architecture of the Mos1 paired-end complex: the structural basis of DNA transposition in a eukaryote. *Cell*, 138, 1096-1108.
- Rodrigues, J., Ferreira, H., Farias, S., & Zaha, A. (1997). A protein with a novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(2), 451–456.
- Rodriguez-Contreras, D., Skelly, P., Landa, A., Shoemaker, C., & Lacleite, P. (1998). Molecular and Functional characterization and tissue

localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology*, 117, 579-588.

- Ron-Garrido, L., Coral-Almeida, M., Gabriël, S., Benitez-Ortiz, W., Saegerman, C., Dorny, P.,...Abatih, E. (2015). Distribution and Potential Indicators of Hospitalized Cases of Neurocysticercosis and Epilepsy in Ecuador from 1996 to 2008. *PLoS Neglected of Tropical Diseases*, 9(11), e0004236. Doi: 10.1371/journal.pntd.0004236.
- Sciutto, E., Chavarria, A., Fragoso, G., Fleury, A., & Larralde, C. (2007). The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite immunology*, 29, 621–636.
- Shafaatian, R., Payton, M., & Reid, J. (1996). PWP2, a member of the WD-repeat family of proteins, is an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cell separation. *Molecular and General Genetics*, 252, 101-114.
- Smith, S., & Richards, K. (1993). Ultrastructure and microanalyses of the calcareous corpuscles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research*, 79(3), 245-50.
- Sorvillo, F., DeGiorgio, C., & Waterman, S. (2007). Deaths from Cysticercosis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 13(2), 230–235.
- Suzuki, T., Delgado-Escueta, A., Aguan, K., Alonso, M., Shi, J., Hara Y.,...Yamakawa K. (2004). Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nature Genetica*, 36, 842-849.
- University of Sydney. (2017). *Taenia solium*. [Figura]. Recuperado de <http://sydney.edu.au/mbi/imagebank/platyhelminthes/index.php>
- Vaca-Paniagua, F., Torres-Rivera, A., Parra-Unda, R., & Landa, A. (2008). *Taenia solium*: Antioxidant Metabolism Enzymes as Targets for Drugs and Vaccines. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 393-399.
- VanElzakker, M., Fevurly, R., Breindel, T., & Spencer, R. (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in FOS

expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learning and Memory*, 15 (12), 899-908.

Vargas-Parada, L., & Laclette, J. (1999). Role of the calcareous corpuscles in cestode physiology: a review. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 41(4), 303-307.

Vargas-Paradam, L., Merchant, M., Willms, K., & Laclette, J. (1999). Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology Research*, 85(2), 88-92.

Vicentini-Oliveira, J., Golim, M., De Cássia Paulan, S., Biondi, G., Rossi-Ferreira, R., Deffune E,...Nunes, C. (2010). *Taenia saginata*: production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. *Experimental Parasitology*, 126(4), 621-625.

Victor, B., Kanobana, K., Gabriel, S., Polman, K., Deckers, N., Dorny, P.,...Palmblad, M. (2012). Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion–secretion proteins. *Proteomics*, 12, 1860–1869.

Von Brand, T., Mercado, T., Nylen, M., & Scott, D. (1960). Observations on function, composition, and structure of cestode calcareous corpuscles. *Experimental Parasitology*, 9(3), 205-214.

Von Brand, T., Nylen, M., Martin, G., & Churchwell, F. (1967). Composition and crystallization patterns of calcareous corpuscles of cestodes grown in different classes of hosts. *The Journal of Parasitology*, 53(4), 683-687.

Von Brand, T., Nylen, M., Martin, G., Churchwell, F., & Stites, E. (1969). Cestode calcareous corpuscles: phosphate relationships, crystallization patterns, and variations in size and shape. *Experimental Parasitology*, 25(1), 291-310.

Von Brand, T., & Nylen M. (1970). Organic Matrix of Cestode Calcareous Corpuscles. *Experimental Parasitology*, 28, 566-576

