



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
CAMPO DEL CONOCIMIENTO: CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
CAMPO DISCIPLINARIO: BIOQUÍMICA CLÍNICA

**“DESARROLLO DE UNA PRUEBA PILOTO PARA EL DIAGNOSTICO DE CISTICERCOSIS
HUMANA”**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
NARDA KARINA CASTRO NOLASCO

DIRECTOR DE TESIS
Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

SEPTIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Arturo Galindo Fraga

Vocal: Dr. Abraham Landa Piedra

Vocal: Dra. Martha Torres Rojas

Vocal: Dra. Miriam Bobadilla del Valle

Secretario: Dr. Adrián Ochoa Leyva

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular de *Taenia solium*, departamento de microbiología y parasitología de la Facultad de Medicina-UNAM, bajo la tutela del Dr. Abraham Landa Piedra. Colaboraron en el proyecto la Dra. Agnès Odile Fleury del INNN (Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía) y la Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho del “Laboratorio Kaethe Willms Manning” de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Este proyecto fue financiado por el donativo otorgados por CONACyTPN-594 (Producción de inhibidores enzimáticos contra tres enzimas esenciales de *Taenia solium*).

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas

I. Introducción	8
II. Antecedentes	
II.1 Cisticercosis	17
II.2 Epidemiología a nivel mundial de <i>Taenia solium</i>	18
II.3 Epidemiología en Latinoamérica	22
II.4 Epidemiología en México de <i>Taenia solium</i>	24
II.5 Ciclo biológico	26
II.6 Intervenciones para romper el ciclo biológico	27
II.7 Diagnóstico de cisticercosis	29
II.8 Esquema de tratamiento en humanos y cerdos	35
III. Justificación	38
IV. Hipótesis	39
V. Objetivo general	39
VI. Objetivos particulares	39
VII. Diseño experimental	40
VIII. Método	
VIII.1 Diseño del estudio	41
VIII.2 Población del estudio	41
VIII.3 Calculo del tamaño de muestra	41
VIII.4 Análisis estadístico	43
IX. Metodología	
IX.1 Producción de las proteínas recombinantes	44
IX.2 Purificación de proteínas	45
IX.3 Obtención de glicoproteínas (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13) de <i>Taenia solium</i> (LLGP's).	46
IX.4 Cuantificación de proteínas	46
IX.5 Estandarización de la técnica de inmunoelectrotransferencia ligado a enzima (EITB)	47

IX.6 EITB de las proteínas recombinantes y de las LLGP's	47
IX.7 Producción de anticuerpos vs <i>Escherichia coli</i>	48
X. Resultados	50
XI. Discusión de resultados	66
XII. Conclusiones	71
XIII. Referencias	72
XIV. Referencias electrónicas	79
XV. Anexos	81

ABREVIATURAS

₱: pesos

%: porcentaje

°C: grados Celsius

µg: micro gramos

µL: micro litros

AC: antes de Cristo

ATP: adenosín trifosfato

BSA: albúmina sérica bovina

BZ: benzimidazoles

C-: control negativo

C+: control positivo

CDC: centro para el control y prevención de enfermedades

cm: centímetro

Curvas ROC: características operativas del receptor

CuZn: cobre-Zinc

CYP: citocromo P450

DAB: diamino bencidina

E. coli: *Escherichia coli*

E. granulosus: *Echinococcus granulosus*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EITB: ensayo de inmunoelectrotransferencia ligado a enzima

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima

F. hepática: *Fasciola hepática*

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

G. duodenalis: *Giardia duodenalis*

G. lamblia: *Giardia lamblia*

g: gramos

GP: glicoproteínas

GSH: Glutatión

GST25: Glutación transferasas de 25 kDa

GST26: Glutación transferasas de 26 kDa

h: hora

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía

INNNC: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

IPTG: isopropil β -D tiogalactopiranososa

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

ITFDE: Grupo de Trabajo Internacional para la Erradicación de Enfermedades

KDa: kilo dalton

Kg: kilogramos

LLGP's: Glicoproteínas (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13) de *Taenia solium* purificadas mediante una columna de sefarosa-acoplada a *Lentil lectina*.

M: molar

MAPEG: membrana asociadas a proteínas envueltas en ecosanoides y metabolismos del glutatión

mg /Kg/día: miligramos por kilogramo por día

mg/mL: miligramo por mililitro

mg: miligramos

min: minutos

mm: milímetro

mM: mili molar

mV: mili volts

NaCl: cloruro de sodio

NCC: neurocisticercosis

ng: nano gramos

NM: nano molar

O.N: toda la noche

OMS: Organización Mundial de la Salud

P29: Proteína P29

PBS: tampón de fosfato salino

pH: potencial de hidrogeno

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PRX2: 2-CysPeroxirredoxina Típica

RMN: resonancia magnética nuclear

RNA: ácido ribonucleico

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minutos

S. mansoni: *Schistosoma mansoni*

S15a: Proteína ribosomal S15a

SDS-PAGE: geles de poliacrilamida con SDS

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SNC: sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

T. crassiceps: *Taenia crassiceps*

T. saginata: *Taenia saginata*

T. solium: *Taenia solium*

T. taeniaeformis: *Taenia taeniaeformis*

T. trichura: *Trichuris trichura*

TAC: tomografía axial computarizada

TLCK: tosil-L-lisil-hidrocluro de clorometano

TPI: Triosafosfato isomerasa

Tris HCl: tris (hidroximetil) aminometano-ácido clorhídrico

TRX-1: Tiorredoxina-1

UAS: Universidad Autónoma de Sinaloa

UV: ultravioleta

VIH: virus de Inmunodeficiencia adquirida

W: watt

I. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es la causa del 30% de los casos de epilepsia en zonas endémicas donde hay cerdos en libertad, más del 80% de los 50 millones de personas afectadas en el mundo por epilepsia viven en países en vías de desarrollo [OMS; 2017]; por lo que esta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública.

La cisticercosis es una parasitosis de humanos y cerdos causada por el estadio larvario de *Taenia solium*, el cual presenta el escólex del parásito adulto invaginado en una vesícula. Este parásito se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Animalia
Phylum: Platyhelminths
Clase: Cestoda
Orden: Cyclophyllidea
Familia: Taeniidae
Género: *Taenia*
Especie: *solium*
[Koneman E; 2006]

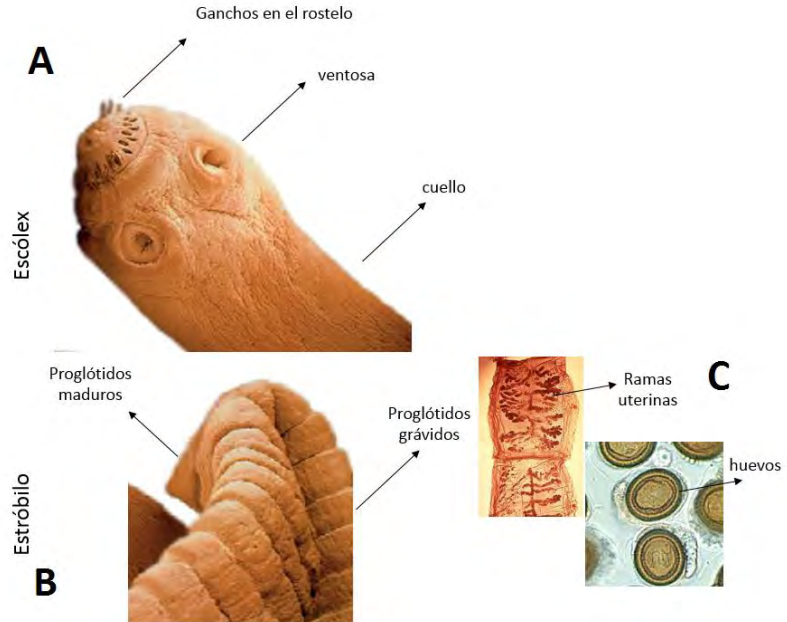


Fig. 1. Anatomía del adulto de *Taenia solium*. A) Escólex mostrando los ganchos, ventosas y el cuello. B) Estróbilo; proglótido maduro y proglótido grávido mostrando las ramas uterinas con huevos. C) Huevos del parásito.

En su anatomía el estadio adulto de *T. solium* (**Fig. 1**), presenta un escólex o cabeza (órgano de fijación del helminto), después de éste encontramos el cuello, en el cual existen células pluripotenciales que son las responsables de la formación de proglótidos que forman el estróbilo o cuerpo segmentado del parásito, y pueden formarse desde 800 hasta 1000, dependiendo de su maduración se dividen en:

- Inmaduros son los más cercanos al cuello y no presentan órganos sexuales.
- Maduros están presentes en la parte media del cuerpo y se observa en ellos ambos órganos sexuales (hermafroditas), presentan una estructura rectangular y miden de 2.1 a 2.5 mm de largo y 2.8 a 3.5 mm de ancho.
- Grávidos estos proglótidos se pueden encontrar en las heces o en el medio ambiente y contienen los huevos de *T. solium*, se ubican en la parte distal del gusano. Miden de 3.1 a 10 mm de largo y de 3.8 a 8.7 mm de ancho [Tay J., 2003]. Su útero es característico pues presenta de 7 a 13 ramas laterales usualmente (9 a 10) gruesas las cuales contienen de 50 mil a 60 mil huevos cada una [Flisser A; 2006], como se muestra en la **Fig.1**.

El cuerpo del adulto es largo y aplanado, razón por la cual pertenece al phylum de los platelmintos, su longitud puede ser de 2 a 4 m aunque se han reportado ejemplares que pueden llegar a medir de 6 a 10 m de largo [Flisser A, et al; 2006]. El cuerpo está cubierto por un tegumento formado por microvellosidades llamadas microtricas las cuales se encuentran cubiertas por una membrana con glicocálix que potencia la permeabilidad de cationes, sales biliares y nutrientes, posee también actividad amilasa, tripsina, quimiotripsina y lipasa pancreática.

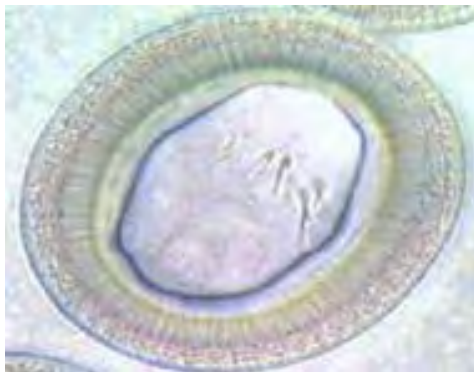


Fig2. Huevo de *Taenia solium* (microscopia óptica) [Laclette J; 1982]

Los huevos (**Fig.2**) contenidos en los proglótidos grávidos, se encuentran en distintos grados de maduración; alrededor del 50% contienen oncosferas o embriones infectivos totalmente desarrolladas. Los huevos inmaduros pueden madurar fuera del hospedero y permanecer viables en agua, ríos o pastizales por semanas [Larralde C et al; 2007].

Los huevos salen del útero a través del poro genital o por ruptura de los proglótidos que son expulsados con la materia fecal. Son esféricos, de color ámbar. La envoltura más externa es una membrana delgada hialina conocida como vitelo que usualmente se pierde en las heces [Larralde C et al; 2007]. La siguiente capa es el embrióforo el cual se encuentra formado por pequeños bloques

de queratina, unidos entre sí por una proteína cementante lo que le da un aspecto radiado característico y la resistencia en el ambiente externo.

Por último se encuentra la membrana oncosferral que rodea la oncosfera o embrión hexacanto, esta estructura se encuentra formada por un epitelio delgado con extensiones citoplásmicas, sistema muscular en el cual se anclan los tres pares de ganchos, un par de glándulas que le ayudan a atravesar las paredes intestinales, y células germinativas a partir de las cuales se desarrollará el siguiente estadio larvario o cisticerco [Quiroz R.H 2002; Larralde et al., 2007].

Los huevos de *T. solium* son morfológicamente indistinguibles de los de *T. saginata* y otros ténidos. Estos huevos al principio no son infectantes, y requieren de dos eventos previos para que tengan capacidad de invadir al hospedero intermediario, la desintegración del embrióforo y la activación de la oncosfera (**Fig.2**).

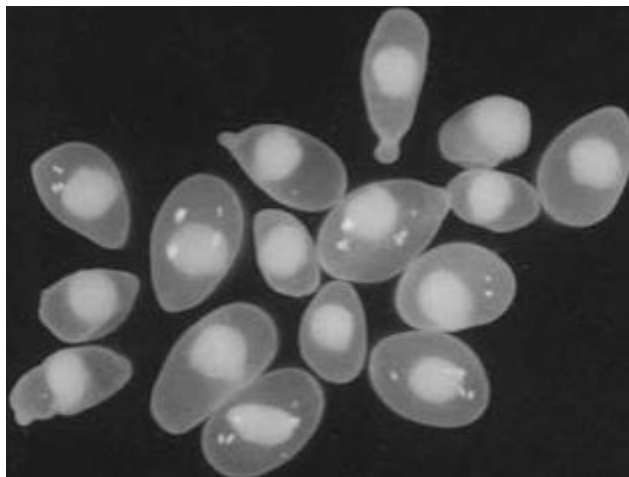


Fig 3. Cisticercos de *Taenia solium* (Flisser A et al; 2004).

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula ovalada y translúcida, mide 0.5 a 2.0 cm de diámetro presenta un escólex invaginado con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos, además al carecer de tracto digestivo las larvas adquieren sus nutrientes y excretan sus desechos por el tegumento [Flisser A et al; 2006]. El desarrollo del cisticerco hacia una forma adulta capaz de producir huevos toma un tiempo aproximado de 2 meses.

Taenia solium posee diferentes proteínas metabólicas que llevan a cabo funciones vitales del parásito como mantener el metabolismo REDOX y la desintoxicación de xenobióticos entre otros: (GST26 (Glutación transferasa de 26 KDa), GST25 (Glutación transferasa de 25KDa), P29 (Proteína de 29 KDa), PRX-2 (2-Cys-peroxirredoxina típica), TPI (Triosafofato isomerasa) y la TRX-1 (Tiorredoxina-1).

Estas proteínas han sido previamente estudiadas y producidas en su forma recombinantes en bacterias. Debido a su inmunogenicidad y a que no cruzan con las de sus hospederos; en este proyecto se utilizaron para diagnosticar cisticercosis en sueros humanos mediante el ensayo de inmunoelectrotransferencia ligado a enzima (EITB) ya se han caracterizado, evaluado su capacidad inmunogénica y se han producido anticuerpos en conejo y ratón contra cada una de ellas. No presentan reacciones cruzadas con las proteínas homólogas de sus hospederos, por lo que podrían usarse en el diagnóstico del mismo.

En la literatura se describe un análisis proteómico completo, en la cual la base de datos blanco fue construida por otras bases que incluían a *T. solium*, *Echinococcus*, *Schistosoma*, *Trichinella*, *Sus scrofa*. En este análisis nuestras proteínas de interés (P29, TPI, GST's, TRX-1, PRX-2) fueron clasificadas dentro del grupo de 76 proteínas contenidas en los extractos de excreción-secreción de *T. solium*, que forman parte del grupo 1 en las cuales se engloban aquellas de las que no se tiene información ontológica del gen (P29), grupo 4 de las proteínas encargadas de metabolismo, procesos biosintéticos (TPI), del grupo 8 homeostasis redox, desintoxicación y actividad de oxidorreductasas (TRX-1, PRX-2, GSTs) [Víctor B et al; 2012]. A continuación se describe brevemente a cada una de ellas:

Tiorredoxinas

Estas enzimas están presentes en diferentes parásitos como *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepática* y *Echinococcus granulosus*, presentan un peso aproximado de 12.5kDa, se caracterizan por ser proteínas intracelulares la cual presenta una actividad redox, debido a su sitio catalítico conservado Cys-Gly-Pro-Cys, el cual facilita la reducción de la proteína. Es un modulador de la inflamación, crecimiento celular, apoptosis; se ha reportado que esta se encuentra elevada en algunas condiciones de enfermedad, además se han relacionado con patologías autoinmunes, uremia, cirrosis en el hígado, enfermedades en el corazón y pulmones, cáncer colorectal, melanoma y VIH [Mustacich et al., 2000; Dai J et al., 2016].

Esta enzima ya ha sido caracterizada en *T. solium*, presenta un peso molecular de 11.7 kDa y un punto isoeléctrico de 4.84 [Jiménez L et al; 2015], así como en *T. crassiceps* [Martínez-González J.J, Guevara-Flores A et al; 2015] en estos parásitos la tiorredoxina (TRX-1) es una oxidorreductasa central en la homeostasis redox implicada en la regulación de la actividad de varias proteínas a través de intercambios de tiol/disulfuro [Jiménez L et al; 2015]. **Figura 4.**

2-Cys Peroxirredoxina Típica

Las peroxirredoxinas son enzimas antioxidantes tienen un peso aproximado entre 20 a 25 KDa, están ubicadas principalmente en el citosol, estas enzimas no requieren grupos prostéticos, metales o coenzimas para su función; son moduladas por cambios en el estado redox o de fosforilación, y catalizan la reducción de hidroperóxidos, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito a agua, alcohol y nitrito como se ilustra en la **figura 5**, respectivamente [Vaca-Paniagua F, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, Landa A; 2008], utilizan a las tiorredoxinas como donadoras de electrones tal como se observa en la **figura 5**.

Los genes de esta enzima han sido clonada y su producto caracterizado en *T. solium* y *T. crassiceps* [Vaca-Paniagua F, Parra-Unda R y Landa A; 2009], *F. hepatica*, *S. mansoni* en los cuales esta enzima juega un rol importante en la defensa y regulación de los peróxidos en estos parásitos y el estrés oxidativo generado por células del sistema inmune del hospedero, en *Babesia gibsoni* y en *Plasmodium falciparum* [Masatani T et al; 2013; Koncarevic S et al; 2009], y se ha probado como blanco para la producción de inhibidores en contra de esta parasitosis [Brizuela M et al; 2014]. También ha sido empleada en diagnóstico para la detección de *Sarcoptes scabiei* en conejos por la técnica de ELISA [Zhang R, Zheng W et al; 2013].

Ensayos de EITB han demostrado que anticuerpos anti Prx-2 reconocen únicamente una banda de 22kDa en todos los estadios de *T. solium*, debido a que presenta características en su estructura y secuencia específicas, podría ser utilizado como un antígeno diagnóstico.

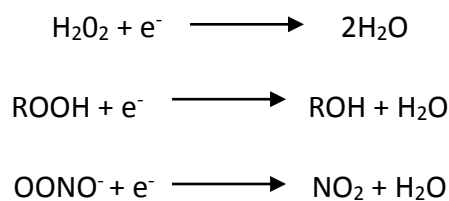


Fig. 4. Reducción de peróxido de hidrogeno, hidroperóxido y peroxinitritos [Vaca-Paniagua F, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, Landa A; 2008]

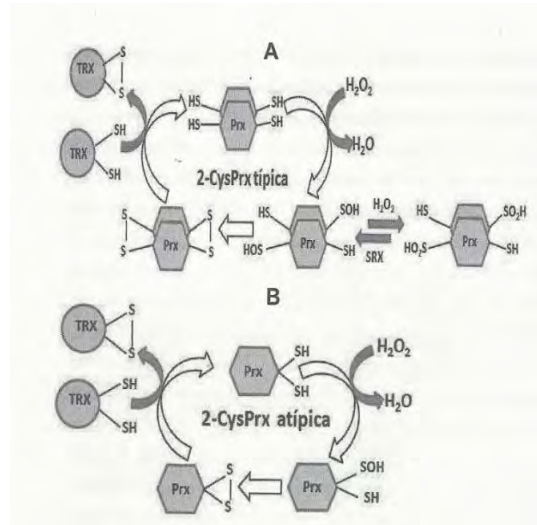


Fig5. Mecanismo de acción de las PRX-2 típica y atípica.

Sistema de las glutatión transferasas (GSTs)

Las GSTs son un grupo de enzimas diméricas cuyas subunidades se encuentran entre 24 a 27 KDa. Estas enzimas se clasifican en tres subfamilias de acuerdo a su localización celular: mitocondrial, 2) microsomal o MAPEG (membrana asociadas a proteínas envueltas en ecosanoides y metabolismos del glutatión) y 3) citosólicas [Vaca-Pniagua F, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, Landa A; 2008].

Son enzimas multifuncionales promueven la inactivación, degradación y excreción de una amplia diversidad de xenobióticos, catalizando el ataque nucleofílico del glutatión (GSH) a sustratos electrofílicos, las GSTs de mayor abundancia son las citosólicas, representando en el organismo el 3-4%, es una familia enzimas desintoxicantes que catalizan la conjugación de GSH a una variedad de compuestos electrofílicos endógenos y exógenos (Fig. 6). Las GSTs se dividen en ocho clases (denominadas por las letras griegas alfa, Mu, Pi, Teta, Nu, Sigma, zeta, etc.) juegan un papel importante en el metabolismo endógeno de leucotrienos y prostaglandinas, y se ha observado que la sobre expresión de esta proteína puede causar resistencia a tumores y a fármacos.

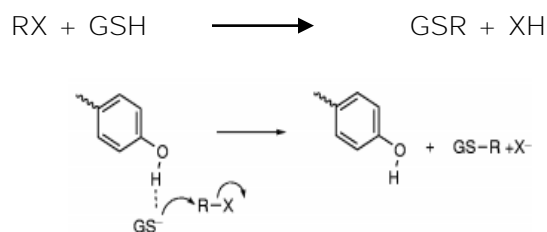


Fig 6. Reacción de conjugación de las GSTs [Armstrong R., 1998].

En el modelo de ratón se ha observado que GST25 funciona como un buen biomarcador para la identificación de *Schistosoma mansoni* [Kardoush M.I, Ward B.J, Ndao M; 2016].

Las GSTs (25 y 26 kDa) de la clase Mu y Alfa-Pi respectivamente de *T. solium* también ha sido empleada como estrategia para control de las patologías ocasionadas por *T. solium*, algunos grupos de investigación han hecho esfuerzos por desarrollar vacunas que protejan contra este helminto, un ejemplo es el caso de Norberto Vibanco, el cual determinó la capacidad que presentan la SGSTF (Fracción de la Glutati6n S-transferasa compuesta por SGSM1 (GST25) y la SGSTM2 (GST26), observando que la inmunizaci6n con SGSTF y SGSTM2 fue muy eficaz en la reducci6n de la carga cisticercos en cisticercosis murino. En contraste, no se obtuvo protecci6n usando SGSTM1 nativo y SGSTM1 recombinante al usarlos como inmun6genos [Vibanco-P6rez N, Jim6nez L et al; 2002].

Triosa fosfato isomerasa (TPI)

La TPI cataliza la interconversi6n de dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehido 3-fosfato, esta enzima es importante en la v6a de la gluc6lisis, glucogen6lisis, s6ntesis de 6cidos grasos y v6a de las pentosas fosfato [Voet et al., 1998], como se observa a continuaci6n en la **Fig. 7**.



Fig 7. Reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa (Reacción 5 de la v6a glucol6tica).

Esta prote6na ha sido aislada en varios par6sitos y en *T. solium* est6 presente como un homod6mero compuesto de mon6meros con peso aproximado de 27 kDa [Jim6nez L et al; 2000], por ensayos de EITB se ha observado que no presenta reacciones cruzadas con otras TPI's presentes en otros par6sitos tales como *Schistosoma mansoni*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma brucei* y tampoco con su hospedero *Sus scrofa* [Jim6nez L, Fern6ndez-Velasco D.A et al; 2003]. En *Schistosoma* [Zhang W et al; 2010], se ha empleado como biomarcador para la identificaci6n de par6sitos intestinales tales como *Giardia duodenalis* (*G. lamblia*, *G. intestinalis*) [Siripattanapipong S et al; 2011; Choy SH et al; 2015]. Adem6s desintoxica del metabolito dihidroxiacetona fosfato que produce metil glioxal el cual es t6xico para los organismos. Esta prote6na ha sido estudiada en ensayos de vacunaci6n con el modelo en rat6n de *Taenia crassiceps*, en los cuales despu6s de inmunizar ratones con 1µg de la

proteína (TPI de *T. solium*), se observó que reduce 52% de cisticercos [Jiménez L, Fernández-Velasco DA, Willms K, Landa A; 2003].

