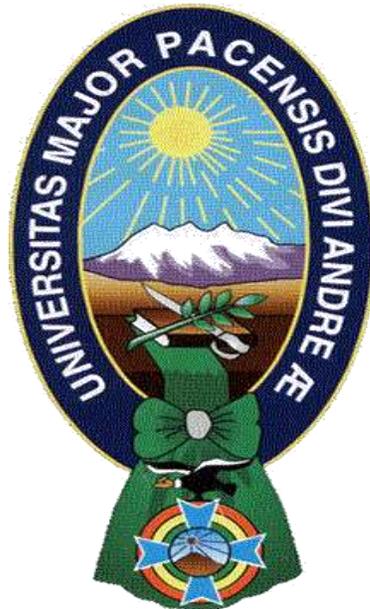


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



TESIS DE GRADO

**OPTIMIZACIÓN DEL USO DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT
COMO HERRAMIENTA INMUNOPROTEÓMICA, PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS CON FINES DE
DIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSIS**

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA
EN BIOQUÍMICA**

POSTULANTE: MELISSA CARMEN MACHACA
ASESORAS: *MSc.* ANETH VASQUEZ MICHEL
: *MSc.* MARÍA LUZ SOTO SÁNCHEZ

LA PAZ - BOLIVIA
2024

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



TESIS DE GRADO

**OPTIMIZACIÓN DEL USO DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT
COMO HERRAMIENTA INMUNOPROTEÓMICA, PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS CON FINES DE
DIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSIS**

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA

POSTULANTE: MELISSA CARMEN MACHACA

LA PAZ - BOLIVIA
2024

DEDICATORIA

En primer lugar, agradecer a Dios nuestro creador; a mi mamá Dominga Machaca Mamani, por enseñarme que a pesar de las dificultades que enfrentamos en la vida, es una razón más para seguir adelante; a la Dra. Aneth Vásquez Michel, por su cariño incondicional. A ellas mi amor absoluto.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a mis tutoras por sus consejos valiosos, tanto en el entorno laboral como personal, brindarme sus conocimientos, instruirme, comprenderme y apoyarme en el trascurso de la elaboración de mi tesis. A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas y al Instituto SELADIS, agradecer por toda la formación que obtuve durante mi carrera como estudiante.

TABLA DE CONTENIDOS (ÍNDICE)

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Justificación.	1
1.2 Objetivo general y específicos	2
2. DISEÑO TEÓRICO	2
2.1 Antecedentes	2
2.2 Marco teórico	3
3. DISEÑO METODOLÓGICO	15
3.1 Tipo de investigación	15
3.2 Población en estudio, ámbito y periodo de investigación	15
3.3 Materiales métodos, técnicas y procedimientos empleados.	17
4. METODOLOGIA	19
5. RESULTADOS	29
5.1. Cuantificación de proteínas	29
5.2 Electroforesis en primera dimensión (isoelectroenfoque)	29
5.3 Electroforesis monodimensional	33
5.4. <i>Western blot</i>	35
6. DISCUSIÓN	38
7. CONCLUSIÓN	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43

TABLA DE CUADROS Y GRÁFICOS

TABLA 1: Antígenos de <i>Taenia solium</i>	8
TABLA 2: Tiempo y voltaje de las muestras en el equipo de electroforesis bidimensional	23
TABLA 3: Protocolo del gel separador.....	25
TABLA 4: Protocolo gel stacking	26
TABLA 5: Soluciones de cargado para la corrida electroforética de proteínas.....	26
TABLA 6: Condiciones de eletrotransferencia aplicadas en el equipo de I BLOT 2	27
TABLA 7: Concentración de proteínas totales de líquido vesicular de cisticercos	29
TABLA 8: Proteínas halladas en líquido vesicular	33
TABLA 9: Resultado de pacientes positivos por el método de ELISA.....	36
TABLA 10: Proteínas antigénicas encontradas por el método de <i>Western blot</i>	36

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo vital de <i>Taenia solium</i>	5
FIGURA 2: Cisticercos de <i>Taenia solium</i>	6
FIGURA 3: Presencia de casos de cisticercosis en el mundo en el año (2018).....	11
FIGURA 4: Perfil proteico de <i>Escherichia coli</i> , en geles de SDS – PAGE.....	30
FIGURA 5: Proteínas del estándar 2 –D.....	31
FIGURA 6: Patrón de electroforesis bidimensional 2D en geles de acrilamida SDS- PAGE y piperazina.....	32
FIGURA 7: Gel de SDS – PAGE al 15% de proteínas, presen en condiciones nativas.	34
FIGURA 8: Gel de SDS – PAGE al 15% en condiciones reducidas con <i>B</i> mercaptoetanol.	35
FIGURA 9: Resultado del <i>Western blot</i> 2D.....	37