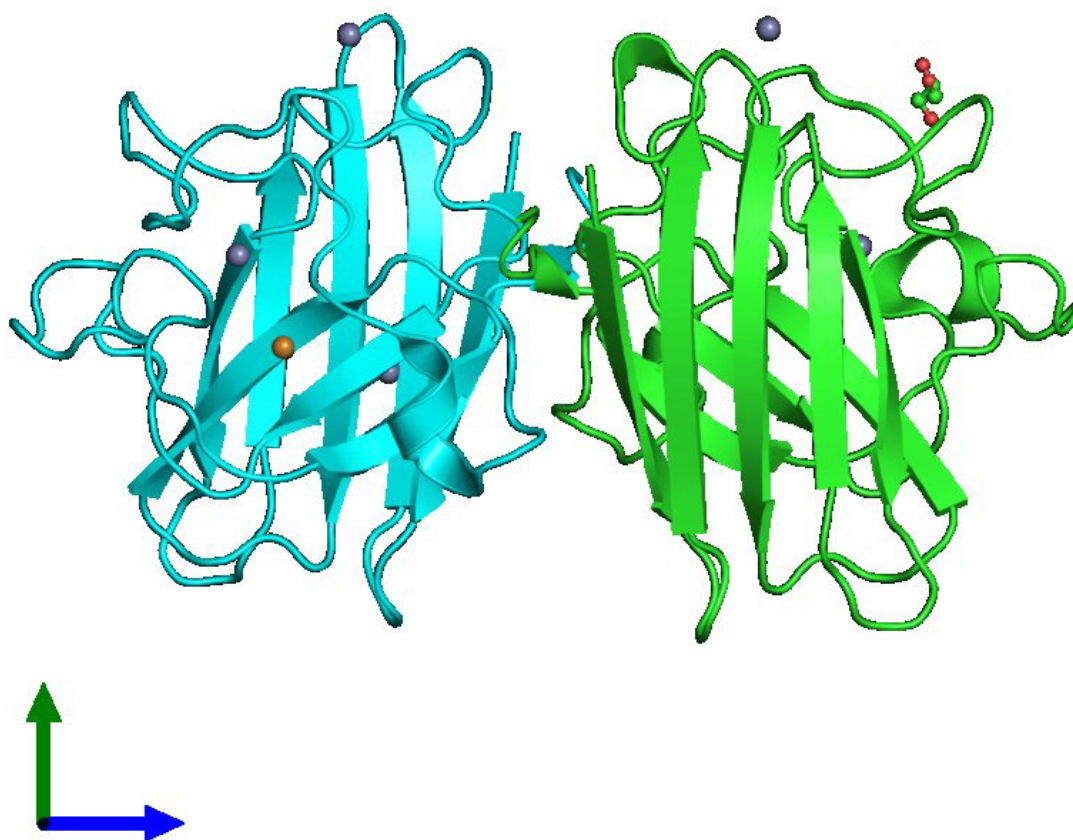
- Willms, K. (2008). Morphology and biochemistry of the pork tapeworm, *Taenia solium*. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(5), 375-382.
- Wing, M. (1995). The molecular basis for a polyspecific antibody. *Clinical and Experimental Immunology*, 99, 313-315.
- Winkler, A., Blocher, J., Auer, H., Gotwald, T., Matuja, W., & Schmutzhard, E. (2009). Epilepsy and neurocysticercosis in rural Tanzania-An imaging study. *Epilepsia*, 50(5), 987-993.
- Yabar, C. (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y adn. *Instituto Nacional de Salud de Peru, Serie de Normas Tecnicas nº38*, 1-60.
- Yamakawa, K., Gao, D., & Korenberg, J. (1996). A periodic tryptophan protein 2 gene homologue (PWP2H) in the candidate region of progressive myoclonus epilepsy on 21q22.3. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 74 (1-2), 140-145.
- Yan, X., Kuhn, S., & Traub, P. (1994). Immunochemical study on polyspecific monoclonal antibody. *Europe PMC Plus*, 14(6), 403-406.
- Yang, H. (2000). Separation of calcareous corpuscles from plerocercoids of *Spirometra mansoni* and their binding proteins. *Parasitology Research*, 86(9), 781-782.
- Yang, H. (2004). Immunolocalization of the 150 kDa protein in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *The Korean Journal of Parasitology*, 42(2), 81-84.
- Zurabian, R., Carrero, J., Rodríguez-Contreras, D., Willms, K., & Lacleste, J. (2005). Antigenic proteins associated with calcareous corpuscles of *Taenia solium*: partial characterization of a calcium-binding protein. *Archives of Medical Research*, 36(1), 4-9.

9. ANEXOS

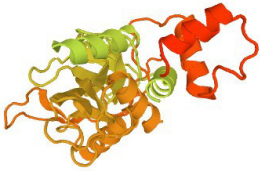
Anexo 1: Tabla de anticuerpos monoclonales producidos en el laboratorio de inmunopatología en neurocisticercosis-UPCH

	Nombre	Código interno	Antígeno que estimulo su producción	Isotipo
1	TsW1	W1G12	Completo	IgG1
2	TsW2	W5D10	Completo	IgG1
3	TsW3	W2G10	Completo	IgM
4	TsW4	W4A4	Completo	IgM
5	TsW5	W2H7	Completo	IgG3
6	TsW6	W5H10	Completo	IgM
7	TsW7	W1G4	Completo	IgM
8	TsW8	W1H2	Completo	IgG1
9	TsW9	W6A7	Completo	IgM
10	TsW10	W2B11	Completo	IgG3
11	TsW11	W2D7	Completo	IgM
12	TsV1	V3C4	Fluído Vesicular	IgG1
13	TsV2	V2H1	Fluído Vesicular	IgG2a
14	TsV3	V4G1	Fluído Vesicular	IgG1
15	TsV4	V2H12	Fluído Vesicular	IgG1
16	TsV5	V1C12	Fluído Vesicular	IgG1
17	TsE1	E3G4	Excreción/Secreción	IgM
18	TsE2	E1G7	Excreción/Secreción	IgG3

Anexo 2: Análisis cristalográfico de la superóxido dismutasa [Cu-Zn] de *Taenia solium* a través de rayos x. (Hernandez-Santoyo et al., 2011)



Anexo 3: Cuadro de análisis de información respecto a las proteínas descritas en el perfil de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* encontrados en el presente estudio en base a datos reportados en Uniprot, Interprot, Protein Data Bank, y que son identificadas por anticuerpos monoclonales.