Proteína P29

La P29 (29 KDa) fue descrita por González [González G, Spinelli P et al., 2000] como un antígeno novedoso de *E. granulosus*, en busca de diferentes antígenos del parásitos en el fluido de quiste hidatídico. Por otra parte se ha observado que P29 es un marcador serológico potencial en pacientes infectados con diferentes especies de *Equinococcus* [Boubaker G et al., 2014]. La determinación de los niveles de anticuerpos anti-P29 en el seguimiento post-operatorio de los pacientes con esta patología representan una herramienta pronostica valiosa para el manejo clínico de estos casos. Por otra parte se ha observado que esta proteína es un antígeno que compone la fracción de proteínas de excreción-secreción de *T. solium*, ha sido estudiada en modelo de hámster con el fin de obtener antígenos específicos para diagnóstico del adulto de este helminto, se obtuvo un reconocimiento del 28%, de 33 sueros positivos, lo cual nos permite pensar que esta proteína puede utilizarse para el diagnóstico de *T. solium* **Figura 8** [Ochoa-Sánchez A et al., 2011].

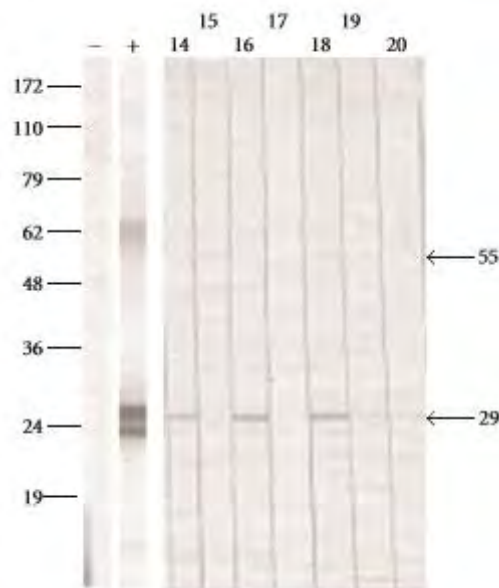


Fig 8. Inmunoelctrotransferencia con la proteína 29 recombinante de *Taenia solium* incubada con 33 sueros de hámsteres teniosicos. Línea (-) suero de hámster preinmune, línea (+) suero hiperinmune anti-P29 de *T. solium*, con números se identifican los sueros de hamster teniosicos.

La meta del estudio fue detectar anticuerpos en muestras de sueros de pacientes contra las proteínas recombinantes GST26 (Glutación transferasa de 26 KDa), GST25 (Glutación transferasa de 25KDa), P29 (Proteína de 29 KDa), PRX-2 (2-Cys-peroxirredoxina típica), TPI (Triosafosfato

isomerasa) y la TRX-1 (Tiorredoxina-1) de *T. solium* para diagnosticar la cisticercosis utilizando la técnica de EITB.

Para validar la metodología se compararon todas las muestras contra la técnica de Tsang, además se cuenta con los datos de RMN y TAC de los pacientes con cisticercosis, datos proporcionados por el INNOC y la Universidad Nacional de Sinaloa.

El análisis de los datos se realizó haciendo uso de tablas de contingencia para conocer el desempeño diagnóstico de la prueba cálculo de especificidad, sensibilidad y valores predictivos.

II. ANTECEDENTES

II.1 cisticercosis

La cisticercosis es una enfermedad de la cual se tienen reportes desde la antigüedad **tabla 1**, es causada por el parásito *Taenia solium*; está relacionada con pobres condiciones sanitarias, económicas y la crianza rústica porcina.

Este parásito es el más importante en las enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC). En humanos se estima que aproximadamente una tercera parte de los países en vías de desarrollo adquieren epilepsia a causa de este; en el año 2015 la organización mundial de la salud (OMS) informó que de los 50 millones de personas afectadas en el mundo por epilepsia, el 80 % vive en países en vías de desarrollo y *T. solium* es la causante de más del 30% de estos casos.

Tabla 1. Historia de la cisticercosis [Del Brutto O, García H; 2015].

Datos	Eventos, descubrimiento y descripción
3000-1500 AC	Reconocimiento del parásito en su forma adulta por los Egipcios
600-500 AC	La biblia hebrea condena el consumo de carne de cerdo
400-350 AC	Los cerdos con cisticercos son reconocidos por los Griegos
600-1000	El Corán prohíbe el consumo de puerco; los árabes y los egipcios usan semillas de calabaza para tratar la teniosis
1558	Primer reporte de casos de neurocisticercosis humana
1697	Reconocimiento del parásito y la cisticercosis
1792	Descubrimiento de teniasis y cisticercosis en el mismo paciente
1850-1900	Descripción del ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>
1909-1911	Prueba basada en la fijación de complemento para el diagnóstico de la cisticercosis
1930-1960	Descripción de la historia natural de cisticercosis humana
1970	Introducción de neuroimagen y métodos diagnósticos: intentos para erradicar la cisticercosis

Las manifestaciones clínicas para esta enfermedad dependen del sitio en el cual se localice el parásito, ya que los cisticercos pueden encontrarse dentro o fuera del SNC.

La NCC se asocia a diversos signos y síntomas, dependiendo del número, tamaño del parásito, localización de las lesiones, respuesta inmunitaria del huésped. En algunas ocasiones puede ser asintomática, en caso de ser sintomática se puede manifestar cefalea crónica, ceguera, convulsiones (epilepsia si son recurrentes), hidrocefalia, meningitis, demencia y síntomas causados por lesiones en el sistema nervioso central, siendo la NCC la forma más grave de la enfermedad [Fleury et al; 2010].

Cuando los cisticercos se localizan fuera del SNC, como es tejido subcutáneo, músculo o víscera la mayoría de los casos no implican manifestación clínica aparente más allá de masas detectables y el efecto de masa local, cuando su localización es subcutánea causa inflamación. Los cisticercos en corazón son asintomáticos, en la mayoría de los casos se encuentran sobre todo en pacientes con infecciones diseminadas de cisticercos, no así la cisticercosis oftálmica la cual es un problema clínico.

Los cisticercos localizados en el espacio orbital, en particular los músculos oculomotores, pueden ocasionar variaciones en la mirada, cisticercos en la cámara anterior o aquellos que flotan libremente en el humor vítreo pueden bloquear los campos visuales, y los cisticercos sub retinianos puede afectar a la agudeza visual [González I, Rivera J.T, García H.H; 2016].

II.2 Epidemiología a nivel mundial de Taenia solium.

Taenia solium es un parásito endémico de regiones como México, Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, Perú, India, África del Sur, África Occidental, EUA entre otros países.

En países desarrollados como EUA los movimientos migratorios se encuentran relacionados con la aparición de la enfermedad [Gabriël S, Johansen M.V, Pozio E et al; 2015; **Fig. 1**], ejemplo de esto son los casos reportados en la ciudad de los Ángeles California, Houston, Chicago [Flisser A, Sarti E et al; 2003] y Nueva York [Schantz, P.M., Moore, A.C., Muñoz, J.L et al; 1992].

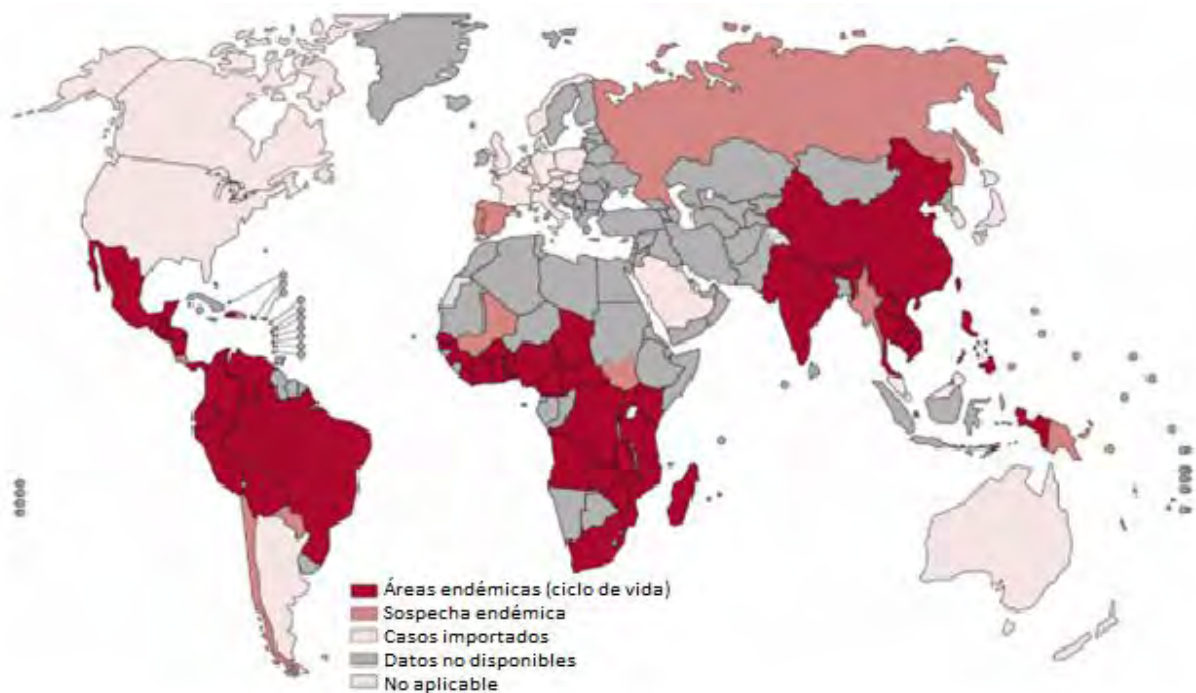


Fig1. Países y áreas de riesgo de cisticercosis [Gabriël S, Johansen M.V, Pozio E et al; 2015]

En el periodo de 1970-2011 Del Brutto y colaboradores reportaron 779 casos de pacientes con neurocisticercosis, la mayoría de estos fueron diagnosticados en el año 1985, en el cual se observó que ocurrieron (384) casos en Portugal, (228) en España, (80) Francia, (26) Reino Unido y (21) casos en Italia [Del Brutto, et al; 2012]. Este estudio se basó en datos demográficos y manifestaciones clínicas de neurocisticercosis en donde se observó que en 186 pacientes la enfermedad era asintomática.

En base a estudios realizados entre el año de 1989 - 2014 [Almeida MC, Gabriël S, Abatih E et al; 2015] informaron que la seroprevalencia de *T. solium* en comunidades endémicas de África, Asia, América Latina y el Caribe se distribuye de acuerdo a lo señalado en la **Fig.1**. Estos estudios se basaron en la técnica de EITB (Inmuno electrotransferencia unido a enzima) [Tsang, et al; 1989] y la técnica de ELISA usando los antígenos B158/B60 (proteínas de excreción/secreción del cisticerco) o HP10 (antígeno utilizado para la identificación de *T. saginata*) [Fleury, et al; 2007], ver **Fig.2** y **Tabla 2**.

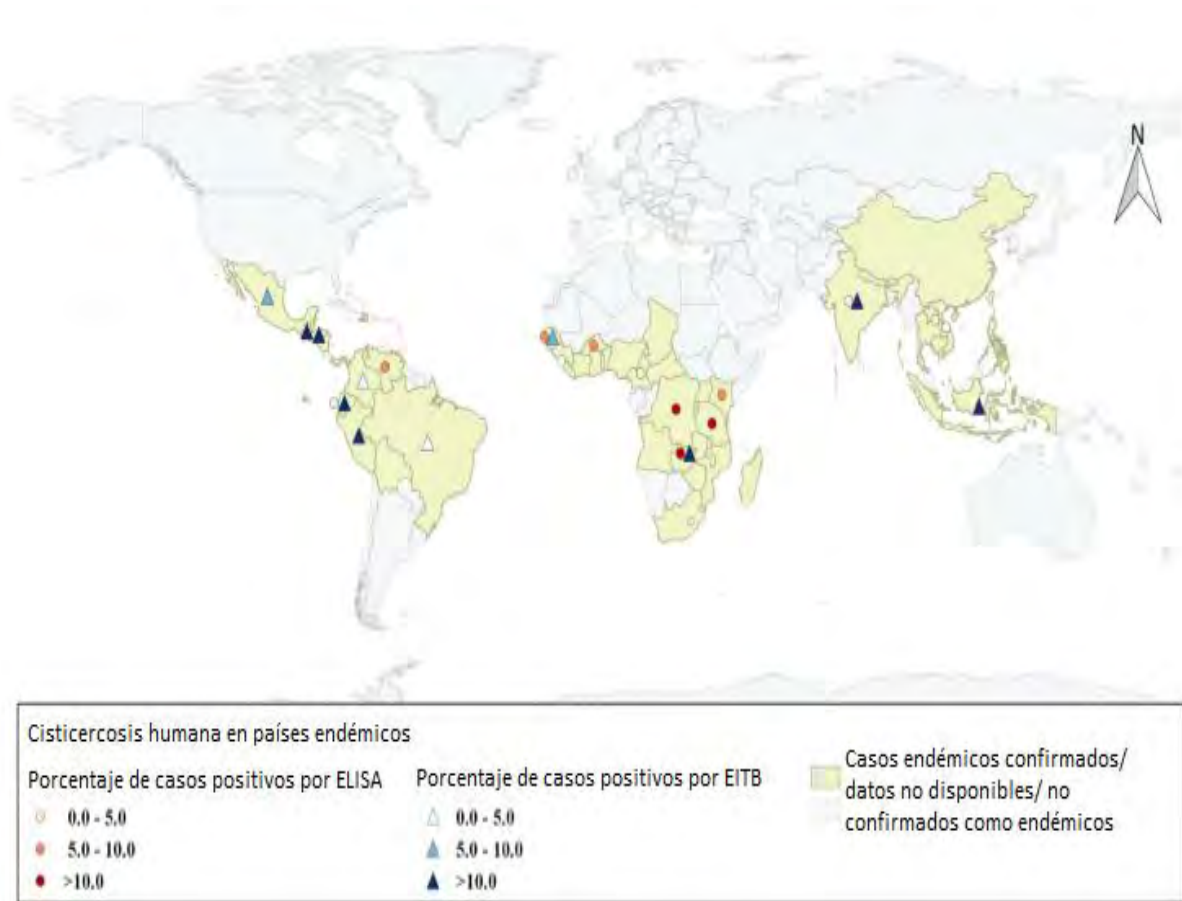


Fig 2. Casos positivos determinados por inmunodiagnostico a nivel mundial [Almeida MC, Gabriël S, Abatih E et al;2015]

Además se determinó la seroprevalencia de *T. solium* en dos estados de la república mexicana Morelos y Michoacán los datos se observan en la **Tabla 2**.

La neurocisticercosis (NCC), es causa importante de morbilidad y mortalidad en regiones endémicas de Latinoamérica, Asia y África. El control de la transmisión de este parásito mediante el mejoramiento de la calidad de vida, nivel social, económico, educativo, y de salud pública, no es una alternativa a corto plazo en países subdesarrollados. Por otro lado, lejos de ser erradicado este parásito fue clasificado desde el año 2010 hasta el 2015 por la OMS como una enfermedad tropical desatendida que continúa causando graves problemas de salud pública y pérdidas económicas a nivel mundial [OMS; 2015].

Tabla 2. Estudios de seroepidemiología para cisticercosis en humanos usando el ELISA y/o la EITB.
En rojo se indican los casos reportados en México [Almeida MC, Gabriël S, Abatih E et al; 2015].

Autor	AP	País	Localidad	Casos de circulación Ag positivo/ Total de participantes	Prevalencia de circulación Ag (%) [95%CI]	Casos Ab positivos/ Total de participantes	Ab seroprevalencia (%) [95%CI]
Díaz et al.	1992	Peru	San Martín			30/371	8.09 [5.52–11.34]
Sarti et al.	1992	Mexico	Morelos			167/1546	10.80 [9.3–12.46]
Sarti et al.	1994	Mexico	Michoacán			49/1005	4.88 [3.63–6.39]
García-Noval et al.	1996	Guatemala	Jutiapa			207/1542	13.42 [11.76–15.23]
Sanchez et al.	1998	Honduras	Francisco Morazán			63/404	15.59 [12.2–19.5]
García et al.	1998	Peru	Cusco			24/102	23.8 [15.69–32.96]
Sanchez et al.	1999	Honduras	Olancho			80/480	16.67 [13.44–20.31]
García et al.	1999	Peru	Cusco			14/108	12.96 [7.27–20.8]
Sarti et al.	2000	Mexico	Morelos			91/1603	5.68 [4.59–6.92]
García et al.	2001	Peru	Piura			76/482	15.77 [12.63–19.33]
		Peru	Junín			140/398	35.18 [30.48–40.1]
		Colombia	N.A.			23/750	3.07 [1.95–4.57]
Gomes et al.	2002	Brazil	Bahia			11/694	1.59 [0.79–2.82]
García et al.	2003	Peru	Junín			355/2583	13.74 [12.44–15.13]
Ferrer et al.	2003	Venezuela	Carabobo	27 ^b /296	9.12 [6.10–12.99]		
		Venezuela	Lara	37 ^b /608	6.08 [4.32–8.29]		
		Venezuela	Lara	20 ^b /305	6.56 [4.05–9.95]		
Agudelo-Flores & Palacio	2003	Colombia	Antioquia			12/661	1.82 [0.94–3.15]
Moro et al.	2003	Peru	Lima			66/316	20.89 [16.54–25.79]
Rodríguez et al.	2003	Ecuador	Pichincha & Imbabura	215 ^a /4306	4.99 [4.36–5.69]		
Montano et al.	2005	Peru	Tumbes			200/825	24.24 [21.35–27.32]
Rodríguez et al.	2006	Ecuador	Loja	18 ^a /800	2.25 [1.34–3.53]	40/100	40.00 [30.33–50.23]
Agudelo-Flores et al.	2009	Colombia	Chocó			4/46	8.70 [2.42–20.79]
Lescano et al.	2009	Peru	Tumbes			196/803	24.41 [21.47–27.53]
Praet et al.	2010	Ecuador	Loja	23 ^a /794	2.90 [1.84–4.31]	202/807	25.03 [22.08–28.17]
Coral et al.	2014	Ecuador	Loja	7 ^a /744	0.94 [0.38–1.93]	232/743	31.22 [27.9–34.69]
Total				347/7853	4.42 [3.97–4.90]	2282/16369	13.94 [13.41–14.48]
REMEP:					4.08 [2.77–5.95]		13.03 [9.95–16.88]

II.3 Epidemiología en Latinoamérica.

En 1986 **Colombia** fue el país que presentó la frecuencia más alta de teniasis (8.3%), el diagnóstico se realizó por antecedentes de expulsión de proglótidos. En 2003, se realizó un estudio epidemiológico con el objetivo de conocer la prevalencia de cisticercosis en Colombia, para lo cual se llevó a cabo un estudio de cohorte en el municipio de Ituango haciendo uso del EITB, en este se incluyeron 404 personas de la comunidad de Pasquita y 257 de Guacharaquero, las cuales presentaban manifestaciones clínicas como mareos, convulsiones y desmayos. La EITB se basó en la técnica de Tsang y también se realizaron estudios de imagen como la RMN, obteniendo como resultado final una prevalencia de 2.23% para Pasquita y 1.17% en Guacharachero [Agudelo-P, Palacio L.G; 2003]

Otro país de Latinoamérica en el cual se han realizado esfuerzos para el diagnóstico y manejo de esta enfermedad es **Perú**, como se puede observar en la **Tabla 3**. Saavedra y colaboradores en el año 2010 dieron a conocer que esta patología es menos frecuente en niños y a nivel Latinoamérica la forma subcutánea es rara, mientras que la cisticercosis cerebral con formas quísticas es frecuente [Saavedra H et al; 2010].

Para conocer la prevalencia de Perú se han realizado diferentes estudios, uno de ellos se basa en un estudio descriptivo transversal realizado en el año 2008, en el cual se incluyeron muestras de suero de 386 personas de la provincia de Pompa Cangallo de la región de Ayacucho.

La prevalencia obtenida fue de 3.3% siendo más frecuente en el sexo femenino, esto puede explicarse debido a que las mujeres son las que crían y cuidan los animales, por ello tienen mayor posibilidad de contaminación al manipularlos directamente [Cordero A et al; 2010].

Por otro lado, Ishida y colaboradores informaron en 2011 la prevalencia en el estado de Santa Catarina **Brasil**, en donde se recolectaron 878 muestras de sangre por punción capilar sobre papel filtro Whatman. Estos individuos fueron entrevistados previamente con el fin de recopilar información demográfica, sanitaria y de salud. Para garantizar la confiabilidad de los resultados, las muestras reactivas fueron sometidas a una prueba confirmatoria por el EITB utilizando las glicoproteínas purificadas de *T. crassiceps*. Los resultados del ELISA fueron estadísticamente consistente. Obteniendo una prevalencia de 3.4% en este estado, lo que indica que es mayor la prevalencia de esta parasitosis en Santa Catarina con respecto a Sao Paulo estado en el cual la prevalencia fue de 2.1% [Ishida MMI et al; 2011].

Tabla 3. Número de intervenciones quirúrgicas en el servicio de microcirugía y neurocirugía por neurocisticercosis, en Perú.

En rojo se presentan los diagnósticos pre operatorios relacionados con cisticercosis.

DIAGNOSTICO PRE OPERATORIOS	TOTAL
TOTAL GENERAL	949
MICRONEUROCIRUGIA	167
ANEURISMA DE ARTERIA : carotida anterior, posterior o media	49
TUMOR DEL S.N.C.	41
HIDROCEFALIA : crónica, obstructiva, hipertensiva, por neurocisticercosis	36
NEUROCISTICERCOSIS	7
QUISTE POR NEUROCISTECERCOSIS	7
MALFORMACION ARTERIO VENOSA CEREBRAL	6
HEMATOMA SUBDURAL O EPIDURAL	5
QUISTE DEL IV VENTRICULO	4
HIPERTENSION ENDOCRANEANA	3
DEFECTO OSEO CRANEAL	1
ESTENOSIS RAQUIDEA: Lumbar, cervical o dorsal	1
HEMORRAGIA INTRAPARENQUIMAL	1
LIPOMA DE CUERO CABELLUDO	1
HIPERTENSION ENDOCRANEANA	1
INFARTO MALIGNO DE ARTERIA CEREBRAL	1
HEMORRAGIA INTRAVENTRICULAR	1
QUISTE INFRATENTORIAL	1
HEMOVENTRICULO	1
TUMOR DEL S.N.C.	191
HERNIA NUCLEO PULPOSO :Lumbar, cervical o discal	158
ESTENOSIS RAQUIDEA: Lumbar, cervical o dorsal	128
HIDROCEFALIA : crónica, obstructiva, hipertensiva, por neurocisticercosis	88
HEMATOMA SUBDURAL O EPIDURAL	50
EPILEPSIA SINTOMATICA REFRACTARIA: Frontal y del Lobulo temporal	19
QUISTE POR NEUROCISTECERCOSIS	18
TRAUMATISMO VERTEBRO MEDULAR: Lumbar, Dorsa o PAF	10
DEFECTO OSEO CRANEAL	9
HIPERTENSION ENDOCRANEANA	8
NEURALGIA DEL TRIGEMINO	6
FISTULA DE LCR	4
MIOPATIA	4
FRACTURA VERTEBRAL LUMBAR	4
NEUROCISTICERCOSIS	3
HIDROSIRINGOMIELIA	3
QUISTE ARANOCIDEO:DORSAL O DORSOLUMBAR	3
ESPONDILODISCITIS DORSAL	3
COMPRESION MEDULAR DORSAL	2
LISTESIS LUMBAR	2
MIELOPATIA ESPONDILOARTROSICA CERVICAL	2
SINDROME DE TUNEL CARPIANO	2
HIPERTENSION ENDOCRANEANA	2
LIPOMA CERVICO DORSAL	2
LESION DE NERVIOS : PERIFERICO, CIATICO	2
RECHAZO DE ARTRODESIS LUMBAR	2
DISTONIA GENERALIZADA	2
POLINEUROPATIA	2
ESPONDILOLISTESIS LUMBAR	1

II.4 Epidemiología en México de Taenia solium.