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Ag.LVC	Concentración proteica antigénica total del líquido vesicular de cisticerco
Anti- IgG	Anti inmunoglobulina G
APS	Persulfato amónico
CHAPS	Derivado de la sulfobetaína del ácido fólico, es un detergente zwitteriónico
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
EITB	Electroinmuno transferencia enzimática
GAPDH	Gliceraldehido- 3-fosfato deshidrogenasa
GP	Glicoproteína
IC	Intervalo de confianza
IL12	Interleucina 12
IFN-γ	Interferón gamma
KDa	Kilodalton
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NC	Neurocisticercosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud

PBS – TWEEN	Tampon fosfato salino
SDS - PAGE	Gel de poliacrilamida de sodio dodecil sulfato
RMN	Resonancia magnética nuclear
SNC	Sistema Nervioso central
TAC	Tomografía axial computarizada
TCA	Acido tricloroacético
TH1	T helper 1
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tris –HCL	Tris ácido clorhídrico

RESUMEN

La cisticercosis es una enfermedad zoonótica desatendida, causada por *Taenia solium* y transmitida por la ingestión de los huevos del parásito, causando daño al tejido muscular (cisticercosis) y posteriormente al cerebro (neurocisticercosis). (Chile, 2020)

El método que se emplea para el diagnóstico de la cisticercosis es el ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente unido a enzima), el cual tiene sensibilidad relativamente baja, por lo que el diagnóstico del paciente debe ser confirmado por *Western blot* o por las pruebas imagenológicas, tomografía axial computarizada y resonancia magnética nuclear. (Oswgladys & Ferrer, 2016)

Según la OPS/OMS (2018) la prueba serológica comercial no presenta una especificidad y sensibilidad suficiente para el diagnóstico de cisticercosis debido a la reacción cruzada que presenta con otros parásitos.

La situación actual de Bolivia con respecto a la cisticercosis no está actualizada, sin embargo, es necesario tener en cuenta que la mayor parte de la población no tiene servicios básicos y es uno de los factores causantes de la cisticercosis. Otras causas que podemos mencionar son: falta de control en la crianza de porcinos, la presencia de mataderos clandestinos y la venta de carne de cerdo de dudosa procedencia.

El objetivo del presente estudio es optimizar el uso de la técnica de *Western blot*, para el estudio de proteínas antigénicas nativas.

Para el presente trabajo se obtuvo un cerdo infectado con cisticercos de *Taenia solium*, que fue faenado. Procedente de la región de Batallas, ubicada en la Provincia Los Andes del departamento de La Paz. La obtención de la muestra y la parte experimental se realizó en el Instituto SELADIS, en un ambiente adecuado para evitar la contaminación de las muestras.

Posteriormente, se efectuó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, para conocer la concentración de las mismas. Luego se emplearon métodos para solubilizar, disgregar, desnaturalizar y reducir las proteínas, con la finalidad de obtener las proteínas antigénicas por sus puntos isoeléctricos por electroforesis bidimensional y sus pesos moleculares a través de la electroforesis vertical. Dichas proteínas antigénicas, presentes

en el gel, se transfirieron al equipo de *Western blot*, en una membrana de nitrocelulosa y finalmente se conjugaron con los anticuerpos de pacientes positivos a cisticercosis diagnosticados por ELISA.

Entre los resultados obtenidos, se encontró que el líquido vesicular presentó 30 proteínas, de las cuales 5 fueron seleccionadas por presentar reactividad con los sueros positivos para cisticercosis.

Palabras clave: Cisticercosis, electroforesis bidimensional, electroforesis vertical, *Taenia solium*, *Western blot*.

ABSTRACT.

Cysticercosis is a neglected zoonotic disease caused by *Taenia solium* and transmitted by the ingestion of the parasite's eggs, causing damage to muscle tissue (cysticercosis) and later to the brain (neurocysticercosis). (Chile, 2020)

The method used for the diagnosis of cysticercosis is ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), which has relatively low sensitivity, so the patient's diagnosis must be confirmed by Western blot or by imaging tests, computed axial tomography and nuclear magnetic resonance. (Oswgladys & Ferrer, 2016)

According to PAHO/WHO (2018), the commercial serological test does not have sufficient specificity and sensitivity for the diagnosis of cysticercosis due to the cross-reaction it presents with other parasites. The current situation in Bolivia regarding cysticercosis is not up to date, however, it is necessary to take into account that most of the population does not have basic services and it is one of the factors causing cysticercosis. Other causes that we can mention are: lack of control in pig breeding, the presence of clandestine slaughterhouses and the sale of pork of dubious origin.