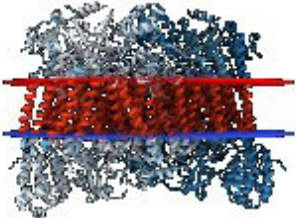
	Código	Nombre	Origen	Uniprot status	Descripcion de las características y funcion	Referencia	Gen Ontology (Unipro/Interpro)
98,1	A0A068Y9K0	Periodic tryptophan protein 2	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Unreviewed	<p>La información que se tiene de esta proteína para <i>Echinococcus</i> aun esta en revisión.</p> <p>En levaduras o el ser humano esta proteína ha sido mejor estudiada, esta proteína esta involucrada en el procesamiento nucleolar del RNA ribosomal pre-18s. En <i>Saccharomyces cerevisiae</i> es requerido para la selección del sitio del brote y la separación de la célula.</p> <p>54.55% de semejanza con <i>suppressor of cytokine signalling 6 humano. (Swiss Model)</i></p> 	<p>Dragon et al., 2002</p> <p>Shafaatian et al., 1996</p> <p>Yamakawa et al., 1996</p>	<p>No descrito para <i>Echinococcus multilocularis</i></p> <p>Su Homologo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (P25635): Separación celular después de citocinesis</p> <p>Clonación endonucleolítica en 5'-ETS de tricistronic rRNA transcripción (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) Fuente: SGD</p> <p>Clonación endonucleolítica en ITS1 para separar SSU-ARNr de 5.8S rRNA y LSU-rRNA de tricistronic rRNA transcripción (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) Fuente: SGD</p> <p>Clonación endonucleolítica para generar el 5'-final maduro de SSU-rRNA de (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) Fuente: SGD</p> <p>Establecimiento de la polaridad celular Fuente: SGD</p> <p>Maduración de SSU-rRNA de tricistronic rRNA transcripción (SSU-rRNA, 5.8S rRNA, LSU-rRNA) Fuente: SGD</p> <p>Subunidad pequeña, subunidad ribosomal</p>

97,9	A0A068YCD5	Proteína 1 que contiene un dominio tipo mano EF	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Unreviewed	<p>Su homologo en el ser humano Necesario para la migración celular radial y tangencial durante el desarrollo del cerebro, posiblemente actuando como un regulador de la morfología celular y la formación del proceso durante la migración. Puede aumentar la afluencia de calcio a través de CACNA1E y estimular la muerte celular programada</p> <p>Participación en la enfermedad Epilepsia mioclónica juvenil 1 (EJM1). La susceptibilidad a la enfermedad está asociada con variaciones que afectan al gen representado en esta entrada. Descripción de la enfermedad: Un subtipo de epilepsia idiopática generalizada. Los pacientes sólo tienen ataques afébridos, con inicio en la adolescencia (y no en la infancia) y trastornos mioclónicos que generalmente ocurren después del despertar y son provocados por la privación del sueño y la fatiga.</p> <p>La mutación Leu-229 puede ser una causa de epilepsia intratable de la infancia. Los individuos afectados tienen convulsiones de tipo múltiple, que se manifiestan como convulsiones tónicas, clónicas y mioclónicas en el período neonatal, y como convulsiones tónicas activadas frecuentemente por el sueño, y repetidas convulsiones mioclónicas frecuentes en la infancia tardía. Las convulsiones no responden a numerosos fármacos antiepilépticos, y los infantes mueren en los primeros años de vida..</p>	<p>Suzuki et al., 204 de Nijs et al., 2012</p> <p>Suzuki et al., 2004</p> <p>Berger et al., 2012</p>	<p>En <i>Echinococcus multilocularis</i> Componente integral de membrana o transmembrana</p> <p>La mano EF es un dominio estructural de proteínas de tipo hélice-bucle-hélice que se encuentra en una gran familia de proteínas de unión a calcio.</p> <p>Su Homologo en el ser humano: Unión a iones de calcio. Fuente: InterPro Proteína C-terminal. Fuente: UniProtKB Migración celular de la corteza cerebral. Fuente: UniProtKB Componentes celulares Axonema Fuente: UniProtKB Centrosome Fuente: UniProtKB Citoplasma Fuente: UniProtKB-KW Cuerpo celular neuronal Fuente: UniProtKB</p>
94,2	A0A068YIB8	Supresor de la señalización de citoquina 7	<i>Echinococcus multilocularis</i>	Unreviewed	<p>Su homologo en humanos Regula las cascadas de señalización probablemente a través de ubiquitinación y / o secuestro de proteínas. Funciones en la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa a través de la ubiquitinación IRS1 y posterior degradación proteasomal. Inhibe también la prolactina, la hormona del crecimiento y la señalización de la leptina mediante la prevención de la activación STAT3 y STAT5, secuestrando en el citoplasma y reduciendo su unión al ADN. Puede ser un componente de reconocimiento de sustrato de un complejo E3 ubiquitina-proteína ligasa de tipo SCF que media la ubiquitinación y posterior degradación proteasomal de las proteínas diana. Se ubica en el Citoplasma, Membrana celular; Núcleo</p>	<p><i>Martens et al., 2005</i></p>	<p>En <i>Echinococcus multilocularis</i> Señal de transducción intracelular</p> <p>Proceso en el que una señal es transmitida a los componentes descendentes dentro de la célula, los cuales se activan para propagar la señal y finalmente activan un cambio en la función o estado de la célula. Regulación del crecimiento</p> <p>Cualquier proceso que modula la frecuencia, velocidad o extensión del crecimiento de todo o parte de un organismo para que se produzca a su velocidad adecuada, ya sea globalmente o en una parte específica del desarrollo del organismo.</p>