En el año 2001, se reportó un estudio dirigido por el Dr. Norberto Vibanco-Pérez y colaboradores en el Estado de Nayarit, estimando en 500 personas el promedio anual de casos con cisticercosis.

Las estadísticas oficiales señalaron que esta enfermedad fue la causa del 50% de casos con epilepsia tardía, datos que se presentaron por parte de la Secretaría de Salud, los cuales derivaron de la notificación que hacen los servicios médicos como son el ISSTE, IMSS y la propia Secretaría.

De acuerdo a estos antecedentes la infección por *T. solium* en México se presentó con una frecuencia del 0.2 al 3.4 % para teniasis y 1% para cisticercosis, lo que presenta un millón y medio de personas portadoras del parásito, esto con respecto a datos obtenidos en este grupo de trabajo, recopilados desde el año 1990-1994 [Mejía K et al; 2001].

En México las entidades federativas más afectadas para cisticercosis de 2014 - 2015 fueron Aguascalientes, Chiapas, Guanajuato, Nuevo León, Querétaro, Veracruz, Chihuahua, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, San Luis Potosí y Sinaloa. [Secretaría de Salud, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2015], ver **Fig.3**.



Fig. 3 Principales entidades federativas con casos del complejo teniasis-cisticercosis

En el año 2014 se reportaron en total 113 casos nuevos de cisticercosis en toda la república mexicana, datos que dio a conocer la Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud; de los cuales los meses en los cuales se presentó la mayor incidencia fueron julio (16 casos), agosto (28 casos) y noviembre (11 casos) siendo el estado de Veracruz el más afectado (24 casos) **Tabla 4.**

Tabla 4. Casos nuevos de cisticercosis por mes de ocurrencia, tomados de la Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, para 2014.

MES DE OCURRENCIA													
ESTADO	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Total
Aguascalientes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baja California	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	5
Baja California Sur	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3
Campeche	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coahuila	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Chiapas	2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	6
Chihuahua	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	3
CD-MX	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	3
Durango	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
Guanajuato	2	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	3	9
Guerrero	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidalgo	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Jalisco	2	3	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	9
México	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	5
Michoacán	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4
Morelos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Nayarit	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2
Nuevo León	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	4
Oaxaca	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Puebla	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	4
Querétaro	0	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	5
Quintana Roo	0	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	4
San Luis Potosí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sinaloa	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3
Sonora	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	5
Tabasco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tamaulipas	0	0	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	5
Tlaxcala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Veracruz	0	0	0	0	0	0	1	23	0	0	0	0	24
Yucatán	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Zacatecas	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	3
TOTAL GLOBAL	10	8	7	3	6	6	16	28	3	8	11	7	113

II.5 Ciclo biológico.

Este parásito alterna entre el ser humano como hospedero definitivo y el cerdo como hospedero intermediario, en su estadio adulto habita en el intestino delgado del ser humano. Su presencia ocasiona la teniasis. La *Taenia* o solitaria, produce miles de huevos, que se expulsan con las heces. El cerdo se infecta al ingerir las heces humanas con huevos o proglótidos del parásito. Cada huevo puede potencialmente convertirse en un cisticerco ocasionándole la cisticercosis, ya que al ingerir los huevos, sus oncosferas por acción de las enzimas digestivas como la tripsina y las sales biliares pierden el embrióforo, se activan y atraviesan la pared intestinal y por medio del torrente sanguíneo llegan a músculo y otros órganos donde se convierten en la forma larvaria o cisticerco. Una vez establecido en el tejido del huésped intermediario, se convierte al cisticerco que es ovalado y se caracteriza por tener un escólex visible invaginado en su pared vesicular. Al cabo de unos meses o años, dependiendo de la respuesta inmune del huésped, el cisticerco comienza la degeneración, el líquido de las vesículas se vuelve denso y opaco, el cisticerco pierde su forma regular disminuyendo su tamaño y finalmente el cisticerco llega a la etapa de la calcificación en la que termina como un nódulo calcificado blanco redondo [Almeida MC, et al; 2015]. El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos mal cocida. El medio ácido del estómago y las enzimas digestivas liberan la larva de la pared vesicular, y el escólex contenido en el cisticerco se fija en las paredes del primer tercio del intestino pequeño del humano donde se desarrolla a su estadio adulto, **Fig.4.**

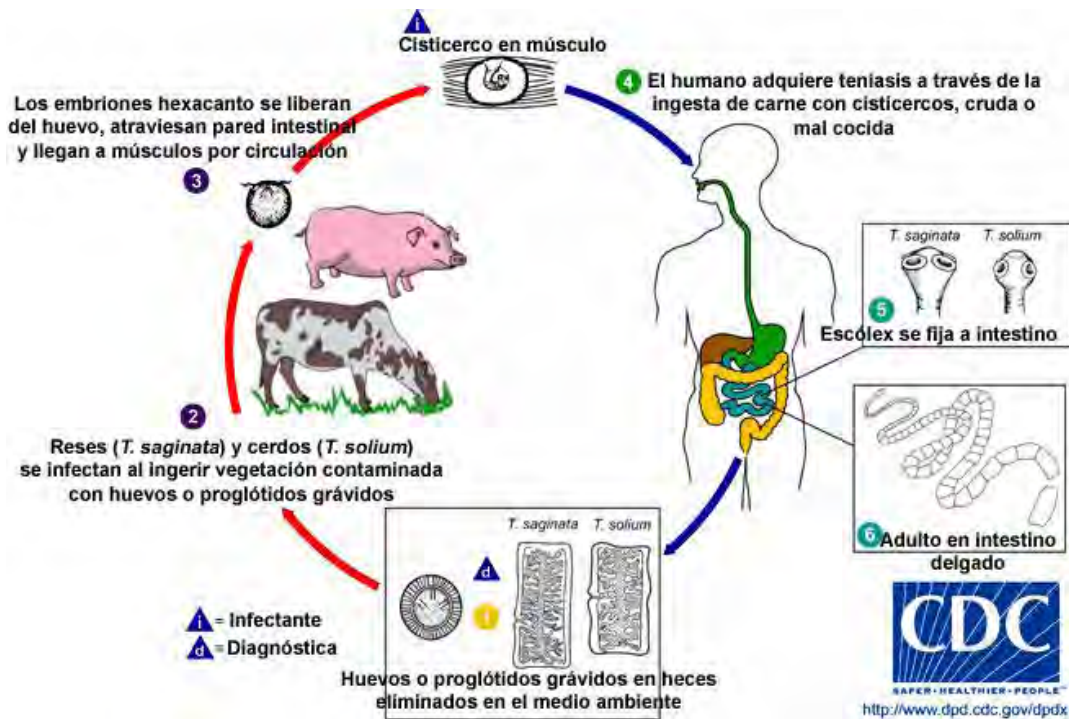


Fig4. Ciclo de vida de *Taenia solium* y *T. saginata*

II.6 Intervenciones para romper el ciclo biológico de *Taenia solium*.

En el año 2013 El Grupo de Trabajo Internacional sobre la Erradicación de Enfermedades (ITFDE) dio a conocer que se cuenta con métodos para interrumpir el ciclo de vida del parásito [Carabin H, et al; 2014]. Algunas de estas estrategias son: 1) **vacunas**: usando extractos de antígenos crudos colectados a partir de los cisticercos de puercos, con antígenos basados en oncosferas recombinantes TSOL16 o TSOL18 [Jayashi CM, González AE et al; 2012], desarrollados por el grupo de Lightowlers cuyo porcentaje de protección es de 100% [M.W.Lightowlers;2003]. El péptido el S3PVac [Sciutto et al; 2007] presenta tres péptidos protectores KETc1, KETc12 y GK1, este cuenta con un 74% de protección [Rassy D, Bobes R, Rosas G et al; 2010]. 2) **Inspección**: de los músculos afectados por los cisticercos en rastros para puercos como es el caso de la lengua de los cerdos (se busca la presencia de cisticercos), este método presentó una sensibilidad y especificidad de 50 y 80%, además de esto la 3) **educación**: que es una herramienta importante en el control de cisticercosis, ya que se han llevado a cabo programas para informar a los poricultores, así como a la población en general sobre esta enfermedad, lo que ha resultado con gran éxito [Carabin H, et al; 2014], **Fig.5.**

Para el control de *T. solium* es necesario llevar a cabo 8 intervenciones combinadas de distintas formas dependiendo del país, dentro de las cuales se incluyen las siguientes:

- Quimioprofilaxis
- Identificación y tratamiento de los casos de teniasis
- Educación sanitaria
- Mejoras sanitarias
- Mejoras en la cría de los cerdos
- Vacunación de los cerdos
- Inspección de las carnes y del procesamiento de productos cárnicos [OMS;2015]



Fig. 5 Información para el público. Programa de control de la teniasis-cisticercosis [Gaceta de Biomédicas. UNAM, marzo 2010].

En nuestro país las campañas para controlar el binomio teniasis-cisticercosis, incluyen: Una explicación acerca de la higiene personal, preparación de alimentos, instalaciones obligatorias de letrinas en todos los hogares, combate de la corrupción en la compra y venta de animales y sus derivados, Fig.6.

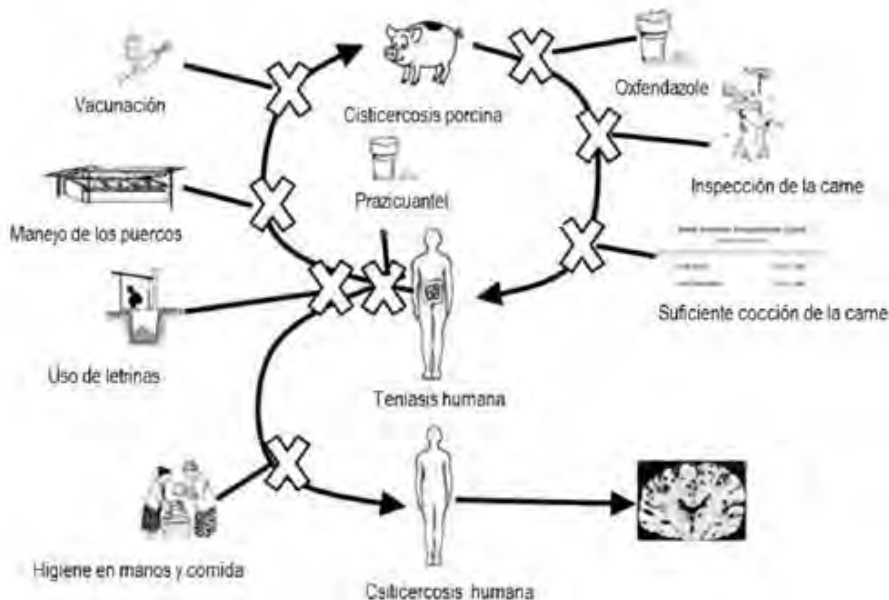


Fig.6. Estrategias para la intervención y control de la cisticercosis, las X denotan las áreas en las cuales el ciclo de vida puede ser interrumpido.

II.7 Diagnóstico de cisticercosis.

El primer reporte de NCC en México se realizó en el año 1901 por el Dr. González Izquierdo de un paciente Cubano con diagnóstico diferente a cisticercosis, sin embargo, durante el procedimiento de autopsia encontraron cisticercos múltiples a nivel cerebral [Flisser A, Gyorkos T.W; 2007].

En la actualidad el diagnóstico para NCC es un desafío ya que las manifestaciones clínicas para esta enfermedad no son específicas, la NCC es una de las infecciones por helmintos más común del SNC, aun en la actualidad su diagnóstico es difícil. Algunas de estas son convulsiones, dolor de cabeza y déficit focal [Del Brutto et a; 2012]. La NCC se presenta como formas intraparenquimales, asociadas con cuadros convulsivos, o formas extraparenquimales, estando estas últimas asociadas con hipertensión endocraneana. Los cisticercos intraparenquimales pasan por las siguientes fases de evolución:

- Fase vesicular: viables, provocan una respuesta inflamatoria mínima.
- Fase coloidal: presencia de inflamación provocada por la respuesta inflamatoria celular alrededor del cisticerco fase nódulo granular: sustitución gradual por tejido fibrótico y colapso progresivo de la pared del quiste.
- Fase de calcificación: incorporación de calcio sobre el tejido fibrótico del parásito [Saavedra H et al; 2010]. En el año 2001 se realizó un consenso en Lima Perú para el diagnóstico de esta enfermedad, en éste se dieron a conocer algunos criterios que permiten evaluar a los pacientes con esta patología, entre los cuales se encuentran los siguientes [Del Brutto O.R et al; 2001]:

Criterios absolutos

- a) Histología: confirmación del parásito en una biopsia de cerebro o lesión de la medula espinal
- b) Lesiones de cisticercos observando el escólex en TAC o RMN
- c) Visualización directa de parásitos subretinales por examinación fundoscopia.

Criterios mayores

- a) Lesiones altamente sugestivas de la NCC en estudios de neuroimagen
- b) Sueros positivos detectados por EITB, usando las LLGP's de *T. solium*
- c) Resolver de manera espontánea lesiones (nódulos calcificados)
- 4) Resolución de lesiones intracraneales después de la terapia con albendazol y praziquantel

Criterios menores

- a) Lesiones compatibles en estudios de neuroimagen con cisticercosis

- b) Manifestaciones clínicas sugestivas de neurocisticercosis
- c) Líquido cefalorraquídeo positivo por ensayos de ELISA
- d) Cisticercos fuera del SNC

Criterios epidemiológicos

Los datos epidemiológicos incluyen el lugar de nacimiento, residencia de los pacientes en áreas endémicas con el binomio de enfermedades, historia de viajes frecuentes a áreas endémicas con estas patologías o evidencia de infecciones por contacto en el hogar con *T. solium* [Del Brutto et al; 2012].

Grados de certeza de la enfermedad

Diagnóstico definitivo

- Presencia de un criterio absoluto
- Presencia de dos criterios mayores
- Presencia de un criterio mayor, dos menores y uno epidemiológico

Probable diagnóstico

- Presencia de un criterio mayor y dos menores
- Presencia de un criterio mayor con uno menor y uno epidemiológico
- Presencia de tres criterios menores y un criterio epidemiológico

Posible diagnóstico

- Presencia de un criterio mayor
- Presencia de dos criterios menores
- Presencia de un criterio menor y un criterio epidemiológico [Del Brutto et al; 2001].

Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear es un examen no invasivo considerado el estándar de oro para el diagnóstico de neurocisticercosis, emplea un campo magnético, pulsos de radiofrecuencia y una computadora para crear imágenes detalladas de los órganos, tejidos blandos, huesos, y prácticamente el resto de las estructuras internas del cuerpo. Este estudio es un procedimiento que utiliza imágenes para medir los pequeños cambios metabólicos que ocurren en una parte activa del cerebro. A diferencia de los exámenes convencionales de rayos X y la exploración por tomografía computarizada (TC), la RMN no utiliza radiación ionizante. El campo magnético se produce al pasar una corriente eléctrica a través de las bobinas de cable de la mayoría de las unidades de RMN. Otras bobinas, ubicadas en la máquina y, en algunos casos, ubicadas alrededor de la parte del cuerpo que se explora, emiten y reciben ondas de radio, produciendo señales que serán detectadas por las bobinas. Posteriormente una computadora procesa las señales y genera una serie de imágenes,

cada una de las cuales muestra una parte del cuerpo. Las imágenes son analizadas desde diversos ángulos por el radiólogo encargado de la interpretación.

Para que un tejido patológico sea visible en una imagen por resonancia magnética, debe haber contraste o una diferencia de intensidad de la señal entre éste y el tejido adyacente [Rivera M, Puentes S, Caballero L; 2011].

Este procedimiento puede alcanzar un costo de hasta \$7,000 y en algunos estados de la república mexicana no es de fácil acceso ya que no se cuenta con la infraestructura requerida.

Tomografía axial computarizada (TAC)

La tomografía computarizada es un procedimiento con imágenes que usa un equipo especial de rayos X. También se llama tomografía axial computarizada [Ramírez-Giraldo J.C, Arboleda –Clavijo C, H. McCollough C; 2008].



Fig. 7. Medida de los perfiles de transmisión de rayos X.

El termino tomografía se origina de las palabras griegas tomos (corte, rebanada o sección). Cada imagen muestra los órganos, los huesos y otros tejidos en un corte delgado del cuerpo. Actualmente cada equipo de TAC toma imágenes continuas en una forma helicoidal, esa técnica tiene la ventaja de ser rápida, no invasiva y mejorar la resolución en las imágenes [Ramírez-Giraldo J.C, Arboleda –Clavijo C, H. McCollough C; 2008].

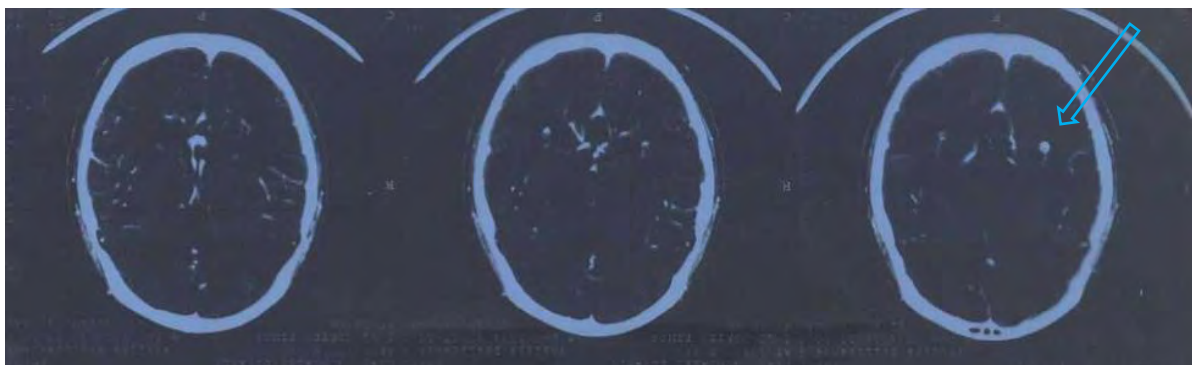


Fig 8. TAC de cráneo simple y de contraste de un paciente que asistió al laboratorio de biología molecular de *Taenia solium* con diagnóstico de neurocisticercosis, cisticerco con localización en el espacio subaracnoideo.

Recomendaciones para el paciente antes de realizar el estudio

La TAC y RM Angioresonancia Cerebral (requiere medio de contraste). Para realizar el estudio de resonancia magnética, es importante cumplir con las siguientes indicaciones [Radiological Society of North America; 2015]. Presentar la receta médica con nombre, firma, cedula profesional y teléfono del médico tratante, ropa cómoda que no tenga broches ni aplicaciones metálicas (aretes, anillos, cadenas, reloj, monedas, celulares, brackets, etc.).

En caso de la aplicación de contraste se requieren 6 horas de ayuno, presentar un acompañante, en caso de ser paciente con afección renal de cualquier edad o ser paciente mayor de 50 años se debe presentar el valor de creatinina sérica.

Método de Tsang

El método se basa en probar por IETB un grupo de glicoproteínas (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13) obtenidas por una columna de *Lentil lectina* (LLGP's). De estas 7 bandas detectadas con sueros de pacientes con cisticercos, 3 de ellas son las que presentan una mayor frecuencia de reconocimiento GP42-39 y GP24 y son consideradas diagnósticas, presenta 100% de especificidad y 98% de sensibilidad, la desventaja de este método es la obtención del material biológico con el cual se debe trabajar, ya que se emplean cisticercos de cerdos infectados naturalmente, **Fig.9** [Scheel CM, Khan A, Tsang VC et al; 2005].

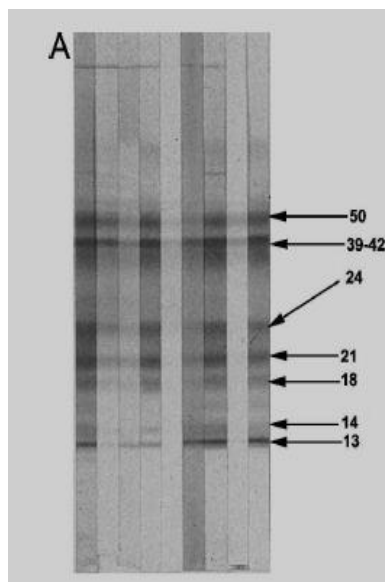


Fig .9. Técnica de Tsang, para el diagnóstico de cisticercosis humana en muestras de suero, reconocimiento de 8 glicoproteínas [Scheel, Khan, Tsang et al; 2005]

Esta prueba fue desarrollada en el CDC de Atlanta, EUA y aunque la prueba es muy fiable, el proceso de purificación de las LLGP's ha sido difícil de transferir a otros laboratorios debido a la necesidad de un equipo costoso y experiencia en la técnica. El costo estimado del ensayo (100 pruebas por semana) es de \$ 3.75, calculando un costo por prueba (tira) de \$ 0.65 [Tsang et al; 1989]. Actualmente se cuenta con 3 antígenos recombinantes (rGP50, rT24H y TsRS1) **Fig.10**, estos antígenos se probaron de forma individual obteniendo la mejor sensibilidad con el antígeno rT24H, para este ensayo se emplearon 249 muestras positivas para NCC en Lima, Perú [Noh J, Rodríguez S et al; 2014].

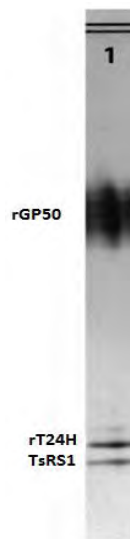


Fig 10. Análisis de las tres proteínas recombinantes por inmunoelectrotransferencia (rGP50, rT24H y TsRS1), todas las proteínas fueron separadas usando SDS-PAGE al 15% y enfrentadas con sueros de pacientes con NCC.

Detección del antígeno HP10 en suero para el diagnóstico de neurocisticercosis

El HP10 es un antígeno utilizado para la identificación del cisticerco de *T. saginata* descubierto en el año de 1989 por Harrison y colaboradores, el cual se identifica con un anticuerpo monoclonal biotinilado. Este antígeno fue utilizado por Fleury y colaboradores para la identificación de 116 muestras de paciente que acudieron al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

El diseño del estudio se basó en un ensayo doble ciego, usando la técnica de ELISA. Las manifestaciones clínicas dependen de la localización del parásito en el SNC. Esto cuando el parásito está localizado en el parénquima o en el espacio subaracnoideo. En contraste cuando este está localizado en la base de Silvio o en los ventrículos, las manifestaciones clínicas son severas frecuentemente y se acompañan por hipertensión intracraneal.

La detección del antígeno HP10 en suero también tiene reportes de usarse como indicador en la presencia de parásitos vesiculares y diagnóstico de hidrocefalia secundaria de neurocisticercosis.