The objective of the present study is to optimize the use of the Western blot technique for the study of native antigenic proteins.

For the present work, a pig infected with *Taenia solium* cysticerci was obtained and slaughtered. It came from the Batallas region, located in the Los Andes Province of the department of La Paz. The sample collection and the experimental part were carried out at the SELADIS Institute, in an adequate environment to avoid contamination of the samples.

Subsequently, the quantification of proteins was carried out by the Bradford method, to know their concentration. Methods were then used to solubilise, disaggregate, denature and reduce the proteins, in order to obtain the antigenic proteins by their isoelectric points by two-dimensional electrophoresis and their molecular weights by vertical electrophoresis. These antigenic proteins, present in the gel, were transferred to the Western blot equipment, on a nitrocellulose membrane and finally conjugated with the antibodies of patients positive for cysticercosis diagnosed by ELISA.

Among the results obtained, it was found that the vesicular fluid presented 30 proteins, of which 5 were selected for presenting reactivity with the positive sera for cysticercosis.

Key words: Cysticercosis, two-dimensional electrophoresis, vertical electrophoresis, *Taenia solium*, *Western blot*.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se enfoca en identificar las proteínas antigénicas de *Taenia solium*, presentes en los cisticercos extirpados de la carne de un cerdo nativo, aplicando una herramienta inmunoproteómica que es la técnica de *Western blot*.

La Tomografía Axial Computarizada o la Resonancia Magnética Nuclear son métodos de diagnóstico imagenológico de gabinete, que van acompañadas de una prueba de diagnóstico de laboratorio que es el ELISA, como prueba confirmatoria. Estas pruebas de análisis, sumados, representan un elevado costo, con la desventaja que tiene la prueba de ELISA de presentar posibles reacciones cruzadas con otros parásitos debido a que los kits que se utilizan en los laboratorios no son antígenos provenientes de cerdos nativos de la región. Sin embargo, al no existir un método de laboratorio que sea el Gold estándar para detectar cisticercosis y solo el método ELISA es el disponible, el presente estudio utilizó datos de pacientes positivos con esta prueba, resultados que pueden ser significativos y servir de aporte a la identificación específica de las proteínas antigénicas presentes en nuestra región.

Si bien no conocemos la realidad actual sobre la cisticercosis en Bolivia, por la escasez de datos epidemiológicos que existe en nuestro país, no se puede descartar la necesidad de encontrar métodos eficaces para evaluar dicha enfermedad identificada por la OMS/ OPS como una enfermedad desatendida y frecuente en países subdesarrolladas, donde una buena parte de la población sufre por la falta de servicios básicos.

1.2. OBJETIVOS:

1.2.1. OBJETIVOS GENERAL.

- Optimizar el uso de *Western blot* como técnica inmunoproteómica para la identificación de proteínas antigénicas con fines de diagnóstico de cisticercosis.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Cuantificar proteínas totales presentes en líquidos vesiculares de cisticercos de *Taenia solium* por el método de Bradford.
- Adecuar las condiciones de electroforesis bidimensional para el análisis y comparación de patrones proteicos presentes en los extractos de cisticercos.
- Identificar proteínas antigénicas reactivas para el diagnóstico de Cisticercosis mediante el uso *Western Blot* a partir de geles bidimensionales.

2. DISEÑO TEÓRICO.

2.1. ANTECEDENTES.

El año 2015 Eduardo Ayala-Sulca & Eduardo Miranda-Ulloa, presentaron en su trabajo la “Evaluación de Electroinmunotransferencia utilizando antígeno mix nativo purificado de líquido de cisticerco de *Taenia solium* para el diagnóstico de cisticercosis humana” utilizando antígeno mix nativo purificado con el 100% de sensibilidad y 100% de especificidad. Las ocho glicoproteínas antigénicas específicas que purificaron son: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14, 13 KDa, la cual utilizaron para elaborar las tiras de EITB. (Ayala & Miranda, 2015)

La Organización Panamericana de La Salud (OPS) recomienda como método inmunológico para el diagnóstico de neurocisticercosis el ensayo de EITB usando siete glicoproteínas de metacestodo de *Taenia solium* (GP50, GP42-39, GP24, GP21 GP18, GP14 y GP13) purificadas por cromatografía de afinidad. Con ello obtuvieron 98% de sensibilidad y 100% de especificidad y la sensibilidad no se vio afectada por la localización del cisticerco en el SNC. (Oswgladys & Ferrer, 2016)

El año 2016, Kelly Davelois, Hermes Escalante y Cesar Jara, en el trabajo denominado “Rendimiento diagnóstico del *Western blot* para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana” indica la extracción de los antígenos de excreción y secreción de tres parásitos, larvas de *Taenia solium*, quistes de *Echinococcus granulosus* y la forma adulta de *Fasciola hepática*, logrando detectar ocho glicoproteínas para cisticercos: (35, 31, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 KDa); tres glicoproteínas para hidatidosis (8, 16, 21 KDa) y dos glicoproteínas para fascioliasis (17 y 23 KDa).