66,9	Q6T525	C-fos	Taenia solium	Unreviewed	<p><i>C-Fos es un proto-oncogén celular perteneciente a la familia de factores de transcripción de genes de expresión rápida. La proteína c-Fos presenta un dominio de unión a ADN de tipo cremallera de leucina, así como otro dominio de transactivación en el extremo C-terminal. La transcripción de c-Fos se ve aumentada en respuesta a multitud de señales extracelulares, como por ejemplo los factores de crecimiento. Además, la fosforilación efectuada por MAP quinasas, PKA, PKC o cdc2 altera significativamente la actividad y la estabilidad de c-Fos. Los miembros de la familia c-Fos dimerizan con la proteína c-Jun para formar el factor de transcripción AP-1, el cual activa la transcripción de numerosos y diversos genes implicados en todos aquellos procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular con el fin de evitar procesos de invasión y daño celular. Utilizan la medición de la expresión de c-Fos como un marcador de actividad neuronal, ya que c-Fos suele expresarse cuando las neuronas se ven sometidas a potenciales de acción.³ Si el ARNm de c-Fos es activado en una neurona, esto indica que ha habido actividad reciente.</i></p> <p><i>En humanos esta bien descrito: fosfoproteína nuclear que forma un complejo estrecho, pero no covalentemente ligado, con el factor de transcripción JUN / AP-1. En el heterodímero, las regiones básicas de FOS y JUN / AP-1 parecen interactuar con sitios semimétricos del ADN. En la activación de TGF-beta, forma un complejo multimérico SMAD3 / SMAD4 / JUN / FOS en el sitio de unión AP1 / SMAD para regular la señalización mediada por TGF-beta. Tiene una función crítica en la regulación del desarrollo de células destinadas a formar y mantener el esqueleto. Se cree que tiene un papel importante en la transducción de señales, proliferación y diferenciación celular. En las células en crecimiento, activa la síntesis de fosfolípidos, posiblemente mediante la activación de CDS1 y PI4K2A. Esta actividad requiere Tyr-desfosforilación y asociación con el retículo endoplasmático</i></p>	<p>VanElzakker et al., 2008 Day et al., 2008</p> <p>Portal et al., 2007 Ferrero et al., 2012</p>	<p>No descrito para taenia solium</p> <p>C-Fos en humanos GO PROCESOS BIOLÓGICOS Envejecimiento Fuente: Ensembl Respuesta celular al ion de cadmio Fuente: CAFA Respuesta celular al ion calcio Fuente: Ensembl Respuesta celular al estímulo extracelular Fuente: Ensembl Respuesta celular al estímulo hormonal Fuente: Ensembl Respuesta celular a especies reactivas de oxígeno Fuente: BHF-UCL Condicionada sabor aversión Fuente: Ensembl Metilación del ADN Fuente: ProtInc Fc-epsilon receptor de la vía de señalización Fuente: Reactome Embarazo femenino Fuente: Ensembl Respuesta inflamatoria Fuente: ProtInc Desarrollo del sistema nervioso Fuente: Ensembl Regulación positiva de la muerte neuronal Fuente: ARUK-UCL Regulación positiva de la diferenciación osteoclasta Fuente: Ensembl Regulación positiva de la pri-miRNA transcripción de ARN polimerasa II promotor Fuente: BHF-UCL Regulación positiva de la transcripción, ADN-plantilla Fuente: BHF-UCL Regulación positiva de la transcripción de ARN polimerasa II promotor Fuente: CAFA Regulación de la secuencia de ADN específica vinculante actividad del factor de transcripción Fuente: Reactome Regulación de la transcripción de RNA polimerasa II promotor Fuente: ProtInc Respuesta al cAMP Fuente: Ensembl Respuesta al frío Fuente: Ensembl Respuesta a corticosterona Fuente: Ensembl Respuesta a la citoquina Fuente: Ensembl Respuesta a la droga Fuente: Ensembl Respuesta a la gravedad Fuente: Ensembl Entre otras</p>
------	--------	-------	---------------	------------	---	--	---

56,8	A0A068XKM7	Mariner Mos1 transposasa	<i>Hymenolepis microstoma</i>	Unreviewed	En <i>Drosophila mauritiana</i> (mosca de la fruta) Mediata la transposición del transposón Mos1 por un mecanismo de "cortar y pegar". Las transposasas son nucleasas específicas de secuencias y transferencias de cadena que catalizan la transposición a través de una serie ordenada de eventos: unión específica de secuencia de transposasa a las repeticiones terminales invertidas (IR) presentes en cada extremo del transposón, emparejamiento de las IRs de transposón en una secuencia de pares- (PEC), la escisión de una o ambas cadenas de ADN en cada extremo del transposón, la captura del ADN diana y la transferencia de la cadena para insertar el transposón en un nuevo sitio.	Richardson et al., 2009	<p>No descrito para <i>Hymenolepis microstoma</i></p> <p>En <i>Drosophila mauritiana</i> (mosca de la fruta) Unión a DNA. Fuente: UniProtKB-KW Actividad endonucleasa. Fuente: UniProtKB-KW Unión de iones metálicos. Fuente: UniProtKB-KW Integración de ADN. Fuente: UniProtKB-KW Recombinación de ADN. Fuente: UniProtKB-KW Ligand Magnesium, Metal-binding Localización: nucleo</p>
6,5	Q8MPD9	Proteína putativa no caracterizada	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	<p>No descrito para <i>taenia solium</i> No descrito para otro organismo</p>		<p>No descrito para <i>taenia solium</i> No descrito para otro organismo</p>

Anexo 4: Cuadro de análisis de información respecto a las proteínas descritas en el perfil de corpúsculos calcáreos de *Taenia solium* encontrados en el presente estudio en base a datos reportados en UniProt, Interprot, Protein Data Bank, y que no son identificadas por anticuerpos monoclonales.

	código	Nombre	Origen	Uniprot status	Descripcion de las características y funcion	Referencia	Gen Ontology (Unipro/Interpro)
44,7	A0A9I5	Citocromo C oxidasa subunidad 1	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	<p><i>Citocromo c oxidasa de bovino 53% de similitud</i></p> 	Swiss model	<p>En <i>Taenia solium</i></p> <p>El citocromo c oxidasa es el componente de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del oxígeno al agua. Las subunidades 1-3 forman el núcleo funcional del complejo enzimático. CO1 es la subunidad catalítica de la enzima. Los electrones originados en el citocromo c se transfieren a través del centro de cobre A de la subunidad 2 y el hemo A de la subunidad 1 al centro bimetalico formado por el hemo A3 y el cobre B.</p> <p>Actividad catalítica $4 \text{ ferrocitocromo c} + \text{O}_2 + 4 \text{ H}^+ = 4 \text{ ferricitocromo c} + 2 \text{ H}_2\text{O}$.UniRule anotación</p> <p>Esta proteína está implicada en la vía de fosforilación oxidativa, que es parte del metabolismo de la energía. Unión a Hemo, unión a hierro.</p> <p>Proceso biológico: Respiración aeróbica Fuente: InterPro. Fosforilación oxidativa Fuente: UniProtKB-UniPathway Ubicación: Mitochondrion membrana interna</p>