Los niveles de HP10 se determinaron en 126 habitantes de comunidades endémicas rurales para cisticercosis; se obtuvo un 94% de especificidad, además se realizaron reacciones cruzadas con algunos parásitos como *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides* y *Entamoeba histolytica*, observando solo una asociación significativa en el caso de *Entamoeba histolytica* [Fleury A et al; 2007].

Diagnóstico con los antígenos B158/B60 en suero para la detección de neurocisticercosis

Gabriel y colaboradores realizaron la determinación de los antígenos B158/B60, proteínas de excreción/secreción producidas por cisticercos viables. Para el diagnóstico de estos pacientes se tomaron en cuenta los criterios del Brutto 2001, el estudio conto con la participación de 83 personas que presentaban diagnóstico de epilepsia en áreas endémicas para esta parasitosis, este se realizó por el ELISA. Además, se llevaron a cabo reacciones cruzadas con algunos parásitos como *Schistosoma*, *Ascaris*, *Trichuris*, filaria, *Entamoeba*, *Plasmodium* y *Trypanosoma*, para el análisis estadístico se emplearon curvas ROC, obteniendo una sensibilidad del 90 % y una especificidad de 84 % [Gabriel S, et al; 2012].

CISTIBLOT

Laboratorio Escalabs es una empresa que brinda servicios de análisis clínico certificado bajo la norma ISO 9001:2008, este laboratorio produce un estuche comercial CISTIBLOT el cual reporta una sensibilidad del 91 % y una especificidad del 100% para el diagnóstico de la cisticercosis humana [Escalante H, Miranda E, Lorca M; et al 2004]. Este estuche comercial se basa en el EITB, mediante la detección en suero y líquido cefalorraquídeo de anticuerpos IgG. Las tiras contienen glicoproteínas del cisticercos de *T. solium* (No se indica la técnica de extracción), las cuales son separadas por PAGE-SDS de acuerdo a su peso molecular, posteriormente son transferidas a papel de nitrocelulosa, su vida útil es de 8 meses cuando se conserva a una temperatura de 2 a 8°C, este estuche comercial no es de fácil acceso ya que se comercializa únicamente en Perú **Fig.11.**

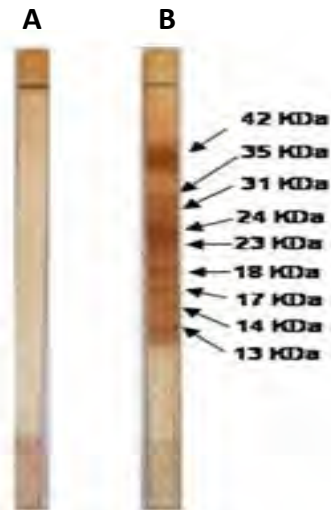


Fig11. Estuche de CISTIBLOT® A) Suero control negativo de humano para cisticercosis, B) Suero control positivo para cisticercosis humana.

II.8 Esquema de tratamiento en humanos y cerdos.

Los cisticercos solo son viables durante el estadio vesicular y coloidal, que son los estadios que responden al tratamiento antihelmíntico. El cisticerco puede afectar el parénquima cerebral o infiltrarse en el fluido cerebroespinal principalmente en los espacios subaracnoideo y ventrículos. Es importante mencionar que la localización del cisticerco a nivel parenquimatosa es de buen pronóstico, mientras que la localización del cisticerco a nivel extra parenquimatosa se encuentra asociado con alta morbilidad y mortalidad [Carpio A, Matthew L.R., 2014].

El esquema de tratamiento para estos pacientes incluye corticoesteroides como la prednisolona, metilprednisolona y dexametasona con el fin de reducir el proceso inflamatorio y fármacos antihelmínticos para la destrucción del parásito:

Albendazol (ABZ)

Un antihelmíntico de amplio espectro su vía de administración es oral y su presentación farmacéutica puede ser de 2 tipos, en forma de tabletas (200 mg) o bien en forma de suspensión (20 mg/mL). Su nombre químico es metil-5-(propiltio)-2-bencimidazolcarbamato y su fórmula molecular es $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ y su estructura (PLM; 2015) se observa en la **Fig. 12**.

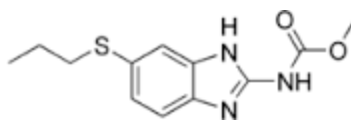


Fig. 12. Estructura química del albendazol.

El ABZ presenta actividad larvicida, ovicida y vermícida, es eficaz en el tratamiento de parásitos tisulares del género *Equinococcus* [Vadecum; 2016]. El mecanismo de acción de este fármaco es similar al del mebendazol, ya que inhibe de forma selectiva la polimerización de los microtúbulos citoplasmáticos de las células intestinales de los nematodos, pero no afecta los del huésped, ocasionando la ruptura de las células y la pérdida de funcionalidad secretora y absorptiva. Produce una acumulación de sustancias secretoras en el aparato de Golgi del parásito, disminuyendo la captación de glucosa y la depleción de los depósitos de glucógeno. Como muchas de las sustancias secretoras presentes en el aparato de Golgi son enzimas proteolíticas que se liberan intracelularmente, la consecuencia final es la autólisis de la célula intestinal y, finalmente, la muerte del gusano.

La dosis indicada en caso de NCC es de 15 mg/kg/día fraccionadas en 2 tomas durante 15 días. El ABZ en una dosis de 400 mg dos veces al día en combinación con 6 mg de dexametasona durante 10 días reduce de manera significativa las crisis convulsivas durante un seguimiento de 30 meses, en ocasiones es necesario que el tratamiento se prolongue hasta 30 días para tratar las formas extraparenquimatosa o generalizada, la razón principal de esto se debe a que el ABZ a diferencia del praziquantel, ha sido eficaz en contra de los cisticercos subaracnoideos gigantes y en los quistes en músculos extra oculares [CDC;2009]. Los pacientes tratados para la NCC deben recibir la terapia anticonvulsiva y de esteroides adecuada a sus necesidades. Se deben considerar los corticosteroides orales o intravenosos para prevenir episodios hipertensivos cerebrales durante la primera semana de tratamiento [PLM; 2015].

Praziquantel (PQZ)

Las infecciones por trematodos suelen tratarse con PQZ. Este fármaco es un agente preferido para la terapéutica de todas las formas de esquistosomiasis y de las infecciones por cestodos como la cisticercosis. La permeabilidad de la membrana celular al calcio se incrementa y produce contractura y parálisis del parásito. El PQZ se absorbe con rapidez después de su administración oral y se distribuye hacia el líquido cefalorraquídeo. Alcanza concentraciones más elevadas en bilis. Sus efectos adversos frecuentemente comprenden somnolencia, mareos, malestar general, anorexia así como trastornos del conducto gastrointestinal [Harvey R, Champe P; 2007]. El PQZ es una molécula altamente lipofílica y se absorbe en el tracto gastrointestinal, es metabolizado en hígado por los CYP1A, CYP 3A y CYP 2C, este fármaco se une de 80 - 85 % a proteínas plasmáticas, su estructura se observa en la **Fig. 13** [Carpio A, Matthew L.R; 2014]

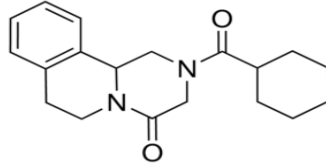


Fig. 13. Estructura química del praziquantel

Como ya se mencionó anteriormente el ciclo biológico de este parásito alterna entre un huésped definitivo que es el hombre y un huésped intermediario que es el cerdo, razón por la cual se han realizado esfuerzos por tratar de disminuir la cisticercosis porcina, estos comenzaron en los años 70's después de obtener resultados prometedores en el tratamiento para humanos con PQZ.

Algunos otros fármacos involucrados en el tratamiento contra cisticercosis porcina son antihelmínticos de la familia de los benzimidazoles y nitazoxanida. Los benzimidazoles (BZ) representan una clase de antihelmínticos de amplio espectro ver estructuras en la **Fig 14**.

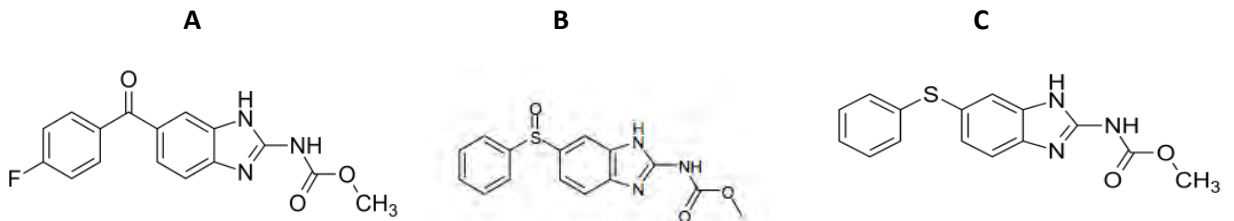


Fig. 14. Estructura química del A) Flubendazol, B) Oxfendazol, C) Fenbendazol

III. JUSTIFICACIÓN

Desde el año 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS), informo que la teniasis y cisticercosis se encuentran formando parte del grupo de enfermedades tropicales desatendidas. *T. solium* es la causa del 30% de los casos de epilepsia en zonas endémicas donde hay cerdos en libertad, más del 80% de los 50 millones de personas afectadas en el mundo por epilepsia viven en países en vías de desarrollo [OMS; 2017]; por lo que esta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública. Estudios recientes demuestran que siguen apareciendo casos de cisticercosis que se concentran en unidades de salud como es el Hospital General y el INNN en el cual el 2.4% de las consultas es debido a pacientes con neurocisticercosis [Fleury et al; 2010].

El diagnóstico para estas parasitosis es un campo en el cual se debe trabajar para lograr un método de bajo costo, específico, sensible, rápido de realizar y de fácil acceso para la población, ya que actualmente para el diagnóstico contamos con técnicas sumamente costosas como es la RMN y la TAC; y con Kits comerciales que no están disponibles para toda la población y no han sido aprobados por la OMS, como es el caso del CISTIBLOT que se distribuye únicamente en Perú.

Por lo que contar con nuevos blancos diagnósticos como es el caso de las proteínas recombinantes (GST26 (Glutación transferasa de 26 KDa), GST25 (Glutación transferasa de 25KDa), P29 (Proteína de 29 KDa), PRX-2 (2-Cys-peroxirredoxina típica), TPI (Triosafofato isomerasa) y disponer de un método que cuente con las características mencionadas anteriormente nos permitirá conocer la prevalencia en México y otros países para esta parasitosis y la detección oportuna de los pacientes con esta enfermedad lo cual facilitara la prescripción de un tratamiento funcional y mejorar la calidad de vida del paciente, así como la erradicación del parásito.

IV. HIPÓTESIS

Las enzimas metabólicas esenciales TPI, P29, GST 25, GST 26, PRX-2 y TRX-1 diagnostican la cisticercosis humana por la técnica de EITB.

V.OBJETIVO GENERAL

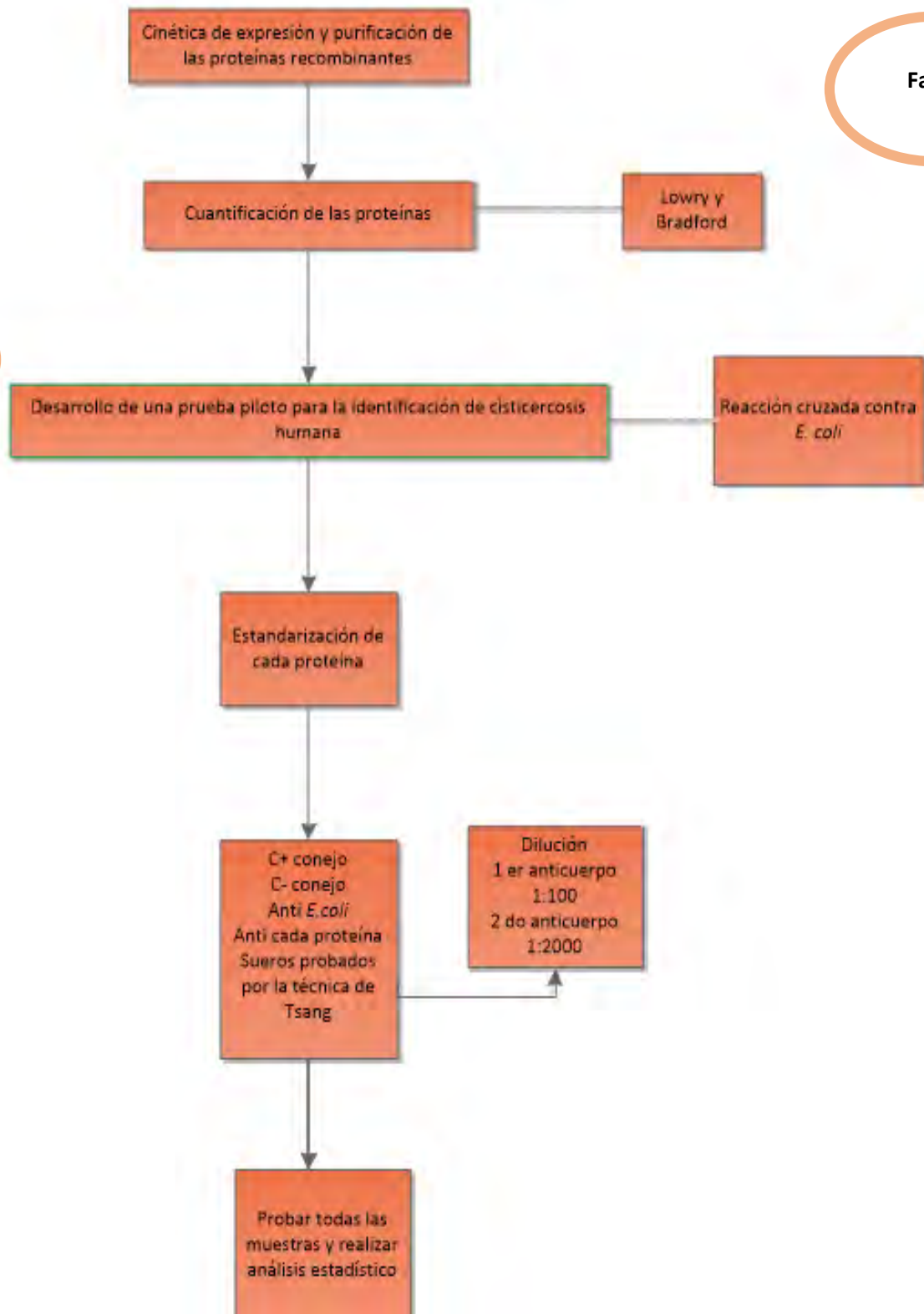
Evaluar nuevos antígenos diagnósticos (TPI, P29, GST 25, GST 26, PRX-2 y TRX-1) para la detección de cisticercosis humana utilizando la técnica de EITB con proteínas recombinantes.

VI.OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificación de las proteínas recombinantes (GST26, GST25, P29, PRX-2, TPI, TRX-1), así como de las LLGP's.
- Determinar cuáles son las proteínas que presentan un mejor reconocimiento (potenciales antígenos diagnósticos).
- Evaluar las muestras de los pacientes confirmados con cisticercosis, pacientes con diversas parasitosis e individuos sanos.
- Medir la sensibilidad y especificidad para cada uno de los antígenos TPI, P29, GST 25, GST 26, PRX-2 y TRX-1.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

VIII. MÉTODO



VIII. 1 Diseño del estudio.

El objetivo de los estudios para evaluar una prueba diagnóstica es determinar la capacidad de la prueba para discriminar entre personas que padecen la enfermedad y aquellas que no la padecen.

Este proyecto se definió como un estudio descriptivo transversal, este es el diseño más empleado para evaluar pruebas diagnósticas y se caracteriza por seleccionar dos grupos de individuos, un grupo que padece la enfermedad y otro sin ella, y se comparan los resultados obtenidos con la nueva prueba diagnóstica en dichos individuos con un estándar de oro.

En nuestro caso todos los pacientes incluidos en este estudio contaban con RMN o TAC (estándar de oro) y a su vez se realizó a cada muestra de suero la prueba de Tsang (prueba serológica de referencia).

VIII.2 Población de estudio.

Se llevó a cabo un estudio para evaluar una prueba diagnóstica con pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" y muestras colectadas por parte de la Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS) provienen de la facultad de Ciencias Químico Biológicas "Laboratorio Kaethe Willms Manning", en estas instituciones se realiza investigación relacionada con la Salud Pública, además de generar conocimientos nuevos en el área de la Parasitología, todo en pro de una mejor salud para los mexicanos.

El proyecto consistió en que a los pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión se les tomaría una muestra sanguínea (obtenida por punción venosa cubital de 5mL, centrifugada a 2500rpm a 10°C durante 15 min y almacenada a -70°C en alícuotas de 200µL) con el fin de evaluar las proteínas P29, GST-26, GST-25, TRX-1, TPI, PRX-2.

VIII.3 Calculo del tamaño de muestra.

El cálculo del tamaño de muestra se realizó tomando en cuenta la sensibilidad de una nueva prueba diagnóstica: En dónde este parámetro estadístico se define como la capacidad de la prueba para detectar a un sujeto enfermo, es decir expresa cuan "sensible" es la prueba a la presencia de enfermedad.

H0= La sensibilidad de la técnica de Tsang para la identificación de cisticercosis es igual a la técnica de EITB con proteínas recombinantes

H1= La sensibilidad de la técnica de Tsang para la identificación de cisticercosis es diferente a la técnica de EITB con proteínas recombinantes

Dichas hipótesis estarán planteadas en términos de proporciones.

Ecuación empleada:

Parámetros para calcular la n: Para el cálculo del tamaño de la muestra se utiliza la siguiente función, con un nivel de significancia α y un poder de $1-\beta$, esta ecuación nos permite comparar una proporción conocida π_1 con una proporción π_2 que se va a estimar

$$N = \frac{\{Z_{1-\alpha/2} \sqrt{[\pi_1(1-\pi_1)]} + Z_{1-\beta} \sqrt{[\pi_2(1-\pi_2)]}\}^2}{\delta^2}$$

En esta función π_1 es el valor conocido de la sensibilidad, especificidad o valores predictivos de la prueba patrón, π_2 es el valor que se espera tenga la prueba en dichos parámetros, y $\delta = \pi_2 - \pi_1$

$$\begin{aligned}\pi_1 &= 0.90 \\ \pi_2 &= 0.95 \\ \delta &= \pi_2 - \pi_1 = 0.05 \\ \alpha &= 0.05 \\ \beta &= 0.2 \\ 1-\beta &= 0.8 \\ Z_{1-\alpha/2} &= 1.96 \\ Z_{1-\beta} &= 0.84\end{aligned}$$

Calculo del tamaño de muestra en el paquete estadístico "R"

Poder prueba t (delta=0.05, poder=0.8, tipo="una.muestra", alternativa="dos.colas", DS=0.2)

One-sample t test

n = 127.5161

Delta = 0.05

DS = 0.2

Nivel de significancia = 0.05

Poder estadístico = 0.8

Alternativa = dos.colas

Después de realizar el cálculo del tamaño de muestra que corresponde a 127 individuos para este proyecto, contactamos centros de referencia como el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (Manuel Velasco Suárez), así como la Universidad Autónoma de Sinaloa para poder tener acceso a las historias clínicas y por ende a las muestra, obteniendo en total 54 muestras de pacientes con diagnóstico confirmatorio de cisticercosis, 30 muestras de individuos sanos y 10 muestras con otras parasitosis.

Criterios de inclusión:

- Pacientes de ambos sexos que acuden a la consulta de los lugares de referencia.
- Carta de consentimiento informado firmada en el período en el cual se extrajo la muestra (Ver Anexo 1).
- Expediente clínico completo.
- Cuenten con estudios de laboratorio confirmatorios.

Criterios de exclusión:

- Casos clínicos que habiéndose registrados con diagnóstico de parasitosis, no cuenten con la historia clínica completa.
- No se cuente con la carta de consentimiento informada firmada (Ver Anexo 1).
- No se tengan estudios de neuroimagen o estudios de laboratorio confirmatorios.

VIII.4 Análisis estadístico.

Los resultados fueron almacenados en una base de datos usando el programa computacional Excel 2013 y analizados con el fin de conocer la validez diagnóstica de los antígenos P29, GST-26, GST-25, TRX-1, TPI, PRX-2. Para lo cual se determinaron sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada uno de ellos haciendo uso de tablas de contingencia.

Estos parámetros permiten cuantificar la capacidad de la prueba para clasificar correcta o erróneamente a una persona, según la presencia o ausencia de una enfermedad.

IX. MÉTODOLÓGÍA

IX.1. Producción de proteínas recombinantes.

Su obtención se realizó utilizando el vector pRSET el cual está diseñado para la expresión procariota de alto nivel controlado por el promotor del bacteriófago T7, la expresión es inducida por IPTG, para la producción de ARN polimerasa de T7 en la cepa BL21 de *Escherichia coli*, Se parte de un precultivo de 50mL en medio LB-ampicilina de la clona a trabajar, se crece a 130rpm/37°C/toda la noche (Unimax 1010 – Inkubator 1000 Heidolph®). Al día siguiente se inocula este precultivo a un matraz con 500mL de medio LB-ampicilina, se incuba a 130rpm/37°C hasta alcanzar una D.O de 0.4-0.6 a 600nm (UV/visible Spechophotometer, Amersham Bioscience, Ultraspec 3100 pro), alcanzada la densidad óptica se adicionó IPTG 1mM al medio de cultivo incubando un tiempo de 4 a 6h, posteriormente se centrifugó el cultivo a 11,000 g durante 15 min (Multifuge 3 S-R, Heraeus®), se recuperó el pellet, se lavó con PBS y se centrifugó a 11,000 g durante 15 min, finalmente se congelo a -70°C hasta su uso.

Este vector presenta la ventaja de unir seis histidinas al producto de expresión, por lo que facilita su purificación, mediante columnas de afinidad a metales (Níquel, GE healthcare, HisTrap HP), mientras que la GST25 y GST26 están clonadas en el vector pTr99 y expresadas de forma nativa. Estas fueron purificadas por columnas de sefarosa acopladas a glutatión. Las proteínas se concentraron empleando el sistema de ultrafiltración (Millipore Amicon 8050) y se determinó su concentración por dos métodos de Lowry y Bradford.

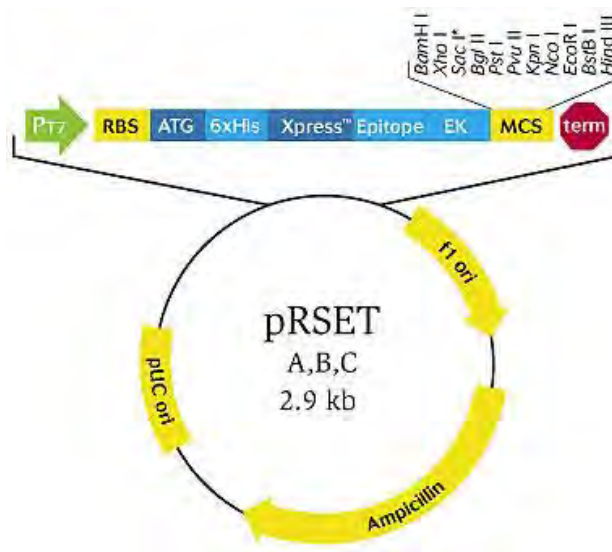


Fig.2. Mapa del vector pRSET

IX.2. Purificación de proteínas

Proteínas P29, PRX-2, TPI, TRX-1

Se resuspendió el pellet de 500mL en 20 mL de TrisED con 6M de urea, posteriormente se sonicó el pellet y se centrifugo a 15000 rpm/10°C/15min. Antes de comenzar con la purificación se realizó el lavado de la columna con 10 mL de H₂O MQ y se equilibró con 10mL de TrisED con 4M de Urea, a continuación se pasó el sobrenadante por la columna ya equilibrada, se desechó el primer mililitro y se recuperó el resto, posteriormente se realizó un lavado con 10 mL de TrisED 4M Urea, al finalizar se colocó el gradiente de 50mM de imidazol en el mismo amortiguador y se recuperó la fracción correspondiente a lavado, a continuación se colocó la fracción 100mM de imidazol en el mismo amortiguador y se recuperó la fracción correspondiente a 50mM, posteriormente colocamos la fracción correspondiente a 200mM de imidazol, recuperamos la fracciones de 100, 200, 300, 400 y de 500mM. Las fracciones se dializaron con TrisED cada una, usando membranas Spectra/Por® número 3. Este procedimiento se repite pero sin utilizar urea.