La prueba detecto la presencia de anticuerpos con una sensibilidad del 96% en la detección de una o las trece bandas presento una especificidad del 100%, e individualmente se tuvo una sensibilidad para cisticercosis de 97%, para hidatidosis de 94% y para fascioliasis 96 %. (Kelly Davelois, 2016)

En el año 2018 Hermes Escalante, Elba Miranda & otros (S/A), realizan el trabajo “La técnica de «*Western blot*» con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus cellulosae* para el diagnóstico de la cisticercosis” Para tal trabajo se utilizó el fluido vesicular de cisticercos, obtenido de cerdos infectados. La eficiencia del *Western blot* se evaluó con 111 muestras de las cuales 35 son de pacientes positivos, 65 pacientes con otras parasitosis y 11 fueron personas sanas, los resultados presentaron bandas antigénicas con los pesos moleculares de 42, 35, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 kDa. De acuerdo a estos antecedentes, la banda de 42 kDa es inespecífica, no así las bandas de 24, 23 y 13 kDa que reaccionaron con sueros de pacientes con *Taenia solium*. La prueba presenta una sensibilidad de 91% y una especificidad de 100%. (Escalante, Miranda, Lorca, Verastegui, & Torres, S/A)

2.2. MARCO TEÓRICO

- **Cisticercosis**

La cisticercosis es una enfermedad zoonótica parasitaria, causada por el estadio larvario (cisticerco) de *Taenia solium*, dicho parásito pertenece a la clase Cestodo, se presenta como gusano plano de color blanquecino, amarillo o rosado que carece de intestino por lo cual la absorción de los nutrientes es a través del tegumento que posee, es hermafrodita por presentar gónadas sexuales femeninas y masculinas y mide aproximadamente de 2 a 8 metros de largo. Presenta una cabeza, cuello y segmentos o estrobilos que se divide en proglotides, cuando

se encuentra en la fase madura desarrollan los huevos en el ovario, para formar proglotidas grávidas. (Chile, 2020)

El hombre puede adquirir al parasito cuando ingiere accidentalmente alimentos o aguas contaminadas con huevos de *Taenia solium*, que desarrollan la cisticercosis. Los factores causales son las malas condiciones higiénicas por ausencia de servicios básicos, baja calidad de agua y alcantarillado sanitario, otra de las causas es la mala cocción de la carne de cerdo para el consumo humano y la emigración de individuos infectados por *Taenia solium*. (Salud, 2020) & (Alares, 2020)

Ciclo biológico

En la figura N° 1, muestra que el ser humano es el único hospedador definitivo de la forma adulta del parasito, la infección es por la ingesta de carne de cerdo mal cocida e infectada por quistes del parasito (cisticercos). Al llegar al tubo digestivo los quistes son liberados por la acción enzimática de los jugos gástricos y de esta manera el escólex o cabeza es liberada, con la ayuda de sus cuatro ventosas y la doble cadena de anzuelos que posee en la cabeza le permiten enquistarse en la pared intestinal y aproximadamente en 2 meses desarrolla la *Taenia*, causando la Teniasis. La *Taenia* adulta presenta segmentos llamados proglotides donde se encuentran los huevos y son expulsados a través de las heces fecales. (Pablo Lorenzana Pombo, 2021)