43,9	A0PFW1	Proteína putativa similar a peroxidasa	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	No descrito para taenia solium No descrito para otro organismo	No descrito para taenia solium No descrito para otro organismo
41,3	Q94PH7	Citocromo B	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed		<p>En <i>Taenia solium</i> Componente del complejo ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo III o complejo citocromo b-c1) que forma parte de la cadena respiratoria mitocondrial. El complejo b-c1 media la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo c. Contribuye a la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial que luego se utiliza para la síntesis de ATP</p> <p>Cofactor Se une a 2 grupos hemo no covalentemente Actividad portadora de electrones Fuente: InterPro Unión de iones metálicos: Interacción selectiva y no covalente con cualquier ion metálico. Fuente: UniProtKB-UniRule Oxidoreductasa: Catálisis de una reacción de oxidación-reducción (redox), una reacción química reversible en la cual se altera el estado de oxidación de un átomo o átomos dentro de una molécula. Un sustrato actúa como un donador de hidrógeno o electrones y se oxida, mientras que el otro actúa como hidrógeno o aceptor de electrones y se reduce. Fuente: InterPro</p> <p>Cadena de transporte de electrones respiratorios Fuente: InterPro.</p> <p>Ubicación: membrana interna mitocondrial</p>

39,9	A0A1L2EDK1	Proteína quinasa dependiente de AMPc subunidad catalítica	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed		<p>En <i>Taenia solium</i> Actividad catalítica: $ATP + a \text{ protein} = ADP + a \text{ phosphoprotein}$ Función molecular: Unión a ATP: Interactuando selectiva y no covalentemente con ATP, adenosina 5'-trifosfato, un coenzima universalmente importante y regulador de enzimas. Fuente: UniProtKB-KW Actividad kinasa proteína serina/treonina: Catálisis de las reacciones: $ATP + \text{proteína serina} = ADP + \text{proteína serina fosfato}$, y $ATP + \text{proteína treonina} = ADP + \text{proteína treonina fosfato}$. Fuente: UniProtKB-KW Kinasa: enzima que cataliza la transferencia de fosfato (transferencia de fosforil o pirofosforil) usualmente de ATP a un substrato secundario.</p>
------	------------	---	----------------------	------------	--	--

34,6	Q8M6LO	NADH deshidrogenasa subunidad 2	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	<p>En humanos Leber neuropatía óptica hereditaria (LHON) 2 Publicaciones La enfermedad es causada por mutaciones que afectan al gen representado en esta entrada. Descripción de la enfermedad Una enfermedad hereditaria de la madre que resulta en la pérdida aguda o subaguda de la visión central, debido a la disfunción del nervio óptico. Los defectos de la conducción cardíaca y los defectos neurológicos también se han descrito en algunos pacientes. El LHON es el resultado de mutaciones primarias del ADN mitocondrial que afectan a los complejos de la cadena respiratoria.</p> <p>Alzheimer disease mitochondrial (AD-MT)1 Publication Disease susceptibility may be associated with variations affecting the gene represented in this entry. Disease description Alzheimer disease is a neurodegenerative disorder characterized by progressive dementia, loss of cognitive abilities, and deposition of fibrillar amyloid proteins as intraneuronal neurofibrillary tangles, extracellular amyloid plaques and vascular amyloid deposits. The major constituent of these plaques is the neurotoxic amyloid-beta-APP 40-42 peptide (s), derived proteolytically from the transmembrane precursor protein APP by sequential secretase processing. The cytotoxic C-terminal fragments (CTFs) and the caspase-cleaved products such as C31 derived from APP, are also implicated in neuronal death.</p>	<p>Brown et al., 1996</p> <p>Lin et al., 1992</p>	<p>En <i>Taenia solium</i> Ubicación subcelular: Componente integral de la membrana Fuente: UniProtKB-KW Mitochondrion Fuente: UniProtKB-KW Proteína transmembrana</p> <p>En humanos Subunidad nuclear de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial NADH deshidrogenasa (Complejo I) que se cree pertenece al ensamblaje mínimo requerido para la catálisis. El complejo I funciona en la transferencia de electrones de NADH a la cadena respiratoria. Se cree que el aceptor de electrones inmediato para la enzima es ubiquinona Actividad catalítica NADH + ubiquinona + 5 H + (In) = NAD + + ubiquinol + 4 H + (Saliente). GO - Funciones moleculares Receptor del glutamato ionotrópico Fuente: Ensembl Actividad de NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fuente: UniProtKB Proteína quinasa vinculante Fuente: Ensembl Completa la anotación GO ... GO - Proceso biológico Transporte de electrones mitocondriales, NADH a ubiquinona Fuente: Reactome Complejo de cadenas respiratorias mitocondriales I montaje Fuente: Reactome Reactivo del metabolismo de las especies de oxígeno Fuente: Ensembl GO - Molecular functioni Unión del receptor de glutamato ionotrópico: Interacting selectively and non-covalently with an ionotropic glutamate receptor. Ionotropic glutamate receptors bind glutamate and exert an effect through the regulation of ion channels.</p>
------	--------	---------------------------------	----------------------	------------	--	---	--