Proteínas *Glutación-S-transferasas*

El pellet se homogenizó y liso en 20 mL de solución de extracción (PBS 10X pH 7.4, Tritón y EDTA, PMSF y TLCK) con el sonicador en tiempos de 1min y 1min de descanso en hielo, posteriormente la solución obtenida se centrifugo a 12,000 g durante 15min a 4°C, a continuación se colectó el sobrenadante y se filtró para evitar que la columna se tapara, el filtrado se pasó por la columna GSTrap-4B, la cual fue previamente lavada y equilibrada con amortiguador de columna (PBS y 1% tritón) y se incubó 30 min en agitación, posteriormente se lavó con amortiguador de unión (PBS y 1% tritón) y finalmente se eluyó con 25mL de amortiguador de elución (10mM de glutatión y 50mM de Tris-HCl pH 8.0). Las muestras se concentraron y cuantificaron para conocer la cantidad de proteína obtenida.

IX.3. Obtención de las LLGP's de Taenia solium.

A partir de la disección de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente se obtuvieron los cisticercos, estos fueron lavados 3 veces con amortiguador de fosfatos 0.01M, solución salina 0.15M, pH 7.4 (PBS) y guardadas a -70°C hasta su uso.

El extracto crudo fue preparado por homogenización a partir de 10g de cisticercos congelados en amortiguador de extracción frío con inhibidores de proteasas haciendo uso de un Polytron (IKA®

Works Inc) a velocidad máxima (25,000rpm, 100w) con tiempos de 1 minuto a 4°C. El resultado de la suspensión fue centrifugado a 500 g durante 10 min a 4°C (Multifuge 3 S-R, Heraeus®), colectando el sobrenadante, este se centrifugo a 60,000 g durante 2h a 4°C (Allegra 64R Centrifuge Beckman Coulter®), se recuperó el sobrenadante y se dializó durante 12 h en Tris-HCl/NaCl a pH 8.0 con membranas de diálisis (Spectra/Por® Spectrum Laboratories), la solución recuperada de la membrana fue dializada nuevamente a una concentración menor de Tris-HCl/NaCl a 3,452g durante 30 minutos a 4°C (Multifuge 3 S-R, Heraeus®), colectando únicamente el sobrenadante al cual se le determinó la concentración de proteína, las LLGP's se purificaron pasando el extracto por columnas de Lentil lectina-sefarosa 4B (LLGP's). El material eluido de la columna se dializó durante 12 horas en PBS con membranas de diálisis (Spectra/Por® Spectrum Laboratories), la solución recuperada de la membrana fue centrifugada a 3,452g durante 30 min a 4°C (Multifuge 3 S-R, Heraeus®) y se determinó la concentración de proteína por los métodos de Lowry y Bradford.

IX.4. Cuantificación de proteínas.

Lowry

Esta reacción tiene su fundamento en la asociación de dos reacciones: La reacción de Biuret, en la cual los grupos Cu^{2+} de grupos amino en medio alcalino forman enlaces de coordinación originando complejos de color violeta. Por otra parte el reactivo de Follin-Ciocalteu con el cual los grupos OH reductores junto con los complejos cupro proteicos de la reacción anterior reducen al reactivo de Follin para dar una reacción azul oscuro [Stoscheck C.M; 1990]. Para el desarrollo de este método se utilizó BSA como control positivo y agua como control negativo, todas las muestras se diluyen en un volumen final 1mL con PBS y se incluyen por duplicado; a cada tubo se le añaden 4mL de la muestra final (Ver Anexo 2), la reacción se deja incubar durante 10min a temperatura ambiente, a continuación se agregaron 400 μ L del reactivo Follin diluido 1:1 en agua, se incubo 45 min a temperatura ambiente, finalmente las muestras se leyeron a 600nm.

Bradford.

El azul brillante G-250 Coomassie (Reactivo de Bradford) se adhiere a la proteína, este colorante se torna de color rojizo azulado y el máximo de absorción cambia de 465nm a 595nm. El cambio en la absorbancia a 595nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra [Bradford M.M; 1976], [Compton S.J, Jones C.G; 1985]. Para esta técnica se realizó una curva con BSA por duplicado con las siguientes concentraciones 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/mL, todas las muestras se diluyeron

en 800µL de PBS y finalmente se agregaron 200µL del reactivo de Bradford, en el caso de la muestra problema se emplearon 5µL de esta, diluida en 800µL de PBS con 200µL del reactivo de Bradford, a continuación se incubaron todas las muestras 5 min a temperatura ambiente y se leyeron a 595nm.

IX.5. Estandarización de la técnica de Inmunolectrotransferencia ligado a enzima (EITB).

En un primer ensayo se emplearon 23 muestras de suero previamente confirmadas por la técnica de Tsang y TAC para la estandarización de antígeno, dilución de anticuerpo primario y secundario, así como los tiempos de lavado y de incubación. En este primer ensayo las muestras utilizadas fueron provenientes del Estado de Nayarit y corresponden al municipio de Tepic, localidad Caleras de Cofrado, esta población fue seleccionada en el año 2001 por la poca dispersión de las viviendas, familiaridad de los habitantes entre sí, además por la clara sospecha de la presencia de individuos con cisticercosis. Esta localidad se encuentra localizada al noreste del municipio de Tepic, aproximadamente a unos 35 kilómetros de distancia. Su clima se describe como extremo y su economía está basada en actividades agrícolas y ganaderas en pequeña escala [INEGI 2016]. Aunado a esto se realizó un cuestionario, el cual contenía 60 preguntas entre las cuales se obtuvieron datos (ubicación) de la vivienda y familia; datos demográficos, condiciones socioeconómicas familiares, prácticas de riesgo [Sarti E et al., 1997].

IX.6. EITB de las proteínas recombinantes y fracción de LLGP's

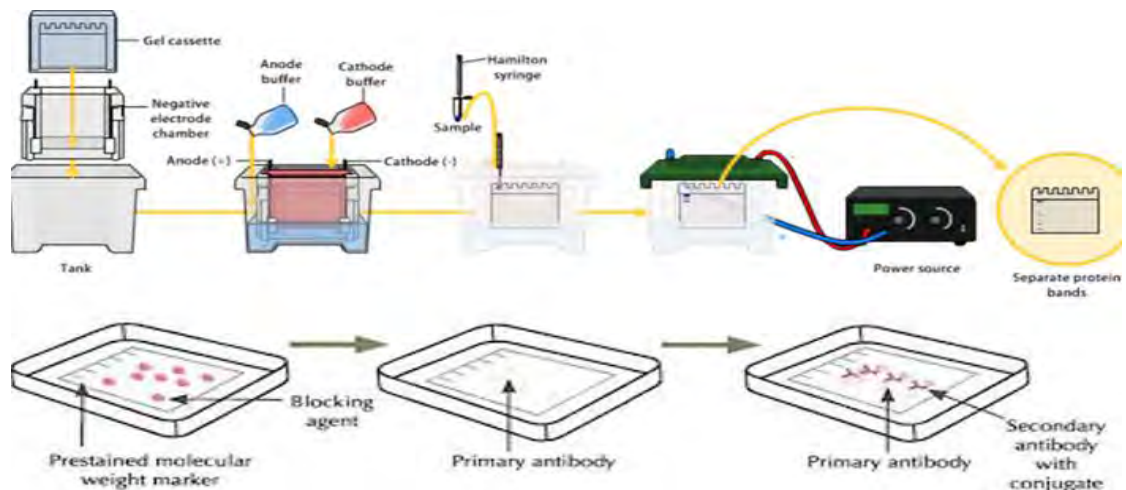


Fig.3. Secuencia de la EITB.

En este ensayo se probaron diferentes cantidades (0.250, 0.500 y 1 μg) de las proteínas recombinantes GST26, GST25, P29, PRX-2, TPI, TRX-1 de *T. solium* y 5 μg de las LLGP's las cuales fueron analizadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. A continuación se transfirieron todas las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Nitrocelulose Membranes, BIO-RAD) en una cámara de transferencia (Mini-PROTEAN® BIO-RAD) a 100mV, durante 1h a 4°C.

Para el ensayo de EITB, se procedió a bloquear las membranas con leche Svelty y PBS + Tween 0.3%, se incubaron durante toda la noche, al siguiente día se lavaron las membranas y se incubaron con el anticuerpo primario (suero de humano dilución 1:100) durante 2 h, a continuación se realizaron 3 lavados con PBS +Tween 0.3% de 5 minutos cada uno, posteriormente se incubaron 1.30 h más con el segundo anticuerpo (Antihumano (IgG) peroxidado dilución 1:2000) finalmente se reveló con una solución de DAB y peróxido de hidrógeno.

Esta técnica tiene como objetivo separar las proteínas por peso molecular e identificarlas en los sueros problema. Los anticuerpos solo se unen a las proteínas de interés observándose una sola banda, la intensidad de la banda corresponde a la concentración de proteína.

IX.7. Producción de anticuerpos vs Escherichia. Coli.

Las proteínas recombinantes se produjeron en *E. coli*. Razón por la cual se llevó a cabo la producción de anticuerpos anti-*E. coli* para asegurar que no existen reacciones cruzadas con proteínas de la bacteria, se describe el procedimiento en la **figura 4**.

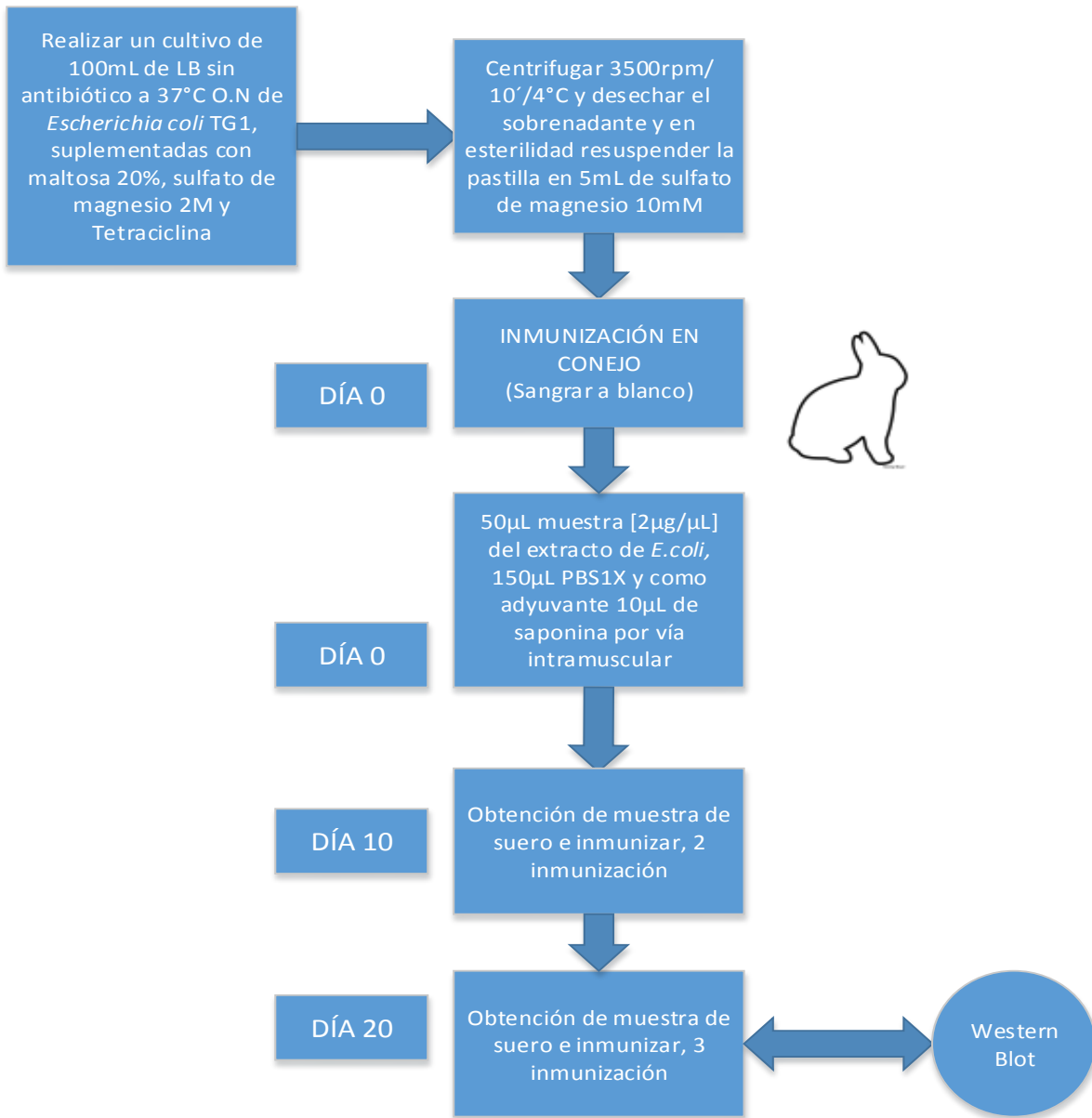


Fig 4. Producción de anticuerpos vs *E. coli*

X. RESULTADOS

X.1 Resultados de la purificación de proteínas.

En la primera etapa del proyecto se llevó a cabo la expresión y purificación de cada una de las proteínas recombinantes con o sin histidinas (TPI, GST25, GST26, P29, PRX-2 y TRX-1). Las proteínas expresadas con histidinas se purificaron por medio de una columna IMAC de afinidad a metales (Ni). Como un ejemplo de las purificaciones, se muestra el gel de poliacrilamida con SDS con la secuencia de la purificación de la P29 **Fig. 1**, en el primer carril observamos el extracto de *E. coli* inducida con IPTG a una concentración final de 1 mM, observamos que el lisado bacteriano se compone de proteínas que van desde 10-200 kDa, en donde se resalta la expresión de una proteína con un peso aproximado de 29 kDa; en el segundo carril se puede apreciar un lisado bacteriano antes de ser inducido con IPTG, en el cual se observa un patrón de bandeo idéntico al anterior que no incluye a la proteína de 29 kDa. El lisado fue pasado por la columna y las proteínas unidas a esta fueron eluidas con un gradiente de imidazol (0-500 mM), siendo la concentración de 200mM la óptima para desprender la proteína (carril 3) de la columna, observamos una banda de 29 kDa. Obteniendo una pureza 98% y un rendimiento de 10mg/L de cultivo (**Tabla 1**).

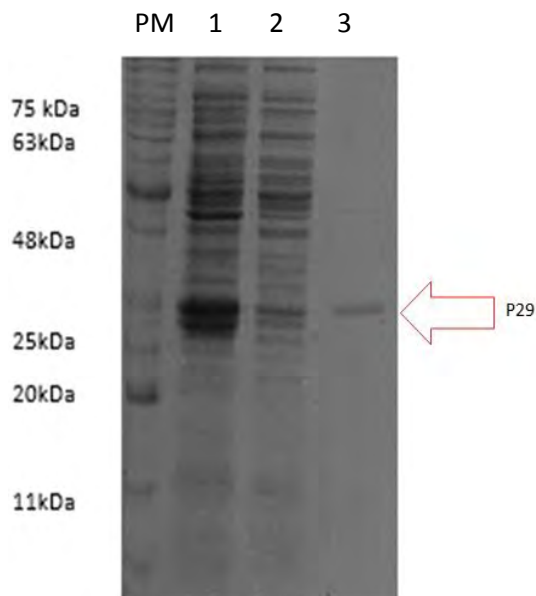


Fig1. Resultado de la purificación de la P29 recombinante en SDSPAGE al 12%, con la columna acoplada a Ni (HisTrap HP). 1) Lisado de *E. coli* que expresa la P29 al ser inducida con IPTG a 1mM, 2) lisado de *E. coli* sin inducir, y 3) la P29 purificada.

En la **Fig. 2**, se muestra la imagen representativa de la purificación de las GSTs, las cuales fueron purificadas empleando columnas de sefarosa 4B acopladas a glutatión. En el primer carril se observa el lisado bacteriano de *E. coli* inducido con 1.5 mM de IPTG, este se compone de proteínas que van desde 10-200 kDa donde resalta la expresión de una banda con peso de aproximadamente 26 kDa, en el carril 2 se ilustra el lisado bacteriano de la *E. coli* sin inducir, en el cual podemos observar un patrón de bandas similar de *E. coli* del carril 1, que no incluye la GST26. Finalmente en el carril 3, se muestra la banda de GST26 pura, eluida con glutatión de la columna cuyo peso es de aproximadamente 26 kDa, con una pureza mayor al 97% y un rendimiento de 20mg/L de cultivo (Tabla 1).

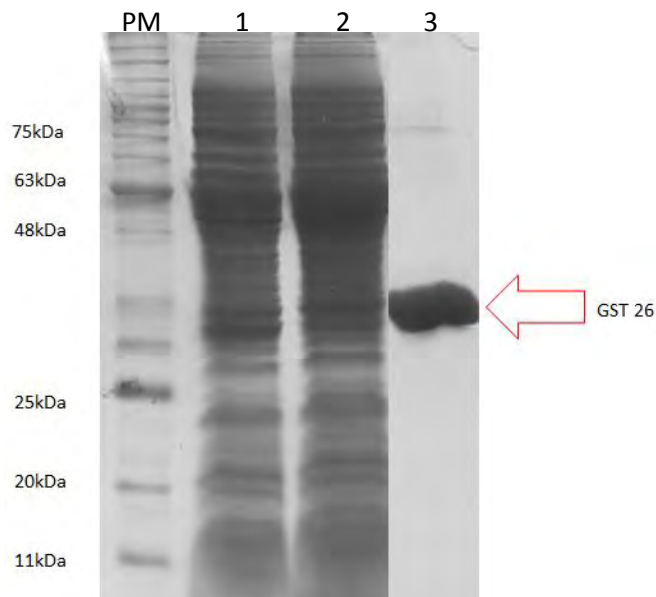


Fig2. Resultado de la purificación de la proteína GST26 en SDSPAGE al 12%, con una columna de sefarosa-GSH. 1) extracto de *E. coli* que expresa la GST26 inducida con 1 mM de IPTG, 2) extracto de *E. coli* sin inducir, y 3) la GST26 pura.

En la **Fig. 3** se muestra la purificación de las LLGP's que se realizó utilizando una columna de *Lentil lectina* acoplada a sefarosa-4B, en el primer carril 1, se muestra un extracto de la larva *T. solium* donde observamos un patrón de bandas que van de 10-200,000 kDa, donde están incluidas las LLGP's que se desean purificar, en el carril 2 se observan las LLGP's obtenidas (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13kDa) [Scheel, Khan, Tsang et al; 2005]).

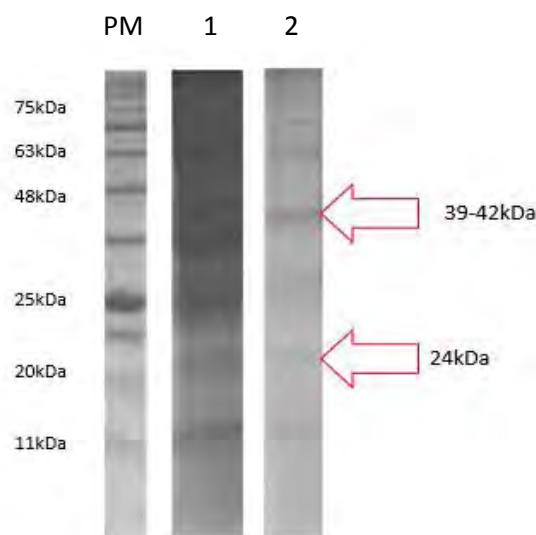


Fig3. Resultado de la purificación de las LLGP's en SDSPAGE al 12%, obtenidas con la columna de sefarosa-4B acoplada a Lentil lectina. 1) extracto de Taenia solium, 2) las LLGP's puras. En flechas rojas se indican las principales bandas diagnósticas para detectar cisticercosis de 39-42 y de 24 kDa.

El rendimiento obtenido para cada proteína recombinante se muestra en la **Tabla 1**, en la cual se especifican los mg por litro de cultivo bacteriano obtenidos después de la purificación.

Tabla 1. Rendimiento de las proteínas recombinantes después de la purificación

Proteína	Rendimiento / 1L de cultivo
TPI	20mg
PRX-2	15mg
GST26	20mg
GST25	10mg
SOD	10mg
TRX-1	15mg
P29	10mg

X.2. Resultados para la estandarización del EITB.

Las proteínas de *T. solium* recombinantes purificadas y las LLGP's fueron evaluadas por el EITB. Para lo cual se transfirieron a membranas de nitrocelulosa 0.45µm (Nitrocelulose Membranes, BIO-RAD), en una cámara de transferencia (Mini-PROTEAN® BIO-RAD) a 100mV, durante 1h a 4°C. Utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.

La concentración de proteína recombinante transferida fue 1µg/mm, dilución del primer anticuerpo 1:50 con incubación por 2h, dilución del segundo anticuerpo (IgG anti humano peroxidado) 1:2000 con incubación por 1.30 h, con un tiempo de revelado de 1 minuto con DAB (Diaminobencidina).

X.3. Resultados de reacciones cruzadas con suero de *E. coli*.

Se realizaron ensayos de EITB con un suero anti *E. coli* contra las proteínas recombinantes, en ninguno de los casos se detectaron bandas, por lo que se descartan reacciones cruzadas entre las proteínas de *E. coli* y *T. solium* y además nos confirma la pureza de nuestras proteínas.

IX.4. Resultados de los EITB con las proteínas recombinantes y reacciones cruzadas.

Se evaluaron las proteínas recombinantes así como las LLGP's con los sueros colectados del INNNC y la UAS, de los cuales 54 corresponden a muestras confirmadas con cisticercosis y 30 muestras de individuos sanos por la técnica de EITB.

En la **figura 4** se muestra un EITB representativo de todos los sueros probados para la proteína P29. Para esta proteína solo fueron tomadas como muestras positivas aquellas tiras que presentaban una única banda a la altura de 29 kDa. De 54 sueros de pacientes con cisticercosis sólo 46 fueron confirmados. En el lado izquierdo de la figura se muestran los controles de sueros de humano tanto negativo como positivo, además se observa que el suero control negativo (C-H) no presenta ninguna reacción con la proteína, en el caso del suero control positivo (C+H, suero 8213) observamos el reconocimiento de una banda que corresponde a la proteína P29. Del lado derecho de la imagen se muestra con números una serie de 8 sueros positivos y negativos confirmados para cisticercosis, del 1-4 se muestran los sueros negativos que no presentan ninguna reacción con la proteína, en contraste los sueros positivos (5-8), reconocen la banda de 29 kDa con diferente intensidad, la tira 5 reconoce a la banda con menor intensidad que los sueros usados en las tiras 6, 7 y 8. Es importante mencionar que ninguno de los 30 sueros negativos presento reacción con la P29.