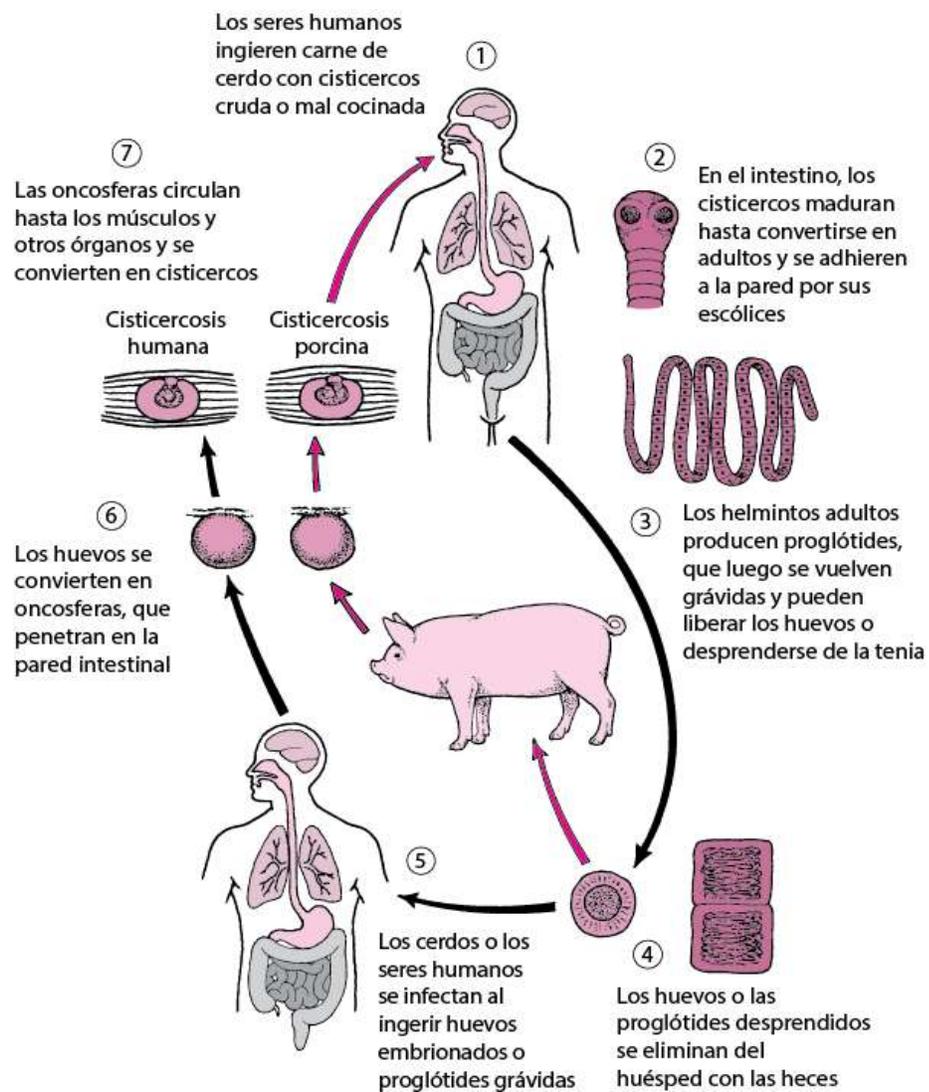
El ser humano también se convierte en huésped intermediario de forma accidental por el mecanismo de transmisión ano, mano, boca cuando ingiere alimentos y agua contaminada con los huevos de *Taenia solium*. Los huevos de *Taenia solium* ingresan al aparato digestivo, las enzimas digestivas degradan la membrana del huevo y se convierte en oncosfera que es el estadio larvario del parasito. La oncosfera atraviesa la pared intestinal, pasando al sistema circulatorio invadiendo: musculo, ojos, hígado, pulmones, cuando invade el sistema nervioso central (SNC) causa la neurocisticercosis. Es una enfermedad parasitaria que afecta al hombre y al porcino. (Rosirys Velásquez Salazar, 2016) & (Carlos Zapata, 2017)

El cerdo es el hospedador intermediario de la *Taenia solium*. Se infecta por la ingesta de heces fecales provenientes de una persona que presenta teniasis. Luego de ser ingeridos, los huevos del parásito (*Taenia Solium*) eclosionan en el intestino, porque la envoltura es disuelta

y los embriones (oncosferas) son liberados en el intestino delgado, atraviesan la mucosa intestinal, y llegan al torrente sanguíneo. Se transporta al tejido estriado del animal y en algunos casos invade los órganos como el corazón, formando los cisticercos, como muestra en la figura N° 2 y finalmente pasan al sistema nervioso causando la muerte del porcino. (Nancy Leon, 2013) & (Leòn, 2016)

Figura N° 1.

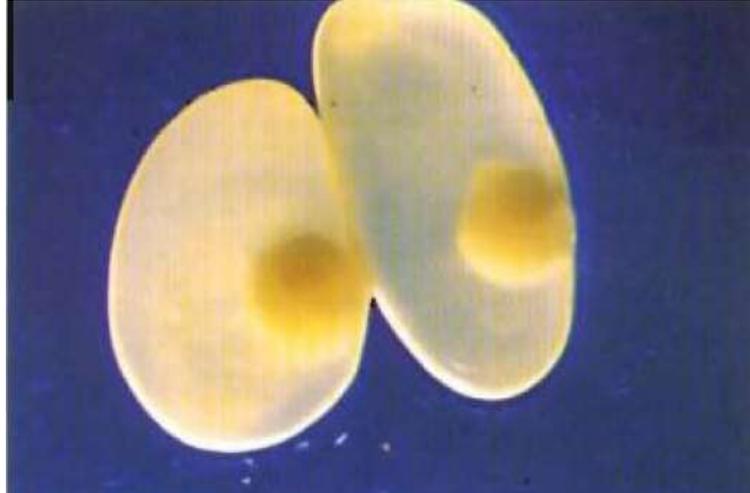
Ciclo vital de *Taenia solium*.