33,1	Q6XR70	Antígeno diagnóstico GP50a	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed			<p>En <i>Taenia solium</i> Función no descrita Uso diagnóstico</p>
31,8	Q08EV9	Proteína de oncosfera Tso22e (Fragmento)	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed			<p>En <i>Taeni solium</i> GO – Proceso Biológico Regulación de la contracción muscular: Cualquier proceso que modula la frecuencia, tasa o extensión de la contracción muscular. Source: InterPro GO – componente subcelular Complejo Troponina : Un complejo de proteínas accesorias (típicamente troponina T, troponina I y troponina C) se encuentra asociado con actina en filamentos finos musculares; Involucrados en la regulación del calcio de la contracción muscular.Source: InterPro</p>

28,8	A0A1L2DBR2	Oxidoreductasa NADH-ubiquinona cadena 1	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed		<p>En <i>Taenia solium</i> GO- función molecular: Actividad de NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fuente: UniProtKB-EC Catálisis de la reacción: NADH + H + + ubiquinona = NAD + + ubiquinol. Oxidoreductasa con ligandos NAD y Ubiquinona Localización subcelular: Membrana interna de las mitocondrias Componente integral transmembrana</p> <p>En el ser humano Subunidad nuclear de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial NADH deshidrogenasa (Complejo I) que se cree pertenece al ensamblaje mínimo requerido para la catálisis. El complejo I funciona en la transferencia de electrones de NADH a la cadena respiratoria. Se cree que el aceptor inmediato de electrones para la enzima es ubiquinona (por similitud) Respiración celular Fuente: GO_Central Transporte de electrones mitocondriales, NADH a ubiquinona Fuente: Reactome Complejo de cadenas respiratorias mitocondriales I montaje Fuente: Reactome Respuesta a la droga Fuente: Ensembl Respuesta al hidróperóxido Fuente: Ensembl Respuesta al compuesto cíclico orgánico Fuente: Ensembl</p> <p>Su deficiencia esta asociado a enfermedades como: neuropatía óptica hereditaria de Leber Encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y síndrome de episodios de accidente cerebrovascular (MELAS) Enfermedad de Alzheimer mitocondrial (AD-MT) entre otras</p>
------	------------	---	----------------------	------------	--	--

25,8	A7U7M1	Ts1	<i>Taenia solium</i> Unreviewed	<p>Homología con la proteína: Charged multivesicular body protein 2^a (Humanos) Componente central probable de la clasificación endosómica requerida para el complejo de transporte III (ESCRT-III) que participa en la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) y clasificación de proteínas endosómicas de carga en MVBs. Las MVBs contienen vesículas intraluminales (ILVs) que se generan por invaginación y escisión de la membrana limitante del endosoma y en su mayor parte se administran a lisosomas que permiten la degradación de proteínas de membrana, tales como receptores de factor de crecimiento estimulado, enzimas lisosómicas y lípidos. La vía MVB parece requerir la función secuencial de los complejos ESCRT-O, -I, -II y -III. ESCRT-III proteínas en su mayoría disociarse de la membrana invaginating antes de la ILV se libera. Se cree que las proteínas ESCRT-III median las actividades necesarias de extrusión de vesículas y / o de fisión de membrana, posiblemente conjuntamente con la AAP ATPasa VPS4.</p> <p>GO - Funciones moleculares Fosfatidilcolina Fuente: UniProtKB Proteína con dominio específico de unión Fuente: UniProtKB GO-procesos biológicos Salida de la mitosis Fuente: UniProtKB Macroautofagia Fuente: ParkinsonsUK-UCL Membrana invaginación Fuente: UniProtKB Metafase mitótica congresión Fuente: UniProtKB Regulación negativa de la muerte celular</p> <p>Separación celular después de la citocinesis Fuente: UniProtKB Transporte endosómico Fuente: Reactome ESCRT III desmontaje complejo Fuente: ParkinsonsUK-UCL Establecimiento de la localización de proteínas</p>	<p>Guizetti et al., 2011</p> <p>Vietri et al., 2015</p>	<p>En <i>Taenia solium</i> GO - Proceso biológico Transporte vacuolar: El movimiento dirigido de sustancias dentro, fuera o dentro de una vacuola. Fuente: InterPro GO - Componentes celulares Intracelular Fuente: GOC</p>
------	--------	-----	------------------------------------	---	---	--

23,7	Q957Q4	Citocromo C oxidasa subunidad 3 (Fragmento)	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	En el humano se asocia a enfermedades como: Leber hereditary optic neuropathy (LHON) Mitochondrial complex IV deficiency (MT-C4D)1 Publication Recurrent myoglobinuria mitochondrial (RM-MT) Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome (MELAS)	Uniprot/ Interprot	<p>En <i>Taenia solium</i> Las subunidades I, II y III forman el núcleo funcional del complejo enzimático. GO - Funciones moleculares Actividad citocromo-c oxidasa: Catálisis de la reacción: $4 \text{ ferrocitocromo c} + \text{O}_2 + 4 \text{ H}^+ = 4 \text{ ferricitocromo c} + 2 \text{ H}_2\text{O}$. La reducción de O₂ en el agua se acompaña de la extrusión de cuatro protones del compartimento intramitocondrial. Fuente: InterPro</p> <p>GO - Proceso biológico Cadena de transporte de electrones aeróbicos Un proceso en el que una serie de portadores de electrones actúan conjuntamente para transferir electrones de donantes tales como NADH y FADH₂ a oxígeno para generar un gradiente electroquímico transmembrana. Fuente: InterPro</p> <p>Localización subcelular,: componente transmembrana y en el mitocondrion</p>
22,2	A0A1L2DBR1	Citocromo C oxidasa subunidad 2	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	En el humano enfermedad por mutacion en el gen que codifica esta proteína o el complejo Mitochondrial complex IV deficiency (MT-C4D)1 Publication	Uniprot/ Interprot	<p>En <i>Taenia solium</i> La citocromo c oxidasa es el componente de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del oxígeno al agua. Las subunidades 1-3 forman el núcleo funcional del complejo enzimático. La subunidad 2 transfiere los electrones del citocromo c a través de su centro binuclear de cobre A al centro bimetálico de la subunidad catalítica 1 Cofactor: cobre Cu GO - Funciones moleculares Unión de iones de cobre Fuente: InterPro Actividad citocromo-c oxidasa Fuente: InterPro Completa la anotación GO ... GO - Proceso biológico Cadena de transporte de electrones Fuente: InterPro</p> <p>Ubicación subcelular: membrana interna del mitocondrion, transmembrana</p>