Además se probaron 10 sueros de diversas parasitosis con el objetivo de demostrar que no habían reacciones cruzadas con nuestras proteínas, en el caso de la P29 dos sueros presentaron una reacción cruzada tenue con la proteína de 29kDa de *Gnathostoma spinigerum*.

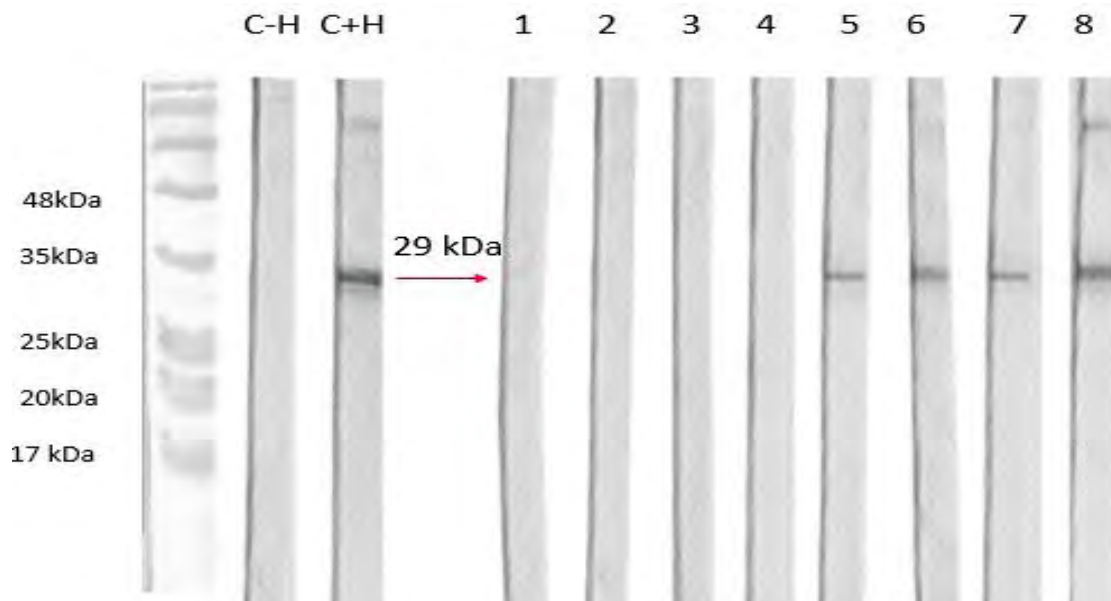


Fig. 4. Resultados del EITB para la proteína P29 (1µg/mm) vs sueros de humano (Dil. 1:50). C-H) control negativo, C+H) control positivo 8213, 1-4) de individuos sanos, 5-8) de pacientes con diagnóstico de cisticercosis.

Este mismo ensayo se realizó con la TRX-1. Para esta proteína (TRX-1) solo fueron tomados como sueros positivos aquellas tiras que presentaron una banda única a la altura de 12kDa, de 54 sueros positivos a cisticercosis por la técnica de RMN, se confirmaron 39 sueros positivos. En la **Fig. 5** Se muestra un EITB representativo de todos los sueros probados; del lado izquierdo podemos observar los sueros controles de humano, tanto negativos como positivos, se observa que el suero control negativo (C-H) no se presenta ninguna reacción con la proteína, el caso del suero control positivo (C+H 8213) observamos una banda a la altura de 12kDa que corresponde a la proteína TRX-1.

Del lado derecho de la imagen se presenta 8 sueros de pacientes con y sin la parasitosis, los primeros 4 sueros son confirmados como negativos puesto que no presentan ninguna reacción con la TRX-1, y de los sueros positivos (5-8), todos reconocen tenue y consistente la banda de 12 kDa en las tiras.

Es importante mencionar que ninguno de los sueros negativos reconoció a la TRX-1.

Para conocer las reacciones cruzadas que presenta la proteína purificada en nuestro laboratorio se probaron 10 sueros de diversas parasitosis, observando que solo un suero proveniente de un individuo infectado con *Gnathostoma spinigerum*ver presento reacción cruzada con la proteína de 12kDa de *T. solium*, este suero fue uno de los dos sueros que presentaron reacción cruzada con la proteína P29.

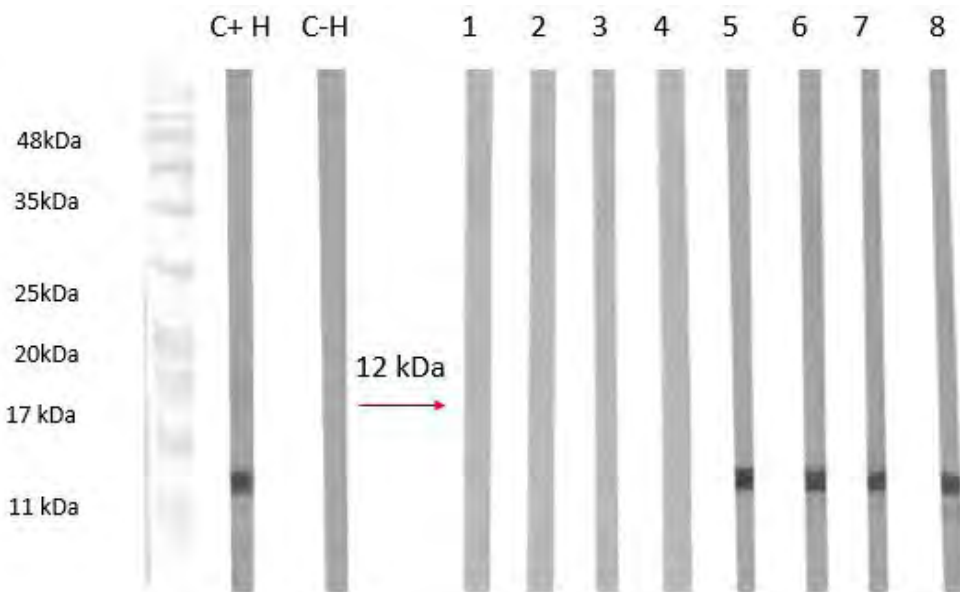


Fig. 5. Resultado del EITB para la TRX-1 (1µg/mm) vs sueros de humano (Dil. 1:50). C-H) control negativo, C+H) control positivo 8213, 1-4) de individuos sanos, 5-8) humanos de pacientes con diagnóstico de cisticercosis.

Para el caso de la proteína GST26 (Fig.6) se muestra un EITB representativo de todos los sueros probados, de los 54 sueros positivos 50 fueron confirmados con la GST26, tomando como sueros positivos aquellos que reconocen únicamente a la GST26. Del lado izquierdo se muestran los controles del suero de humano tanto negativo como positivo, se observa que el suero control negativo (C-H) no reconoce ninguna banda en la fracción de la GST26 pura, en contraste el suero control positivo (C+H 8213) reconoce a la GST26. En el lado derecho de la imagen y con números se presenta una serie de 8 sueros de pacientes con y sin la parasitosis, los sueros negativos no presentan ninguna reacción con la GST26 (1-4), mientras que los sueros positivos reconocen a la GST26 en las tiras 5-8, confirmando la positividad de los sueros.

Es importante mencionar que ninguno de los sueros negativos reconoció a la GST26.

Además se probaron 10 sueros de diversas parasitosis con el objetivo de conocer algunas de las reacciones cruzadas que presentan nuestras proteínas, en el caso de GST26 dos sueros con parasitosis de *Gnathostoma spinigerum* y *Giardia lamblia*, presentaron reacción cruzada con la proteína GST26 de *Taenia solium*.

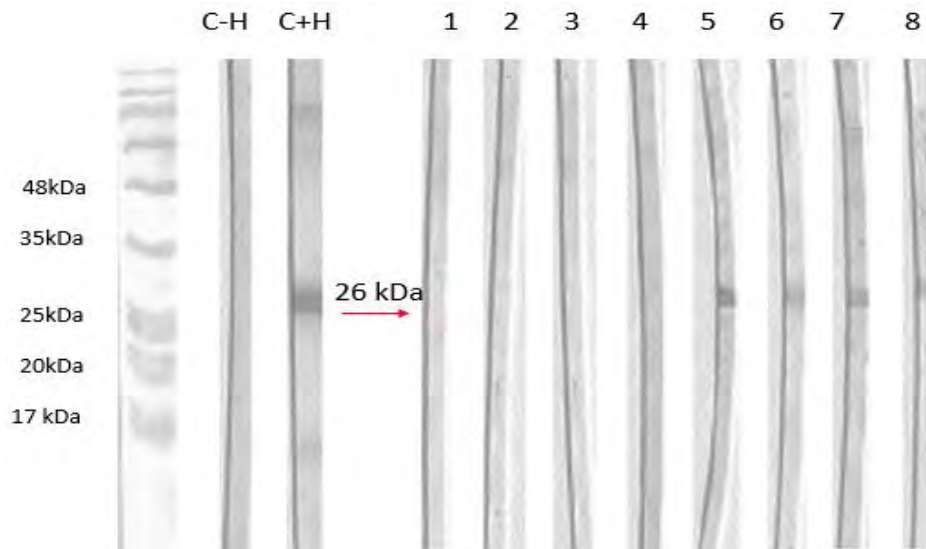


Fig. 6. Resultado del EITB para la GST26 (1 μ g/mm) vs sueros de humano (Dil. 1:50). C-H) control negativo, C+H) control positivo 8213, 1-4) de individuos sanos, 5-8) de pacientes con diagnóstico de cisticercosis

En cuanto al análisis de la TPI se muestra en un EITB representativo (Fig. 7.) que el suero de humano control negativo (C-H) reconoce ligeramente una banda de 28kDa, asimismo el control positivo (C+H 8213), lo mismo ocurre para todos los sueros negativos (1-4) y positivos a cisticercosis (5-8) los cuales reconocen en mayor o menor grado a la misma banda de 28kDa (TPI).

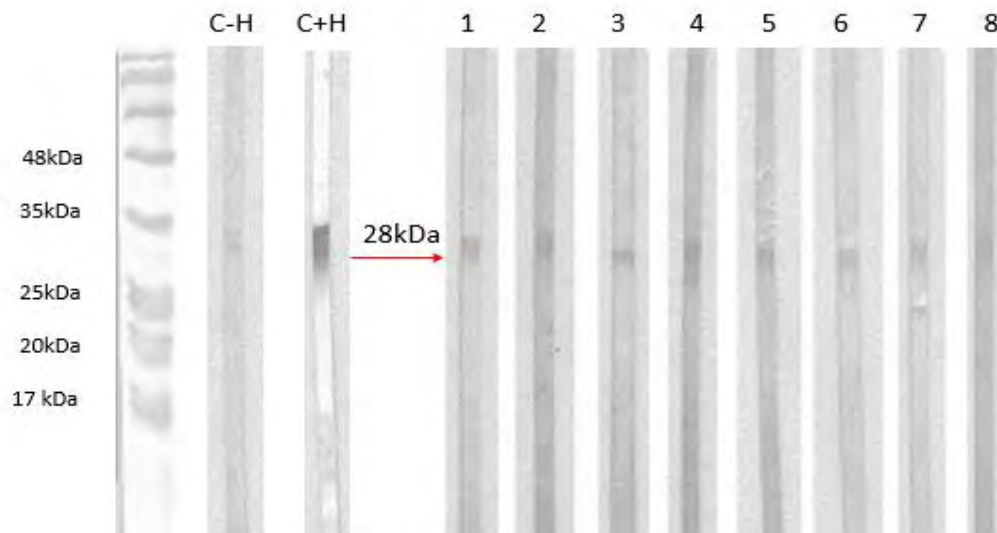


Fig. 7. Resultado del EITB para la TPI (1 μ g/mm) vs sueros de humano (Dil. 1:50). C-H) control negativo, C+H) control positivo 8213, 1-4) de individuos sanos, 5-8) de pacientes con diagnóstico de cisticercosis.

En cuanto al análisis de las LLGP's, se muestra en la Fig. 8, el EITB representativo de todos los sueros probados; de los 54 sueros confirmados por RMN y/o TAC únicamente 21 de ellos reconocieron a las bandas diagnósticas para cisticercosis (24, 39-42 kDa). Del lado izquierdo se pueden observar los controles de los sueros de humano negativo y positiva. En el control positivo (C+H 8213) observamos

un patrón de bandas que incluye a las glicoproteínas diagnósticas de 24kDa y 39-42kDa, descritas por Tsang. De lado derecho de la imagen y con números se presenta una serie de 8 sueros de pacientes con (1-4) y sin (5-8) cisticercosis, del 1 a 4 los sueros positivos reconocieron las bandas diagnosticas en las LLGP's, en contraste los sueros negativos del 5-8 no reconocieron ninguna banda, es de notar que las LLGP's no presentaron reacción cruzada con otras parasitosis

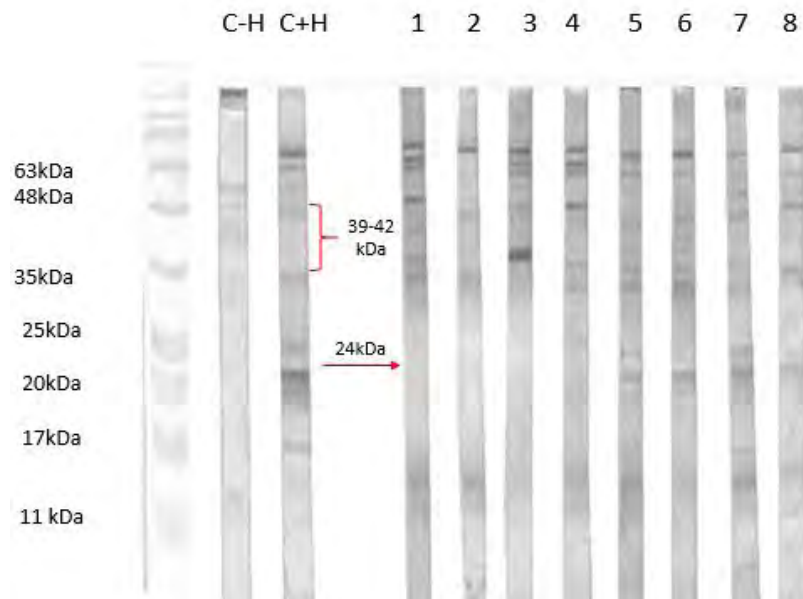


Fig. 8. EITB de las LLGP's (5µg/mm) vs sueros de humano (Dil. 1:50). C-H) control negativo, C+H) control positivo 8213, 1-4) negativos, 5-8) de pacientes con cisticercosis, positivos por las bandas (24, 39-42KDa señaladas con flechas rojas).

X.5 Resultados del porcentaje de reconocimiento de cada una de las proteínas recombinantes.

Se determinaron los porcentajes de reconocimiento. En la **Tabla.2** se muestra cada uno de estos porcentajes obtenidos con los sueros positivos y negativos confirmados para cisticercosis.

Tabla 2. Porcentajes de reconocimiento de los sueros con cisticercosis y sueros negativos confirmados utilizando las proteínas recombinantes y la fracción de las LLGP's.

Proteína	Sueros positivos	% Reconocimiento de sueros positivos	Sueros negativos	%Reconocimiento de sueros negativos
LLGP's	21/54	39	0/30	0
PRX-2	54/54	100	30/30	100
GST26	50/54	93	0/30	0
TPI	53/54	98	30/30	100
TRX-1	39/54	72	0/30	0
p29	46/54	85	0/30	0

En la tabla 1 de color azul muestro a los antígenos con potencial diagnóstico (GST26, TRX-1 y la P29). Debido a que su porcentaje de reconocimiento en las muestras fue mayor del 50% y más alto que las LLGP's. Ninguna de las muestras presentaron reconocimiento con sueros negativos, excepto la PRX-2 y la TPI.

En la **Tabla.3** se muestra el resultado obtenido de todos los sueros con respecto al reconocimiento de cada una de los antígenos diagnósticos obteniendo: un 94% para GST26, del 79% para la P29, y del 61% para TRX-1, y en la misma tabla se incluye el porcentaje para las LLGP's que fue del 47%.

Tabla 3. Reconocimiento de las proteínas recombinantes y de las LLGP's para cada uno de los sueros de pacientes con cisticercosis confirmada por imagen y sueros negativos. Reconocimiento 1: Positivo y 2: Negativo.

N° de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S
1	NCC	1	1	1	2
2	NCC	1	1	1	2

N° de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S
3	NCC	1	1	1	2
4	NCC	1	1	1	2
5	NCC	1	2	1	2
6	NCC	1	2	1	2
7	NCC	1	1	1	2
8	NCC	1	1	1	2
9	NCC	1	2	1	2
10	NCC	1	2	1	2
11	NCC	2	1	1	1
12	NCC	1	1	1	2
13	NCC	1	1	1	1
14	NCC	1	1	1	1
15	NCC	1	2	1	2
16	NCC	1	1	1	2
17	NCC	1	1	1	1
18	NCC	1	1	1	2
19	NCC	1	1	1	1
20	NCC	1	1	1	2
21	NCC	1	2	1	2
22	NCC	1	1	1	1
23	NCC	1	2	1	1
24	NCC	1	1	2	2
25	NCC	1	1	1	1
26	NCC	1	1	1	1
27	NCC	1	1	1	2
28	NCC	1	1	1	2
29	NCC	2	1	2	2
30	NCC	1	2	1	1
31	NCC	1	2	1	2

N° de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S
32	NCC	1	1	2	2
33	NCC	1	1	1	2
34	NCC	1	1	1	2
35	NCC	1	2	2	1
36	NCC	1	1	1	2
37	NCC	2	1	2	1
38	NCC	1	1	1	1
39	NCC	1	1	1	2
40	NCC	1	1	1	1
41	NCC	1	1	1	1
42	NCC	1	1	1	2
43	NCC	1	1	1	2
44	NCC	1	1	1	2
45	NCC	1	2	1	2
46	NCC	1	2	1	2
47	NCC	1	1	1	2
48	NCC	1	1	1	1
49	NCC	1	2	1	1
50	NCC	1	1	2	1
51	NCC	1	1	1	1
52	NCC	1	1	1	1
53	NCC	1	1	1	1
54	NCC	1	1	2	2
55	NCC	1	2	1	2
56	NCC	1	2	1	1
57	NCC	1	1	2	1
58	NCC	1	2	1	1
59	NCC	1	1	1	1
60	NCC	1	1	2	1

N° de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S
61	NCC	1	1	1	1
62	NCC	1	1	1	2
63	NCC	1	2	2	2
64	NCC	1	2	1	1
65	NCC	2	2	2	1
66	NCC	1	2	1	1
67	NCC	1	2	1	1
68	NCC	1	2	2	1
69	NCC	1	2	2	1
70	NCC	1	2	2	1
71	NCC	1	2	1	2
72	NCC	1	2	1	2
73	NCC	1	2	2	1
74	NCC	1	2	1	1
75	NCC	1	1	1	2
76	NCC	1	1	1	2
77	NCC	1	1	1	2
78	S.P	2	2	2	2
79	S.P	2	2	2	2
80	S.P	2	2	2	2
81	S.P	2	2	2	2
82	S.P	2	2	2	2
83	S.P	2	2	2	2
84	S.P	2	2	2	2
85	S.P	2	2	2	2
86	S.P	2	2	2	2
87	S.P	2	2	2	2
88	S.P	2	2	2	2
89	S.P	2	2	2	2

N° de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S
90	S.P	2	2	2	2
91	S.P	2	2	2	2
92	S.P	2	2	2	2
93	S.P	2	2	2	2
94	S.P	2	2	2	2
95	S.P	2	2	2	2
96	S.P	2	2	2	2
97	S.P	2	2	2	2
98	S.P	2	2	2	2
99	S.P	2	2	2	2
100	S.P	2	2	2	2
101	S.P	2	2	2	2
102	S.P	2	2	2	2
103	S.P	2	2	2	2
104	S.P	2	2	2	2
105	S.P	2	2	2	2
106	S.P	2	2	2	2
107	S.P	2	2	2	2

X.6. Resultados del porcentaje de reconocimiento de cada una de las proteínas recombinantes con respecto al número de cisticercos.

Otro de los análisis que se realizó en este proyecto fue el reconocimiento de los antígenos diagnósticos con respecto al número de cisticercos para 44 muestras de pacientes confirmados con cisticercos, de acuerdo a la consulta de las historias clínicas de los pacientes. En la **tabla 3 se muestra** el porcentaje de reconocimiento para GST26, TRX-1 y P29, así como para las LLGP's, los resultados se describen en la **tabla 4**.

Tabla 4. Resultado de cada uno de los sueros vs las proteínas recombinantes y LLGP's comparando el número de cisticercos en cada suero 1: único 2: múltiples, reconocimiento de los antígenos diagnósticos 1: Positivo 2: Negativo

Nº de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S	Nº de cisticercos
11	NCC	2	1	1	1	2
12	NCC	1	1	1	2	1
13	NCC	1	1	1	1	2
14	NCC	1	1	1	1	1
15	NCC	1	2	1	2	2
16	NCC	1	1	1	2	2
17	NCC	1	1	1	1	2
18	NCC	1	1	1	2	2
19	NCC	1	1	1	1	2
20	NCC	1	1	1	2	1
21	NCC	1	2	1	2	2
22	NCC	1	1	1	1	1
23	NCC	1	2	1	1	2
24	NCC	1	1	2	2	2
25	NCC	1	1	1	1	2
26	NCC	1	1	1	1	1
27	NCC	1	1	1	2	2
28	NCC	1	1	1	2	1
29	NCC	2	1	2	2	1
30	NCC	1	2	1	1	2
31	NCC	1	2	1	2	2
32	NCC	1	1	2	2	2
33	NCC	1	1	1	2	2
34	NCC	1	1	1	2	2
35	NCC	1	2	2	1	1
36	NCC	1	1	1	2	2

N° de muestra	DX	GST26	TRX	P29	LLGP'S	N° de cisticercos
37	NCC	2	1	2	1	2
38	NCC	1	1	1	1	2
39	NCC	1	1	1	2	2
40	NCC	1	1	1	1	2
41	NCC	1	1	1	1	1
42	NCC	1	1	1	2	2
43	NCC	1	1	1	2	2
44	NCC	1	1	1	2	2
45	NCC	1	2	1	2	2
46	NCC	1	2	1	2	2
47	NCC	1	1	1	2	2
48	NCC	1	1	1	1	2
49	NCC	1	2	1	1	2
50	NCC	1	1	2	1	2
51	NCC	1	1	1	1	2
52	NCC	1	1	1	1	1
53	NCC	1	1	1	1	2
54	NCC	1	1	2	2	2

Tabla 5. Resultado del porcentaje de reconocimiento de las proteínas recombinantes con los sueros de pacientes con cisticercosis (cisticercos único o múltiple).

Proteína	Cisticercos único		Cisticercosis múltiple	
	N° muestras positivas	% Reconocimiento	N° muestras positivas	% Reconocimiento
GST26	9	90	32	94
TRX-1	9	90	26	76
P29	8	80	29	85
LLGP'S	6	60	15	44

X.7. Resultados de validez diagnóstica para cada proteína recombinante.

Realizamos el cálculo para los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos para cada proteína, por medio de tablas de contingencia que son de utilidad para registrar y analizar la asociación entre dos o más variables, habitualmente de naturaleza cualitativa (nominales u ordinales) obteniendo así la capacidad diagnóstica de cada una de las proteínas seleccionadas como posibles antígenos diagnósticos **Tabla 7, 8 y 9**, como resultados obtuvimos que el mayor grado de sensibilidad fue para la GST26 con un 94.67%, seguida de la P29 con 80.26% y con 63.16% de la TRX-1; mientras que el porcentaje de especificidad es mayor en el caso de TRX-1 y P29 con un 96.77% que para la GST26 fue de 93.75%, para el análisis del porcentaje de pacientes correctamente diagnosticados fue mayor en el caso de la GST26, seguida de la P29 y de la TRX-1, finalmente para el cálculo de los valores predictivos tanto positivos como negativos siguen el mismo patrón y encontramos que los pacientes fueron correctamente diagnosticados.