Nota. Imagen tomada de Manual MSD versión para profesionales (2021)

Figura N° 2.

Cisticeros de *Taenia solium*.



Nota. Imagen obtenida de (Myriam Consuelo, Augusto, & Ruben, 2006).

- **Respuesta inmunológica en la cisticercosis humana.**

Es de vital importancia el conocimiento de la respuesta inmunológica del ser humano ante la cisticercosis, para entender los mecanismos inmunológicos que desarrolla el hospedero ante el parasito y como el parasito lo evade. La interacción entre hospedero y parasito podría generar diferentes efectos tanto en el hospedero y el huésped las cuales son: el éxito en la infección, que el hospedero desarrolle la enfermedad, la destrucción del parasito y la contención del mecanismo patogénico.

Esto nos ayuda a determinar las herramientas que se utilizaran para el diagnóstico de la enfermedad y al conocer los elementos de la respuesta inmunológica del ser humano, nos permite desarrollar estrategias de prevención y tratamiento.

La función que cumple el sistema inmunológico es proteger al organismo con una supervisión constante ante la presencia de estructuras patogénicas, que pueden ser propias y ajenas.

La respuesta innata depende en su mayoría de la generación del fenómeno inflamatorio inespecífico en el entorno del patógeno y en el caso de la respuesta inmunológica adaptativa

subyace en la proliferación clonal selectiva linfocitaria, su diferenciación de las células a células efectoras tipo TH1 y TH2, con la subsiguiente producción de citosinas (IL2, IL12 e IFN- γ , de las células TH1, o IL4, IL5, IL6 y IL13 en el caso de TH2) y células plasmáticas con la producción de inmunoglobulinas específicas contra antígenos del parásito. (Larralde & S. de Aluja, 2006)

- **Componentes antigénicos de *Taenia solium*.**

Por la complejidad que presenta la *Taenia solium*, presenta una amplia variedad de proteínas antigénicas en la tabla N° 1, las cuales evaden la respuesta del sistema inmune del hospedador donde se encuentra albergado. Las glicoproteínas del parásito, presentan propiedades inmonogénicas. (Larralde & S. de Aluja, 2006)

Tabla N° 1. Antígenos de *Taenia solium* utilizados en el estudio de Neurocisticercosis

Fuente: (Larralde & S. de Aluja, 2006)

Tipos de antígenos	Determinación	Uso	Caracterización funcional
Fluido vesicular	10 kD 26 kD 35 kD 70 kD	Diagnóstico Caracterización	Detección de anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con NC. Diferencias antigénicas entre cisticercosis de diferentes continentes. Proliferación específica de CMSP de pacientes con NC. Descripción de un antígeno compartido únicamente por la <i>Taenia solium</i> .
Oncosfera	TSOL18 TSOL45 22 kD 22.5 kD 31.3 kD 64 kD 70 Kd	Vacuna Diagnóstico	Protección casi completa en cisticercosis porcina experimental. Detección de anticuerpos en sueros de cerdo con cisticercosis porcina. Detección de casos con teniasis.
Escólex	13 kD 17 kD 26 kD	Diagnóstico	Detección de anticuerpos en suero de pacientes con NC activa. Proliferación específica de CMSP de pacientes con NC.

Tipos de antígenos	Determinación	Uso	Caracterización funcional
Antígeno de secreción	E/S HP10 66 kD 190 kD 230 kD	Diagnostico	<p>Detección de antígenos parasitarios circulantes en LCR y suero de pacientes con NC.</p> <p>Detección de antígenos parasitarios circulantes en suero de pacientes epilépticos y personas con teniasis.</p> <p>Detección de anticuerpos en LCR de pacientes con NC.</p> <p>Correlación con el estadio parasitario.</p>
Glicoproteínas	Ts18var1 LLGP de 8 GP10 GP13 GP24 GP39-42 GP50 Ag1V1 Ag2 12kD 16kD 18kD. 32kD 30kD 53kD 64kD 100kD 200kD	Diagnóstico Fisiopatología Caracterización	<p>Detección de anticuerpos en saliva, suero y LCR de pacientes con NC y cisticercosis porcina.</p> <p>Detección de casos con teniasis</p> <p>Detección de personas expuestas al parásito.</p> <p>Localización de las glicoproteínas antigénicas durante diferentes estadios parasitarios y durante la inflamación.</p> <p>Proliferación específica de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con NC.</p> <p>Evaluación de la contribución de los carbohidratos a la antigenicidad.</p> <p>Descripción de los componentes bioquímicos de las diferentes fracciones glicoproteínas</p>