20,7	Q8MPD8	Putativa proteína no caracterizada (Fragmento)	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	No descrito para taenia solium No descrito para otro organismo		No descrito para taenia solium No descrito para otro organismo
16,5	A0A1L2DBU0	ATP sintasa F0 subunidad 6 (Fragmento)	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	<p>En general ATP sintasa La ATP sintasa tiene un diámetro de 10 nm, y es el complejo más pequeño identificado hasta ahora. Trabaja con un grado de eficacia cercano al 100%. Esta enzima está formada por dos complejos principales. Uno, que atraviesa la membrana mitocondrial interna o la membrana del tilacoide, se llama Fo (CFo en los tilacoides). El otro, que sobresale de la membrana, se llama F1 (CF1 en los tilacoides). F1 y Fo se asocian mediante interacciones electrostáticas.</p> <p>El componente Fo es el motor impulsado por protones. Se conoce como factor sensible a la oligomicina y está formado por las subunidades a, b2 y c10-14. Las subunidades c forman el «anillo c», que rota en respuesta al flujo de protones por el complejo. El segundo complejo, F1, está formado por las subunidades α3, β3, γ, δ y ϵ. La parte principal del complejo F1 está formada por tres dímeros $\alpha\beta$. La actividad catalítica de este hexámero está localizada en las subunidades β. Las subunidades γ y ϵ giran impulsadas por el giro del anillo c. Cada rotación de 120° de la subunidad γ induce cambios conformacionales en las α y β. Finalmente, las subunidades b2OSCP1 (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein) enlazan los componentes F1 y Fo.2</p>	Smith <i>et al.</i> , 2006	<p>En <i>Taenia solium</i> Proteína transmembrana Función molecular Actividad transportadora transmembrana de iones hidrógeno: Permite la transferencia de iones de hidrógeno de un lado a otro de una membrana. Fuente: InterPro Proceso biológico La síntesis de ATP acopló el transporte de protones: El transporte de protones a través de una membrana para generar un gradiente electroquímico (fuerza motriz protónica) que potencia la síntesis de ATP. Fuente: InterPro Componentes celulares Componente integral de la membrana. Fuente: UniProtKB-KW Mitocondria. Fuente: UniProtKB-KW Complejo ATP sintasa transportador de protones, factor de acoplamiento F (o). Fuente: InterPro</p>

19,3	V5NC99	Proteína putativa similar a la insulina	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	<p>En el humano, la insulina (código Uniprot: P01308) cumple las siguientes funciones: GO - Proceso biológico Activación de la actividad de la proteína quinasa B Fuente: BHF-UCL Respuesta de fase aguda Fuente: BHF-UCL Activación de células T alfa-beta Fuente: UniProtKB Célula-célula de señalización Fuente: UniProtKB Proceso metabólico de la proteína celular Fuente: Reactome ER a transporte mediado por vesículas de Golgi Fuente: Reactome Homeostasis de ácidos grasos Fuente: BHF-UCL Homeostasis de la glucosa Fuente: BHF-UCL Proceso metabólico de la glucosa Fuente: UniProtKB-KW Transporte de glucosa Fuente: UniProtKB Vía de señalización del receptor acoplado a la proteína G Fuente: BHF-UCL Vía de señalización del receptor de insulina Fuente: BHF-UCL MAPK cascada Fuente: BHF-UCL Regulación negativa de la respuesta inflamatoria aguda Fuente: BHF-UCL Regulación negativa del diámetro de los vasos sanguíneos Fuente: UniProtKB Regulación negativa del proceso metabólico de los ácidos grasos Fuente: BHF-UCL Regulación negativa del comportamiento alimentario Fuente: DFLAT Regulación negativa de la gluconeogénesis Fuente: BHF-UCL Regulación negativa del proceso catabólico del glicógeno Fuente: BHF-UCL Regulación negativa del proceso catabólico lipídico Fuente: AgBase Regulación negativa de la actividad NAD (P) H oxidasa Fuente: BHF-UCL</p> (*)	Uniprot / Interprot	<p>En <i>Taenia solium</i> GO - Función molecular Actividad hormonal La acción característica de una hormona, cualquier sustancia formada en cantidades muy pequeñas en un órgano especializado o grupo de células y llevada (a veces en el torrente sanguíneo) a otro órgano o grupo de células en el mismo organismo, sobre el cual tiene una acción reguladora específica. El término se aplicó originalmente a agentes con una acción fisiológica estimulante en animales vertebrados (en oposición a un chalón, que tiene una acción depresora). El uso se extiende ahora a compuestos reguladores en animales y plantas inferiores, ya sustancias sintéticas con efectos comparables; Todos se unen a los receptores y desencadenan algún proceso biológico.</p> <p>Ubicación subcelular Secretado: Proteína localizada fuera de la (s) membrana (s) celular.</p>
------	--------	---	----------------------	------------	--	---------------------	--