Los valores encontrados para la sensibilidad de nuestras proteínas fueron mayores que los encontrados para la fracción de las LLGP's, mientras que para la especificidad las LLGP's presentaron los valores más altos.

En el caso de TPI y PRX-2 los valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN no se determinaron ya que presentaron reacción con todas las muestras.

Tabla 6. Resultado de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los antígenos diagnósticos así como de las LLGP's.

Proteína	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	VPP (%)	VPN (%)
GST26	94.67	93.75	97.26	88.24
TRX-1	63.16	96.77	97.96	51.72
P29	80.26	96.77	98.39	66.67
LLGP's	61.68	96.75	100	100
TPI	No se determino			
PRX-2	No se determino			

XI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La cisticercosis es considerada desde el año 2010 por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad desatendida, la forma más grave de esta enfermedad es la neurocisticercosis y continua siendo un problema de salud pública que afecta principalmente a países en vías de desarrollo como México, en el que aparecieron 113 casos nuevos en el año 2014, a pesar de que estos datos fueron obtenidos del boletín epidemiológico nacional, es importante recordar que en este solo se concentran los casos reportados por la SS, IMSS y el ISSSTE; así que faltan casos de esta parasitosis que no se encuentran reportados.

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, ubicado en la Ciudad de México, la neurocisticercosis es considerada un problema de salud pública, el 2.4% de las consultas por año se deben a pacientes que presentan síntomas relacionados con la enfermedad. La severidad de esta enfermedad depende del número, localización y estadio del parásito, así como el grado de inflamación y condiciones del huésped; razón por la cual grupos de investigación como el nuestro trabajamos en el desarrollo de métodos diagnósticos que sean accesibles a los pacientes que presentan esta patología y además se busca obtener alta sensibilidad y especificidad tanto diagnóstica como analítica.

El estándar de oro para esta enfermedad es la TAC y la RMN, cuyo costo va desde los \$700 hasta los \$5,000 dependiendo de la institución en la cual se realice el estudio cabe aclarar que existen regiones del país en las cuales estos estudios no son accesible.

Tabla 1. Costo de los estudios de neuroimagen en algunas Instituciones particulares y públicas

ESTUDIO	Laboratorios Médico Polanco	Laboratorios Jenner	Instituto Nacional de Pediatría	Instituto Nacional de Nutrición	Universidad Autónoma de Sinaloa
TAC	\$5,198	Simple \$1450 Contraste \$2550	\$ 550-2500	Categoría 4 \$918 Categoría 7 \$1853	-----
RMN	\$7, 940	\$2550	\$2650-5600	Categoría 4 \$2708 Categoría 7 \$5465	\$700 el estudio se realiza en Baja California y se debe pagar por él envío de la muestra

Además de los estudios por imagen el diagnóstico para esta parasitosis puede apoyarse en el uso de serología empleando la técnica de Tsang (EITB) del CDC que considera siete glicoproteínas 13, 14, 18, 21, 24, 39-42 y 50 kDa a una concentración de 3-5µg/mm, de las cuales únicamente la banda correspondiente a 24 y la 39-42 kDa son de carácter diagnóstico, razón por la cual todas las muestras obtenidas en este estudio fueron comparadas con esta técnica y confirmadas por TAC o bien RMN.

En la primera etapa del proyecto se llevó a cabo la expresión, purificación y cuantificación de las proteínas recombinantes (GST25, GST26, P29, 2-CysPrx, TPI, TRX-1 y SOD) que se utilizaron como probables antígenos diagnóstico siguiendo los protocolos ya descritos para cada una de ellas.

Para su producción se utilizó el vector pRSET el cual está diseñado para dar una alta expresión que es controlada por el promotor del bacteriófago T7, la expresión es inducida por IPTG que permite la producción de ARN polimerasa T7 en la cepa BL21 de *Escherichia coli*, la que a su vez ayuda a expresar la proteína de interés, este vector presenta la ventaja de unir seis histidinas al producto de expresión, por lo que facilita su purificación, mediante columnas de afinidad a metales (Níquel, GE healthcare, HisTrap HP), mientras que la GST25 y GST26 fueron purificadas por columnas de sefarosa acopladas a glutatión, el cual es su co-sustrato natural. En todos los casos se obtuvo un alto rendimiento de la proteína 15-10 mg/L cultivo bacteriano y un 95% de pureza. Por otra parte las LLGP's fueron purificadas de acuerdo a la metodología descrita por Tsang empleando una columna de sefarosa 4B acoplada a Lentil lectina, obteniendo un alto rendimiento de la fracción similar al descrito previamente [Scheel, Khan, Tsang et al; 2005].

El disponer de lotes de proteína que presenten rendimientos y pureza altos, tiene como ventaja que la proteína puede ser utilizada a diferentes concentraciones en los ELISA, Aglutinación en látex, métodos que podemos transportar fácilmente y por ello ser de fácil acceso a comunidades en las cuales se requiere de atención médica y no cuentan con equipos para realizar pruebas de imagen como TAC o RMN.

La meta del estudio fue desarrollar un EITB para detectar anticuerpos en muestras de suero utilizando proteínas recombinantes, seleccionamos como antígenos diagnósticos a la GST-26, la TRX-1 y la P29, debido a que presentaron dentro de sus características una pureza del 95%, no presentaron reacciones cruzadas en los ensayos con *E. coli*, su porcentaje de detección en sueros positivos es mayor a los encontrados en comparación con la técnica serológica de Tsang. Asimismo, por su porcentaje de reconocimiento el cual corresponde a 94% para GST26, 79% para P29 y 61% para TRX, en comparación con el 47% para LLGP's. Se obtuvo un porcentaje mayor al 50% para

nuestras tres proteínas y mayor que el obtenido por Tsang. Los sueros negativos no reconocieron a ninguna proteína recombinante en EITB.

Las limitantes de la metodología de Tsang para obtener las LLGP's son el material biológico el cisticerco, el cual proviene de cerdos infectados, los que son difíciles de encontrar, el tiempo de infección en los cerdos se desconoce por lo que cada uno de los lotes proteicos son heterogéneos, lo que hace difícil alcanzar la concentración de trabajo, siendo estas condiciones que afectan no sólo el EITB sino otros ensayos, aunado a esto el número de cisticercos que detecta no debe ser menor a 5 ya que la detección puede ser débil o negativa. Por el contrario, las proteínas que seleccionamos GST26, TRX-1 y P29 no presentan estos inconvenientes, además detectan pacientes con cisticercos únicos presentando un reconocimiento del 90% que es mayor en comparación con las LLGP's.

Desafortunadamente, no se pudo comparar nuestro estudio con los estudios de HP10 y B158/60 ya que no se cuentan con estos datos, sin embargo en el estudio de HP10 se da a conocer la detección de este antígeno en pacientes que presentan neurocisticercosis con cisticercos en diferentes localizaciones en los cuales la prueba es más sensible cuando el cisticerco se localiza en los ventrículos o cisternas subaracnoideas, estudio que valdría la pena realizar con nuestras proteínas.

Un dato importante de mencionar es que la TPI y la PRX-2 no fueron seleccionadas como antígeno diagnóstico debido a que todos los sueros positivos para cisticercosis y negativos reconocieron ambas proteínas; apreciando resultados falsos positivos, además presentaron reacciones cruzadas con otros parásitos. Lo cual nos indica que estas proteínas completas no puede ser usada para este fin, sin embargo existen regiones específicas en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas con las cuales podría trabajarse para mejorar su capacidad diagnóstica.

Para predecir la antigenicidad de nuestras proteínas realizamos el cálculo con el programa bioinformático Kolaskar, el cual obtiene los datos antigénicos de acuerdo a los residuos de aminoácidos como cisteína, leucina y valina, que corresponden a las partes más antigénicas de una proteína, posteriormente realizamos el cálculo de la abundancia de regiones antigénicas AAR, llevando a cabo un cociente entre el número de aminoácidos y los datos antigénicos de cada proteína Tabla 2. Valores bajos de AAR [Gómez S et al; 2015] significan que la proteína tiene más regiones antigénicas obteniendo el valor más bajo de AAR para TRX-1.

Tabla2. Valores de abundancia de regiones antigénicas

PROTEÍNA	NUMERO DE AMINOACIDOS	DATOS ANTIGENICOS	ABUNDANCIA DE REGIONES ANTIGENICAS (AAR)
GST 26	221	1	221
P29	238	2	119
PRX-2	197	3	66
TRX-1	109	4	27
TPI	250	6	42

Por otra parte evaluamos la eficacia de la prueba calculando la sensibilidad diagnóstica (la capacidad que tiene la prueba para identificar a los individuos que presentan la enfermedad) de cada una de las proteínas obteniendo un porcentaje de 94.67% para GST26, 80.26% para P29 y 63.16% para TRX-1. Siendo la GST26 la más sensible. Además se calculó la especificidad en cada caso (indica la capacidad que tiene la prueba para identificar a los individuos sanos) obteniendo la mejor sensibilidad para la TRX-1 y la P29 (96.77%) mientras que la GST 26 presenta un porcentaje menor (93.75%).

La especificidad reportada para el método de Tsang es del 98% con un 98% de sensibilidad, sin embargo estos datos no se reportan en el ensayo de Tsang, mientras que para HP10 únicamente se reporta la especificidad la cual es de 94%, y para la detección de los antígenos B158/B60 la sensibilidad alcanzada es de 90% con 84% de especificidad, asimismo para el kit comercial CISTIBLOT se reporta una sensibilidad del 91% y una especificidad del 100%. Como podemos observar nuestras proteínas presentan valores en algunos casos mayores a estas pruebas como es el caso de HP10, B158/60 y CISTIBLOT por separado, la cual podría incrementar si se probaran estas recombinantes en conjunto.

Por otra parte se realizó el cálculo de los valores predictivos para cada una de las proteínas utilizadas (estos valores permiten conocer la probabilidad de que un individuo con un resultado positivo tenga la enfermedad “enfermo” y de que un resultado negativo no tenga la enfermedad “sano”). Por este análisis podemos afirmar que estas proteínas permiten diagnosticar correctamente a los pacientes con un porcentaje del 94.39% para GST26, 85.05% para P29 y 72.90% para TRX-1. Cabe destacar que este análisis no fue desarrollado para ninguno de los métodos mencionados anteriormente por lo cual no se presentan estos valores.

Con el objetivo de conocer las reacciones cruzadas que presentaban nuestras proteínas con otras parasitosis, se recolectaron 10 sueros, con los cuales nuestras proteínas presentaron una reacción cruzada con *Gnathostoma spinigerum* y una muestra con *Giardia lamblia* para la GST26.

Para mejorar la eficiencia de nuestro método es necesario probarlo en una población abierta o bien realizar ensayos de ciego o doble ciego, además dentro de nuestras perspectivas esta probar nuestras proteínas con un mayor número de muestras de suero de pacientes que presenten otras parasitosis con el fin de observar el mayor número de reacciones cruzadas posibles y buscar estrategias que nos permitan mejorar la especificidad diagnóstica, tal como lo realizan en otros estudios incluyendo Tsang el cual menciona en su artículo reacciones cruzadas con el género *Echinococcus granulosus*, en el caso de HP10 con *Entamoeba histolytica* [Fleury A et al; 2007] y para la prueba diagnóstica de los antígenos B158/B60 en suero no mencionan reacciones cruzadas. Por otro lado, para disminuir estas reacciones cruzadas también se ha pensado trabajar con regiones de la secuencia primaria (péptidos) de las proteínas de la GST26kDa, la TRX-1 y la P29 en ELISA

Además en el futuro pretendemos mejorar la accesibilidad de nuestro método utilizando técnicas que sean de fácil transporte, rápidas, sensibles y de bajo costo, como es la técnica de aglutinación en látex en la que solo se necesita un portaobjetos cóncavo con fondo oscuro para observar la aglutinación.

Un método de este tipo podría ser utilizado para detectar focos de infección del parásito, lo que permitiría dar un tratamiento adecuado a los pacientes y poder erradicar este parásito.

El costo para este estudio se muestra en la **Tabla 5**, este varía de acuerdo al tipo de servicio ya sea privado o público.

XII. CONCLUSIONES

- Se produjeron tres proteínas recombinantes antigénicas (GST26, P29 y TRX-1), con un 95% de pureza y alto rendimiento.
- Se estandarizó un EITB para detectar anticuerpos anti-cisticerco en suero de pacientes usando los tres antígenos recombinantes.
- Las tres proteínas en este estudio presentaron una mayor sensibilidad de detección de pacientes con cisticercosis que la técnica de Tsang.
- Estas proteínas por separado detectan en EITB pacientes que presentan un cisticerco.
- Regiones peptídicas específicas de estas proteínas podrían mejorar la especificidad y sensibilidad del ensayo.
- Se pretende desarrollar un método fácil aplicar, barato sensible y específico para detectar a *T. solium*

XIII. REFERENCIAS

- 1) Agudelo P, Palacio L.G (2003), "Prevalencia de anticuerpos para Taenia solium en humanos y cerdos en una zona endémica colombiana", Revista de Neurología.36:706-709
- 2) Almeida MC, Gabriël S, Abatih E, Praet N, Benitez W, Dorny P(2015), " Taenia solium Human Cysticercosis: A Systematic Review of Sero-epidemiological Data from Endemic Zones around the World", PLOS Neglected Tropical Diseases 1-20
- 3) Armstrong R (1997) Structure, Catalytic Mechanisms, and Evolution of the glutathione transferases" Chem Res Toxicology.2-18
- 4) Armstrong R (1998)," Mechanistic imperatives for the evolution of glutathione transferases", Current opinion in Chemical Biology.2:618-623
- 5) Arturo Carpio, Matthew L. Romo (2014), "The relationship between neurocysticercosis and epilepsy: an endless debate A relação entre neurocisticercose e epilepsia: um debate interminável", Arq Neuropsiquiatr 2014;72(5):383-390
- 6) Bjorn Victor¹, Kirezi Kanobana², Sarah Gabriel¹, Katja Polman², Nynke Deckers³, Pierre Dorny¹, Andre M. Deelder⁴ and Magnus Palmblad (2012), "Proteomic analysis of Taenia solium metacestode excretion–secretion proteins", Proteomics 12, 1860–1869
- 7) Boubaker G, Gottstein B, Hemphill A, Babba H , Spilioti M (2014)"Echinococcus P29 Antigen: Molecular Characterization and Implication on Post-Surgery Follow-Up of CE Patients Infected with Different Species of the Echinococcus granulosus Complex"Plos One.9(5):1-13
- 8) Bradford MM (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding",Analytical Biochemistry 72, 248-254
- 9) Brown T (2008), "Genomas" 3ª Ed Panamericana, Buenos Aires.

- 10) Carabin H, Traoré AA (2014), "Taenia solium taeniasis and cysticercosis control and elimination through community-based interventions", *Curr Trop Med Rep.* 1;1(4):181-193
- 11) Compton SJ, Jones CG (1985) "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay" *Analytical Biochemistry.* 151,369-374
- 12) Cordero A, Miranda E, Segovia G, Cantoral V, Huarcaya I (2010), "Taeniosis prevalence and human cysticercosis seroprevalence in Pampa Cangallo, Ayacucho, Peru 2008", *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 27(4):562-8
- 13) Choy SH, Mahdy M, Mekhlafi H, Lun Low V, Surin J (2015), "Population expansion and gene flow in *Giardia duodenalis* as revealed by triosephosphate isomerase gene", *Parasit Vectors.* 8: 454
- 14) Del Brutto O, García H (2015), "Taenia solium Cysticercosis — The lessons of history", *Journal of the Neurological Sciences*, 359:392–395
- 15) Del Brutto OH (2001), "[Cerebrovascular disease in the tropics]", *Rev Neurol.* 16-31;33(8):750-62
- 16) Del Brutto OH (2012), "Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited", *Pathog Glob Health.* 106(5):299-304
- 17) Del Brutto OH, Rajshekhar V, White AC Jr, Tsang VC, Nash TE, Takayanagui OM, Schantz PM, Evans CA, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JC, Sarti E, Gonzalez AE, Gilman RH, García HH (2001), "Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis", *Neurology.* 24; 57(2):177-83
- 18) Escalante H, Miranda E, Lorca M, Verástegui M, Torres R (2004) "La técnica de Western Blot con Antígenos de Fluido Vesicular de *Cysticercus Cellulosae* para el Diagnóstico de la Cisticercosis". *Boletín Peruano de Parasitología* 1995; 11: 26-31
- 19) Fleury A, Hernández M, Avila M, Cárdenas G, Bobes RJ, Huerta M, Fragoso G, Uribe-Campero L, Harrison LJ, Parkhouse RM, Sciutto E (2007), "Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis", *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 78(9):970-4

- 20) Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, Larralde C, Sciutto E (2010), "Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico", *PLoS Negl Trop Dis.*24;4-8
- 21) Flisser A, Vargas PL, Laclette JP (2006), "Taenia solium: Un parásito cosmopolita", *Investigación y Ciencia*, 356:24-33
- 22) Flisser A, Gyorkos TW (2007), "Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico", *Parasite Immunol.*29(12):637-49
- 23) Flisser A (2013), "State of the art of Taenia solium as compared to Taenia asiática" *Korean J Parasitol.*51(1):43-9
- 24) Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P (2003), "Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas", *Acta Trop.*87(1):43-51
- 25) Gabriel S, Blocher J, Dorny P, Nji E, Schmutzhard E, Ombay M , Mathias B , Winkler A (2012), "Added Value of Antigen ELISA in the Diagnosis of Neurocysticercosis in Resource Poor Settings", *PLOS Neglected Tropical Diseases* (6) 10:1851-8
- 26) Gabriël S, Johansen M.V, Pozio E, Smit G.S.A, Devleesschauwer B, Allepuz A, Papadopoulos E, Van der Giessen J, Dornya P (2015), "Human migration and pig/pork import in the European Union: What are the implications for Taenia solium infections?", *Veterinary Parasitology* 213: 38–45
- 27) Gonzales I, Rivera JT2, García HH1,2; Cysticercosis Working Group in Peru (2016), "Pathogenesis of Taenia solium taeniasis and cysticercosis", *Parasite Immunol.*38(3):136-46
- 28) González G1, Spinelli P, Lorenzo C, Hellman U, Nieto A, Willis A, Salinas G (2000), "Molecular characterization of P-29, a metacestode-specific component of Echinococcus granulosus which is immunologically related to, but distinct from, antigen 5", *Mol Biochem Parasitol.*105(2):177-84
- 29) Gómez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Sciutto E, Fragoso G, Bobes RJ, Laclette JP, Pozo Yauner L, Ochoa-Leyva A (2015), "Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in Taenia solium reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR)", *Scientific reports* 19;5:9683

- 30) Harvey RA, Champe PC. Pharmacology. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009:418- 30. (Lippincott's Illustrated Reviews)
- 31) Ishida MM, Almeida MS, Espindola MN, Iha A, Pereira DA, Souza JG, Rados T (2011), "Seroepidemiological study of human cysticercosis with blood samples collected on filter paper, in Lages, State of Santa Catarina, Brazil, 2004-2005, Rev Soc Bras Med Trop, 44(3):339-343
- 32) Jayashi CM, Gonzalez AE, Castillo Neyra R, Kyngdon CT, Gauci CG, Lightowers MW (2012), "Characterisation of antibody responses in pigs induced by recombinant oncosphere antigens from *Taenia solium*", Vaccine. 14;30(52):7475-80
- 33) Jiménez L, Fernández-Velasco D.A, Willms K, Landa A (2003) "A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*" Journal of Parasitology, 89(2):209-214.
- 34) Jiménez L, Rodríguez-Lima O, Ochoa-Sánchez A, Landa A (2015) "Characterization of a Thioredoxin-1 Gene from *Taenia solium* and Its Encoding Product" BioMed Research International.1-10
- 35) Jiménez L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, Landa A (2000), "Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*" Int J Parasitol.30(9):1007-12
- 36) Kardoush MI, Ward BJ, Ndao M (2016), "Identification of Candidate Serum Biomarkers for *Schistosoma mansoni* Infected Mice Using Multiple Proteomic Platforms", PLoS One.3;11(5)
- 37) Koncarevic S, Rohrbach P, Deponte M, Krohne G, Prieto JH, Yates J 3rd, Rahlfs S, Becker K (2009) "The malarial parasite *Plasmodium falciparum* imports the human protein peroxiredoxin 2 for peroxide detoxification" Proc Natl Acad Sci U S A.11;106(32):13323-8
- 38) Koneman EW, Allen S, Woods GL (2006), "Koneman Diagnóstico microbiológico", 6ª, Panamericana, Buenos Aires
- 39) Larralde C, Aluja A (2007), "Cisticercosis guía para profesionales de la salud" 1ª Ed. Biblioteca de la salud. Fondo de cultura económica, México.