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), trabaja con la concentración proteica antigénica total del líquido vesicular de cisticerco Ag.LVC de *Taenia solium* purificado con un rango de concentración proteica entre 3 a 5 µg/mL, por lo que podemos indicar que la concentración de proteínas que encontramos no se encuentra dentro de los parámetros del CDC.

Actualmente investigadores peruanos preparan tiras EITB (Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay) con 0,025 µg/mm de antígeno nativo total, pudiendo preparar cientos de tiras con el antígeno en bajas concentraciones obtenido en un solo proceso de purificación, siendo factible la preparación inmediata de kits in house y a mediano plazo la preparación de kits comerciales. El Ag.LVC.*Taenia solium* mix nativo-purificado se puede preparar, validar y utilizar en países en vías de desarrollo, realizándose una estandarización previa; además de ser confiable y de costo accesible, constituyéndose en una alternativa para el diagnóstico serológico y para la ejecución de estudios epidemiológicos. (Ayala & Miranda, 2015)

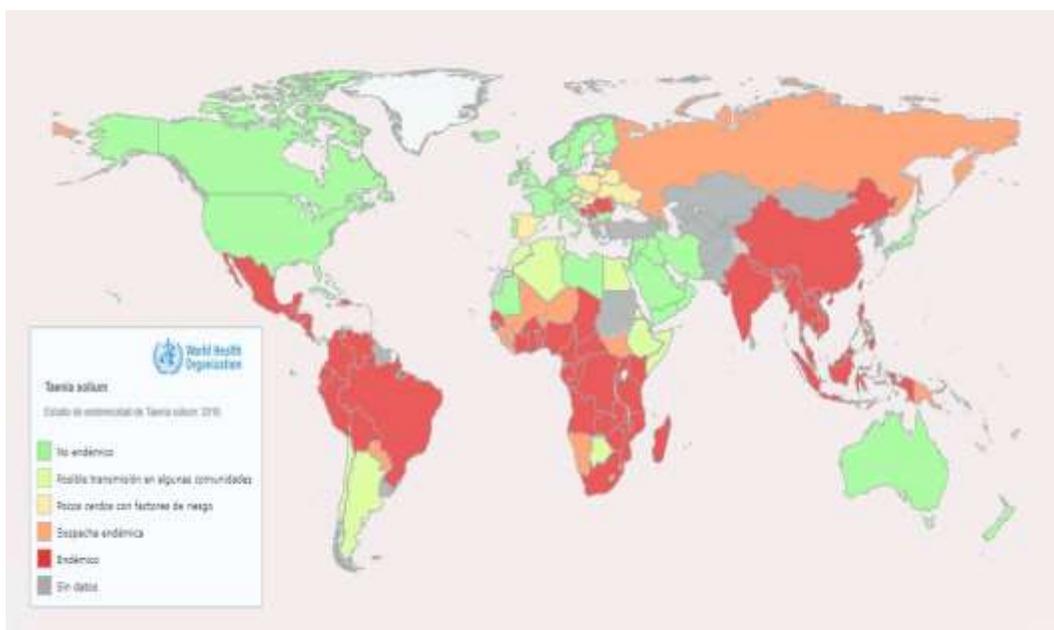
- **Epidemiología**

La teniasis y cisticercosis causada por la *Taenia solium* se encuentran en la lista de enfermedades desatendidas debido a que afecta a las regiones más desfavorecidas. La OMS identifica a la *Taenia solium* como la principal causante de muerte en el mundo por enfermedades transmitidas por la alimentación. (Alares, 2020) A nivel mundial se estima que la cisticercosis afecta a 50 millones y causa 50.000 muertes cada año. (Kelly Davelois, 2016)

Los lugares endémicos con mayor prevalencia de presentar infección por cisticerco son: Latino América, África, Indonesia y Nueva Guinea. (Pablo Lorenzana Pombo, 2021), que presenta la figura N° 3.

Figura N° 3

Presencia de casos de cisticercosis en el mundo en el año (2018).



Nota. Imagen obtenida de (Alares, 2020).