15,6	Q8WRF5	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] **	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	<p>En <i>Taenia solium</i> Reacción catalizada: $2 \text{ superoxide} + 2 \text{ H}(+) = \text{O}(2) + \text{H}(2)\text{O}(2).$ Función Bioquímica: Actividad superóxido dismutasa Proceso biológico: Procesos de oxidación-reducción Componente celular: No asignado Dominios secuencias: <ul style="list-style-type: none"> - Superóxido dismutasa, dominio de unión cobre/zinc - Superóxido dismutasa, sitio de unión cobre/zinc Detalle de análisis de estructura Composición: <ul style="list-style-type: none"> - Homodimero Macromolécula: <ul style="list-style-type: none"> - Superóxido dismutasa [Cu-Zn] Detalle de la molécula <ul style="list-style-type: none"> - Cadenas: A, B - Largo: 152 amino acids - Peso teórico: 15.61 KDa - Organismo fuente: <i>Taenia solium</i> - Sistema de expresión: <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) UniProt: <ul style="list-style-type: none"> - Canonical: Q8WRF5 (Residues: 1-152; Coverage: 100%) - Nombre del gen: CuZnSOD </p>	Hernandez-Santoyo et al., 2011	<p>En <i>Taenia solium</i> Función Destruye los radicales que normalmente se producen dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos. UniRule anotación Actividad catalítica $2 \text{ superóxido} + 2 \text{ H} + = \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2.$ UniRule anotación Cofactor La proteína tiene varios sitios de unión de cofactores: Cu cation UniRule anotación (Vincula 1 ion de cobre por anotación de subunidad.) UniRule Zn²⁺ + anotación UniRule (Vincula 1 ion de zinc por anotación de subunidad). UniRule GO - Funciones moleculares Unión a proteína idéntica Fuente: IntAct Unión de iones metálicos Fuente: UniProtKB-KW Actividad superóxido dismutasa Fuente: UniProtKB-EC</p>
------	--------	---------------------------------	----------------------	------------	---	--------------------------------	---

14,1	A0A076E590	Citocromo c oxidasa subunidad 1	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	En el humano la función es similar. Su deficiencia o mutación causa: Leber hereditary optic neuropathy (LHON) Mitochondrial complex IV deficiency (MT-C4D)1 Publication Recurrent myoglobinuria mitochondrial (RM-MT) Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome (MELAS)	Uniprot / Interprot	<p>En <i>Taenia solium</i> Función: El citocromo c oxidasa es el componente de la cadena respiratoria que cataliza la reducción del oxígeno al agua. Las subunidades 1-3 forman el núcleo funcional del complejo enzimático. CO I es la subunidad catalítica de la enzima. Los electrones que se originan en el citocromo c se transfieren a través del centro de cobre A de la subunidad 2 y el hemo A de la subunidad 1 al centro bimetálico formado por hemo A3 y cobre B. UniRule anotación</p> <p>Actividad catalítica 4 ferrocitocromo c + O₂ + 4 H + = 4 ferricitocromo c + 2 H₂O. UniRule anotación via: fosforilación oxidativa Esta proteína está implicada en la vía de fosforilación oxidativa, que es parte del metabolismo de la energía. UniRule anotación GO - Función molecular Actividad citocromo-c oxidasa Fuente: UniProtKB-EC Unio a grupo Hemo Fuente: InterPro Unión a hierro Fuente: InterPro GO - Proceso biológico Respiración aeróbica Fuente: InterPro Fosforilación oxidativa Fuente: UniProtKB-UniPathway Ubicación subcelular: membrana interna del mitocondrion, proteína transmembrana de paso multiple</p>
8,0	Q9BJX0	Proteína antigénica (Fragmento)	<i>Taenia solium</i>	Unreviewed	No descrito para taenia solium No descrito para otro organismo		N No descrito para taenia solium No descrito para otro organismo

(*) Ampliar información de la fuente de referencia
En "negrita", descrito para *Taenia solium*

Anexo 5: Lista de Materiales, reactivos y equipos utilizados

1. Material Biológico

Se obtuvieron 600 metacéstodos de *Taenia solium*, extraídos manualmente de musculo esquelético de tres cerdos naturalmente infectados y sin tratamiento de antiparasitarios.

2. Reactivos

- 18 Anticuerpos monoclonales producidos en el laboratorio de inmunopatología en neurocisticercosis - UPCH
- Antibióticos de amplio espectro (GIBCO)
- Inhibidor de proteasas 1 XPMSF (Thermo Fisher Scientific)
- Suero fisiológico
- Buffer fosfato salino pH 7.2
- Glicina tamponada
- Acrilamida / Bis acrilamida (Biorad)
- TRIS (Biorad)
- EDTA (Biorad)
- Tween 20
- Reactivo de Bradford para determinación colorimétrica de proteínas
- Leche en polvo
- Alcohol 70°

3. Materiales

- Frascos de vidrio de 250, 100 ml
- Tubos Falcon estériles 15, 50 ml
- Pipetas descartables
- Crioviales 2 ml
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Tips 0-200 µl
- Tips 20-200 µl
- Tips 100-1000µl

4. Equipos

- Cabina de flujo laminar nivel II. Marca: ESCO
- Microscopio Óptico Marca: Carl Zeiss
- Microscopio de inmunofluorescencia Marca: Carl Zeiss
- Centrifuga refrigerada. Marca: Boeco
- Cámara de electroforesis. Marca: Biorrad
- Cámara de electrotransferencia. Marca: Biorrad
- Fuente de poder. Marca: Biorad
- Vortex. Marca: Biobase
- Pipetas automáticas. Marca: Thermo scientific
- Homogenizador Polytron. Marca: Kinematica PCU