- 40) Lightowers MW (2003), "Vaccines for prevention of cysticercosis", *Acta Trop.* 87(1):129-35
- 41) Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Rendón JL, del Arenal IP (2015) "Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci" *Mol Biochem Parasitol.* 201(1):16-25
- 42) Masatani T, Asada M, Ichikawa-Seki M, Usui M, Terkawi MA, Hayashi K, Kawazu S, Xuan X (2013) "Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Babesia gibsoni*" *J Vet Med Sci.* 76(1):139-43
- 43) Mejía Martínez Karina (2001) "Seroprevalencia de anticuerpos contra antígenos de la larva de *Taenia solium* en la población de caleras de cofrado, Nayarit", Tesis de Licenciatura de la carrera de Químico Farmacobiologo Facultad de ciencias e Ingenierias UAN.
- 44) Mustacich D, Powis G (2000), "Thioredoxin reductase" *Biochem J.* 15; 346 1:1-8
- 45) Noh J, Rodríguez S, Lee YM, Handali S, González A, Gilman RH, Tsang V, García H, Wilkins P (2014), "Recombinant Protein- and Synthetic Peptide-Based Immunoblot Test for Diagnosis of Neurocysticercosis" *Journal of Clinical Microbiology.* 52(5)1429-1434
- 46) Vibanco-Pérez N, Jiménez L, Mendoza-Hernández G, Landa A (2002), "Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*" *Parasitol Res.* 88(5):398-404
- 47) Ochoa-Sánchez A, Jiménez L, Landa A (2011), "The hamster model for identification of specific antigens of *Taenia solium* tapeworms", *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 1-11
- 48) Quiroz, R. H. (2002), "Cestodosis larvarias: Cisticercosis, cenurosis y equinococosis", *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*, Grupo Noriega Editores, Limusa, pp. 335-363
- 49) Ramírez Giraldo J.C, Arboleda Clavijo C, H. McCollough C (2008), "Tomografía computarizada por rayos X: Fundamentos y actualidad" *Revista Ingeniería Biomédica*, 2 (4):13-31

- 50) Rassy D, Bobes RJ, Rosas G, Anaya VH, Brehm K, Hernández B, Cervantes J, Pedraza S, Morales J, Villalobos N, de Aluja AS, Lactette JP, Nunes CM, Biondi GF, Fragoso G, Hernández M, Sciutto E (2010), "Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine", *PLoS One*.23; 5(6)
- 51) Rivera M, Puentes S, Caballero L (2011), "Resonancia magnética cerebral: secuencias básicas e interpretación" *Univ. Méd. Bogotá (Colombia)*, 52 (3): 292-306
- 52) Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Cjuno RA, Garcia HH, Martinez SM (2010), "Neurocysticercosis diagnosis and management in Peru", *Rev Peru Med Exp Salud Publica*.27(4):586-91
- 53) Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P (1997) "Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico" *Am J Trop Med Hyg*.56(2):127-32
- 54) Schantz, P.M., Moore, A.C., Muñoz, J.L., Hartman, B.J., Schaefer, J.A., Aron, A.M., Persaud, D., Sarti, E., Wilson, M., Flisser, A (1992) "Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York city", *New. Eng. J. Med.* 327, 692/695.
- 55) Sciutto E, Morales J, Martínez JJ, Toledo A, Villalobos MN, Cruz-Revilla C, Meneses G, Hernández M, Díaz A, Rodarte LF, Acero G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Paniagua J, Fragoso G, Fleury A, Larralde R, De Aluja AS, Larralde C (2007) "Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico", *Parasitology*.134(1):129-33.
- 56) Sciutto E, Fragoso G, de Aluja AS, Hernández M, Rosas G, Larralde C (2008)," Vaccines against cysticercosis", *Curr Top Med Chem*.8(5):415-23
- 57) Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, Cervantes J, Aluja A, Larralde C (2013), "Development of the S3Pvac vaccine against murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: a historical review", *J Parasitol*.99(4):693-702
- 58) Scheel CM, Khan A, Hancock K, García HH, González AE, Gilman RH, Tsang VC; Cysticercosis Working Group in Peru (2005), "Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats", *Am J Trop Med Hyg*.73(4):771-6

- 59) Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Thompson RC, Boontanom P, Saksirisampant W, Tan-ariya P (2011), "Clonal diversity of the glutamate dehydrogenase gene in *Giardia duodenalis* from Thai Isolates: evidence of genetic exchange or Mixed Infections?", BMC Microbiol. 2011; 11: 206
- 60) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema único de información (2015), "Aspectos relevantes del Binomio teniasis/cisticercosis" Vigilancia epidemiológica 24:1-5
- 61) Stoscheck CM (1990), "Quantitation of protein", Methods in Enzymology. 182:50-68
- 62) Tay-Zavala J, "Microbiología y parasitología medicas" 3ª, Méndez Editores, México, 2003
- 63) Tsang VC, Brand JA, Boyer AE (1989), "An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*), J Infect Dis. 159(1):50-9
- 64) Tsang, V.C.W.; Peralta, J.M. y Simons, A.R. 1983. Enzyme linked electrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods Enzymol; 92:377-391
- 65) Tsang, V.S.W.; Hancock, M.; Wilson, M.; Parmer, D.F.; Watey, S.D.; Me Cougal, J.S. and Kennedy, S. 1986. Enzyme-Linked Immunoelectrotransfer Blot Technique (Western blot) for human T-lymphotropic Virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV/LAV) antibodies. Monograph Immunology Series No. 15. Procedural guide. Atlanta Centers for diseases Control. 1 -24
- 66) Vaca-Paniagua F, Parra-Unda R, Landa A. (2009) "Characterization of one typical 2-Cys peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*" Parasitol Res. 105(3):781-7
- 67) Vaca-Paniagua F1, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, Landa A (2008), "Taenia solium: antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines" Curr Top Med Chem. 8(5):393-9
- 68) Voet D, Voet J.G, Pratt CHW (2007), "Fundamentos de Bioquímica, la vida a nivel molecular" 2ª Ed. Médica Panamericana, 1260, España

- 69) Zhang R, Zheng W, Wu X, Jise Q, Ren Y, Nong X, Gu X, Wang S, Peng X, Lai S, Yang G (2013) "Characterisation and analysis of thioredoxin peroxidase as a potential antigen for the serodiagnosis of sarcoptic mange in rabbits by dot-ELISA" BMC Infect Dis.22;13:336
- 70) Zhang W, Ahmad G, Torben W, Noor Z, Le L, Damian RT, Wolf RF, White GL, Chavez-Suarez M, Podesta RB, Kennedy RC, Siddiqui AA (2010), "Sm-p80-based DNA vaccine provides baboons with levels of protection against Schistosoma mansoni infection comparable to those achieved by the irradiated cercarial vaccine" J Infect Dis.1;201(7):1105-1

XIV.REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

1. CDC (Center for disease control and prevention)
<https://www.cdc.gov/dpdx/taeniasis/index.html>,
2. Departamento de microbiología y parasitología- Recursos en parasitología (2016)
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html>
3. Gaceta de Biomédicas-UNAM
<http://www.biomedicas.unam.mx/?s=cisticercosis>,
4. Instituto de Neurología y Neurocirugía, Manuel Velasco Suarez (2016)
<http://www.innn.salud.gob.mx/>
5. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI (2016)
<http://www.inegi.org.mx/>
6. Organización Mundial de la Salud:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es>,
7. PLM (2015)
http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6,
8. PRSET A, B&C Bacterial Expression Vectors Thermo Fisher Scientific
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V35120>
9. Radiological Society of North America (2015)

<http://www.rsna.org/>

10. Universidad Autónoma de Sinaloa

<http://web.uas.edu.mx/web/>

11. Vademecum (2016)

<http://mx.prvademecum.com/>

12. Pruebas diagnósticas (2017)

http://cv.uoc.edu/UOC/a/moduls/90/90_166d/web/main/m4/21d.html

XVI. ANEXOS

CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y REGISTRO DEL PROYECTO



FACULTAD DE MEDICINA
DIRECCIÓN

ASUNTO: SOLICITUD DE APOYO INVESTIGACIÓN

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Coordinador
Coordinación de la Investigación Científica, UNAM
Presente

Estimado Dr. Arámburo de la Hoz:

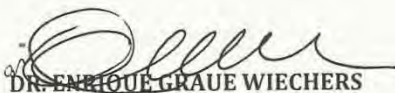
Con relación al proyecto de investigación "**Estudio de la transcripción de los genes de ratones susceptibles y resistentes, así como del parásito durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps***", que el Dr. Abraham Landa Piedra en su carácter de responsable técnico someterá al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, bajo la Convocatoria de Investigación Básica SEP-CONACyT 2012, me permito informarle que esta Facultad, aportará los recursos humanos, materiales y de infraestructura necesarios para el desarrollo del proyecto. El Dr. Landa Piedra, es Profesor Titular "C" Tiempo Completo de esta Facultad.

La propuesta es congruente con las líneas de investigación identificadas en el plan de desarrollo de esta dependencia y no cuenta con otro apoyo por parte del CONACyT.

Agradezco de antemano su atención y aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 14 de febrero del 2012.

EL DIRECTOR


DR. ENRIQUE GRAUE WIECHERS

S. G. V. D. T. E.
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN
RECIBIDA
2012 FEB 17 PM 1:41
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA UNAM



Fecha: 014-Febrero-2012.

Proyecto No. 007-2012


Título: Estudio de la transcripción de los genes de ratones susceptibles y resistentes, así como del parásito durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*.

Responsable: **ABRAHAM LANDA PIEDRA**, Profesor Titular "C" T.C.

Departamento: Microbiología y Parasitología.

Comentarios de las Comisiones:

Las observaciones planteadas por las Comisiones han sido incorporadas, decidiéndose **APROBAR** el proyecto, ratificando el Dictamen emitido por los vocales.


GRD, ETF

CIEFM-Hoja de dictamen

Este proyecto se mantendrá vigente en los registros de la División de Investigación por un período máximo de 5 años.



"2014, Año del escritor Octavio Paz"

Comité de Ética en Investigación

Dra. Teresa Corona
Presidenta Ex Officio

Dr. Ricardo Colín Piana
Presidente

Dra. Helgi Jung Cook
Vicepresidenta

M.en C. Adriana Ochoa
Secretaria

Miembros Honorarios:

Dr. Antonio Torres Ruiz
Dr. Fernando Zermeño Pohls
Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela

Vocales:

Titular
Dra. Erika Rivera Durón
Suplente
Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Titular
Dr. Daniel San Juan Orta
Suplente
M. en C. Iván Pérez Neri

Titular
Dra. Mariana Espinola Nadurille
Suplente
Dr. Adolfo Leyva Rendón

Titular
Dra. Zoila Trujillo de los Santos
Suplente
M.E. Guadalupe Nava Galán

Titular
Mtra. Alejandra Sánchez Guzmán
Suplente
Lic. Claudia García Pastrana

Titular
Dra. Yaneth Rodríguez Agudelo
Suplente
M. en C. Mireya Chávez Oliveros

Titular
Dr. Juan Barges Coll
Suplente
Dr. Daniel Crail Melendez

Consejo Consultivo:

Dr. Tirso Zúñiga Santamaría
M. en C. T.S. Francisco Catzada Lemus
Rosario Corona Cao Romero

OFICIO N° CEI/058/14
ASUNTO: PROTOCOLO 63/14

México, D.F., 1 Octubre del 2014.

DRA. AGNES FLEURY
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
INVESTIGADORA PRINCIPAL
INNnY MVS.
PRESENTE.

Estimada Dra. Fleury:


Se recibió el oficio N° DIC/336/14 firmado por la Dra. Ma. Lucinda Aguirre Cruz Directora de Investigación quien solicita la opinión del Comité de Ética en Investigación para la aprobación o no del Protocolo de Investigación N° 63/14 titulado: "NEUROCISTICERCOSIS HUMANA: INTERACCIONES INMUNOENDOCRINOLÓGICAS Y SU RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICO-RADIOLOÓGICA DE LOS PACIENTES", que previamente fue aprobado por el Comité Científico.

Los aspectos Valor Social, Validez Científica, Relación Riesgo Beneficio y la Selección Equitativa de la Muestra y el Consentimiento Informado reúnen los requisitos mínimos indispensables para que este Comité emita su juicio de **APROBADO** para los efectos consiguientes, lo cual se le hace saber para los efectos a que haya lugar.

Un cordial saludo.


DR. ANTONIO TORRES RUIZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA


DR. RICARDO COLÍN PIANA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN


M. en C. ADRIANA OCHOA MORALES
SECRETARIA

c.p. Ma. Lucinda Aguirre Cruz.- Directora de Investigación
c.p. Dr. Amín Cervantes Arriaga.- Titular de la Unidad de Apoyo al Predictamen
c.p. Dr. Daniel San Juan Orta.- Jefe del Depto. de Investigación Clínica
c.p. Archivo ATR/mitch



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

MANUEL VELASCO SUAREZ

INSURGENTES SUR No.3877

C.P.14269 MÉXICO

TEL 56 06 38 22

DIRECCIÓN MÉDICA

DEPARTAMENTO DE NEUROIMAGEN

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMOGRAFÍA COMPUTADA

C.DIRECTOR GENERAL DEL INNN MVS

Fecha _____

PRESENTE

No. Folio _____

No. Expediente _____

No. Cama _____

El (La) que suscribe (paciente), _____

Nombre completo del paciente

Con domicilio en _____

Domicilio completo (Calle, Colonia, C.P, Delegación o Municipio y Estado)

Teléfono _____

Acudo voluntariamente a este Instituto Nacional de Salud, para el tratamiento de mi enfermedad y de acuerdo a lo que me explicaron e informaron en un lenguaje claro y sencillo; y conforme a lo dispuesto en los artículos 29, 76, 77,78, 80 y 81 del reglamento de la ley General de Salud en materia de prestación de servicios y atención médica; expreso mi consentimiento y en consecuencia autorizo al personal médico y paramédico de este instituto, para que me aplique el medio de contraste necesario para tener un estudio completo de tomografía computada y llegar a un diagnóstico, para continuar con mi tratamiento, entiendo que todo acto médico, diagnóstico y terapéutico lleva implícito un riesgo de complicaciones menores o mayores e incluso de mortandad, como en el caso del medio de contraste el cual puede desencadenar reacciones adversas no ponderables, en tal virtud, consiente y comprendiendo todo lo que se me ha explicado y sin que en mi persona exista coacción alguna y estando en posesión de mi libre voluntad; expreso y reitero mi consentimiento válidamente informado, por lo que firmo el al calce o pongo la huella digital de mi pulgar derecho para los efectos legales procedentes.

Los parientes o responsables legales del paciente informamos que no está capacitado para tomar decisiones, pero a su nombre aceptamos la información que se nos proporcionó y la responsabilidad correspondiente

ATENTAMENTE

Nombre completo del paciente o Representante legal, con identificación oficial

(Nombre completo y firma)

TESTIGO POR EL PACIENTE

(Nombre completo y firma)

TESTIGO POR EL INSTITUTO



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA PROCEDIMIENTOS

Fecha _____

Registro No. _____

Procedencia _____

El (La) que suscribe (paciente), _____

Nombre completo del paciente

En mi carácter de _____, manifiesto que el Dr. _____, me informo de manera clara, sencilla y completa sobre el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de mi padecimiento, consistente en _____, razón por la cual es necesario se me realice _____ Punción venosa _____

Los beneficios esperados son _____ Apoyo diagnóstico _____

Los posibles riesgos o complicaciones, pueden ser _____ dolor, equimosis o morete _____

El (la) que suscribe _____ en pleno uso de mis facultades mentales, manifiesto estar debidamente informado (a) del contenido del presente documento, para lo cual firmo para constancia y efectos legales a que haya lugar.

CONSENTIMIENTO

TESTIGO

PACIENTE O REPRESENTANTE

Nombre _____

Nombre _____

Firma _____

Firma _____

Domicilio _____

Domicilio _____

Identificación _____

Identificación _____

DECLARACIÓN DEL MÉDICO

He explicado al paciente o persona autorizada para otorgar el presente consentimiento, la naturaleza de la (s) condición (es) que presenta en la actualidad. Además le he informado, sobre los métodos de diagnóstico y tratamiento, explicado en lenguaje común, los beneficios esperados y los posibles riesgos o complicaciones que pudieran estar asociadas a este procedimiento (s). El (la) _____ ha comprendido la explicación y ha consentido en su realización en pleno uso de sus facultades.

Nombre del médico _____

Firma _____

Medio de cultivo, soluciones y amortiguadores

MEDIO LB

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Todos los componentes se disuelven y se aforan a un litro de agua, ajustando el pH a 7.0, el medio de cultivo se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 Lb de presión en ciclo líquido.

COLUMNA CHELATING HISTRAP

La columna debe lavarse con 5 volúmenes de agua destilada antes de ser usada con flujo de 1mL/min

Amortiguador de columna

Tris ED 50/1/1 pH 7.4

*En la primera purificación agregar 4M de Urea

Amortiguador de elución

Tris ED 50/1/1 pH 7.4 + gradiente de imidazol (50, 100, 200, 500 mM)

*En la primera purificación agregar 4M de Urea a cada solución

COLUMNA SEPHADEX PARA LA PURIFICACIÓN DE LAS GST's

Amortiguador de extracción

Para un volumen final de 60 mL

PBS 10X pH 7.4 6.0 mL

Tritón X-10 ($C_{12}H_{26}O(OCH_2CH_2)_{10}$) 0.6mL

EDTA 0.5M 0.6mL

Inhibidores de proteasas para el amortiguador de extracción

PMSF 0.06 %

TLCK 0.1 mM

Amortiguador de columna

PBS 1X pH 7.4

Triton X-10 ($C_{12}H_{26}O(OCH_2CH_2)_{10}$) 1%

Amortiguador de elución, preparado en el momento

Glutación	10 mM
Tris-HCl pH 8.0	50 mM

La columna se guarda a 4°C con Etanol al 20%

COLUMNA LENTIL-LECTINA SEFAROSA 4B PARA LA PURIFICACIÓN DE LLGP's

Amortiguador de lavado pH 8.0

Tris-HCl	0.05 M
NaCl	0.2 M

Amortiguador de unión pH 7.4

Tris – HCl	20 mM
NaCl	0.5 M

Amortiguador de elusión pH 8.0

α -metilmanósido	0.2 M
NaCl	0.2 M
Tris-HCl	0.05M

COLUMNA DEAEFF PARA LA PURIFICACIÓN DE LA SOD

Amortiguador de equilibrio pH 7.5

Tris-HCl	50 Mm
----------	-------

Amortiguador de elución pH 7.5

Gradiente de NaCl en Tris-HCl 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M

Amortiguador de diálisis para la SOD

TRIS-ACETATO TAE pH 7.5

Tris base	0.04 M
CH ₃ COOH	0.02 M
EDTA	0.001 M
Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	0.75 M

Aforar hasta 1L de agua desionizada

REACTIVO DE LOWRY

Añadir a cada tubo 4mL de la solución final, para 10 mL se requieren

A. Na ₂ CO ₃ diluido en NaOH 0.1M	9.8 mL
---	--------

B. $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 mL
C. Cu_2SO_4	0.1 mL

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO pH 7.4 (PBS) 1L

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.3 mM
KH_2PO_4	1.4 mM

AMORTIGUADOR HSEP PARA OBTENCIÓN DE LLGP'S

HEPES-NaOH	0.05 M
Sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	0.2 M
EDTA	2.0 mM
TLCK	5.0 mM
PMSF	5.0 mM

AMORTIGUADOR PARA DIALIZAR LLGP'S pH 8.0

Tris- HCl	0.05 M
NaCl	0.2 M

AMORTIGUADOR DE CARGADO PARA PROTEINAS

H ₂ O desionizada	3.8 mL
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.0 mL
SDS 10%	1.6 mL
2-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol	50 µg

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS 10X, 1L

Tris base	30.2 g
Glicina	188.0 g
SDS 10%	100 mL

AMORTIGUADOR DE TRANFERENCIA PARA PROTEINAS, 1L

Metanol	200 mL
Tris base	3.08 g

Glicina 14.48 g

AMORTIGUADOR TED 100/10/1, 100mL, pH 7.4

Trietanolamina 100mM 1.857 g

EDTA 10mM 2mL de stock 0.5 M

DTT 1mM 100 µL de stock 1M

Todos los reactivos se ajustan al pH indicado y se aforan a 1L.

GELES DE ACRILAMIDA

GEL SEPARADOR	12%	10%
Acrilamida 30% Bis 0.8%	1.05 mL	1.65 mL
Tris 1.5M pH 8.8	0.625 mL	1.25 mL
H ₂ O	0.65 mL	1.7 mL
SDS 10%	50 µL	100 µL
Persulfato de amonio	16.5 µL	33 µL
TEMED	1.65 µL	3.3 µL

GEL CONCENTRADOR	12%	10%
Acrilamida 30% Bis 0.8%	325 mL	0.5 mL
Tris 0.5M pH 6.8	375 mL	0.75 mL
H ₂ O	0.7 mL	1.51 mL
SDS 10%	15 µL	30 µL
Persulfato de amonio	5 µL	10 µL
TEMED	0.75 µL	1.5 µL

SOLUCIÓN DE BLOQUEO PARA WESTER BLOT LECHE 5%

Leche Svelty 2.5 g

Aforar a 50 mL con PBS 1X- Tween 0.3%

SOLUCIÓN DE LAVADO PARA WESTERN BLOT PBS 1X-Tween 0.3%

Tween 20 300 µL

Aforar a 100 mL con PBS 1X y preparar en el momento antes de usarse

SOLUCIÓN REVELADORA PARA WESTERN BLOT

Diaminobencidina (C₁₂H₁₄N₄C₁₂H₁₈Cl₄N₄(4HCl)) 0.01 g

H₂O₂ 5 µL

PBS 1X 50 mL

Alineamiento de la TRX-1 de *Taenia solium*

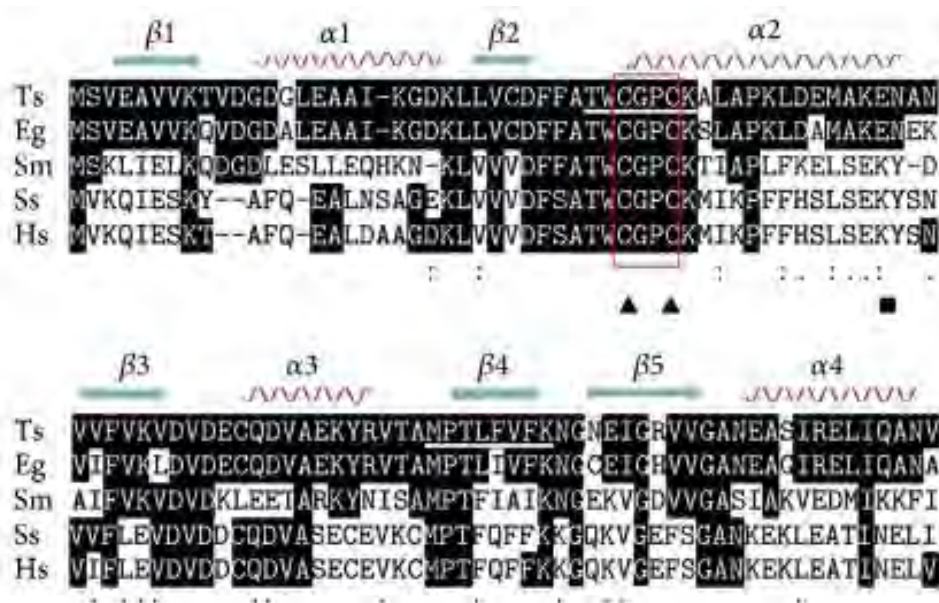


Fig.1 Alineamiento de la TRX-1 de *Taenia solium*, Ts *Taenia solium*, Eg *Echinococcus granulosus*, Sm *Schistosoma mansoni*, Ss *Sus scrofa*, Hs *Homo sapiens*.

Tablas de contingencia para P29, GST-26, TRX-I y LLGP's

Tabla 1.- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la GST26

Capacidad de la GST26 como antígeno diagnóstico				
		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	71	2	73
	Negativo	4	30	34
Total		75	32	107
95 % I.C.				
		Límite inferior	Límite superior	
Pacientes correctamente diagnosticados		94.39%	87.70%	97.70%
Sensibilidad		94.67%	86.19%	98.28%
Especificidad		93.75%	77.78%	98.91%

Valor predictivo positivo	97.26%	89.56%	99.52%
Valor predictivo negativo	88.24%	71.61%	96.16%

Tabla 2.- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la TRX-I

Capacidad de la TRX-1 como antígeno diagnóstico				
		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	48	1	49
	Negativo	28	30	58
	Total	76	31	107
		95 % I.C.		
		Límite inferior	Límite superior	
Pacientes correctamente diagnosticados	72.90%	63.30%	80.82%	
Sensibilidad	63.16%	51.26%	73.71%	
Especificidad	96.77%	81.49%	99.83%	
Valor predictivo positivo	97.96%	81.49%	99.89%	
Valor predictivo negativo	51.72%	38.35%	64.87%	

Tabla 3.- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de la P29

Capacidad de la P29 como antígeno diagnóstico				
		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	61	1	62
	Negativo	15	30	45
	Total	76	31	107
		95 % I.C.		
		Límite inferior	Límite superior	
Pacientes correctamente diagnosticados	85.05%	76.55%	90.95%	
Sensibilidad	80.26%	69.23%	88.18%	

Especificidad	96.77%	81.49%	99.83%
Valor predictivo positivo	98.39%	90.17%	99.92%
Valor predictivo negativo	66.67%	50.95%	79.56%

Tabla 4.- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las LLGP's

Tabla 10. Capacidad de las LLGP's como antígeno diagnóstico				
		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	36	0	36
	Negativo	41	30	71
	Total	77	30	107
		95 % I.C.		
		Límite inferior	Límite superior	
Pacientes correctamente diagnosticados	71.96%	62.31%	80.01%	
Sensibilidad	61.68%	51.75%	70.77%	
Especificidad	46.75%	35.42%	58.41%	
Valor predictivo positivo	100.0%	85.87%	99.70%	
Valor predictivo negativo	100.0%	87.99%	99.75%	