- **Pruebas para el diagnóstico de la cisticercosis**

Se han realizado esfuerzos para mejorar el diagnóstico por inmunoserología buscando antígenos específicos para esta enfermedad ya que en la cisticercosis el parásito es capaz de generar una gran variedad de estructuras antigénicas. Si las pruebas realizadas en sangre dan positivo será un indicativo de infección invasiva en el tejido, y lograr la generación de anticuerpos, causada por *Taenia solium*. (Murillo, Ponce, Zavala, & Solorzano, 2019)

- **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Esta prueba de ELISA es de tipo indirecta y se detecta la fracción 53 kDa que es obtenida del metacestodo de la *Taenia solium*. Posteriormente, la fracción sera fijada a placas de policarbonato. Cada suero problema tiene una dilución 1/100, luego se adiciona una anti gammaglobulina humana Anti- IgG unida a la enzima peroxidasa. Después es la adición del sustrato (de acuerdo a la enzima utilizada) y recién se detiene la reacción enzimática y se evalúa la concentración mediante la coloración. (Julio Giraldo, 2016)

Los anticuerpos encontrados indican que el individuo estuvo expuesto a la infección y no necesariamente es una infección activa, ya que los anticuerpos persisten por años luego que el parásito ha muerto. (Oswgladys & Ferrer, 2016)

La prueba serológica permite trabajar con antígenos extraídos de cisticercos de cerdos nativos del lugar, sin embargo, los resultados pueden presentar falsos positivos por una reacción cruzada halladas en muestras de pacientes con hidatidosis. (Osvaldo Germán, Rodolfo Gustavo, Lucia, & Marcelo, 2019)

- **Técnicas de transferencia**

Implican la separación de electrotransferencia y transferencia de proteínas, ADN y RNA, son de tres tipos:

- ***Western blot* o electroinmunotransferencia**

El *Western blot* es una técnica inmunoproteómica que permite la identificación de proteínas antigénicas reactivas del parásito al anticuerpo del paciente positivo a la cisticercosis, la técnica emplea la combinación de otras técnicas proteómicas las cuales son: isoelectroenfoque bidimensional 2D, que contempla combinación de un isoelectroenfoque que permite la identificación de las proteínas por su punto isoeléctrico y la electroforesis en gel de poliacrilamida o SDS-Page, las cual permite separar las proteínas por su peso molecular. Esto no solo nos permite el diagnóstico de la cisticercosis, sino que también nos ayuda a conocer otras proteínas de importancia, pertenecientes al parásito que nos ayudarían a conocer su metabolismo.

El complejo antígeno anticuerpo es reconocido por un anticuerpo unido a una enzima. La prueba es revelada cuando se agrega el sustrato cromogénico que precipita de acuerdo al peso molecular de la proteína y se forman las bandas. La técnica presenta una sensibilidad de 98% determinado por Tsag y una sensibilidad de 100%. (Kelly Davelois, 2016)

- **Southern blot**

Esta técnica fue creada por el Biólogo Molecular Edwin Southern y permite la identificación DNA purificado, provenientes de las muestras biológicas. Las enzimas de restricción realizan

el fraccionamiento de la molécula de estudio, los fragmentos de DNA son separados mediante electroforesis y transferidos a una membrana sólida para su posterior exposición a una sonda de DNA y marcadas con una sustancia radioactiva, fluorescente o química.

- **Northern blot**

Este método nos permite estudiar el ARN, mediante las secuencias de este, que son extraídas de muestras biológicas, los fragmentos son separados por electroforesis y transferidos a una membrana sólida y expuestas a sondas de DNA y marcadas con una sustancia radioactiva, fluorescente o química. (Institute, 2023)

- **Electroforesis bidimensional 2D**

La electroforesis bidimensional es una técnica de alta resolución cuyo objetivo es la separación de mezclas muy complejas de proteínas, en un solo análisis. Es una técnica resultante de la combinación de un isoelectroenfoque y una electroforesis en gel de poliacrilamida o SDS-Page. La separación se presenta en dos etapas, la primera es la separación de las proteínas a través de su punto isoelectroenfoque en tiras IPG, que son identificadas en el sistema de isoelectroenfoque Protean i12 y la segunda etapa separa a las macromoléculas en el orden de sus masas moleculares por los efectos de filtración en los geles. (Villegas, Torres, Röthlisberger, & Delgado, 2019)

Por otra parte, la electroforesis en geles verticales de las proteínas es posible realizarlas en estado nativo y desnaturizado, la primera opción permite obtener las proteínas en su forma tridimensional, para tal efecto se usa un tampón no reductor y no desnaturizante; para la segunda opción las proteínas se presentan en péptidos por la acción de los agentes reductores *B*-metamercaptoetanol, detergente aniónico SDS y el calor. La función que cumplen los agentes reductores y el calor es romper los puentes disulfuro y los grupos tiol, que están en las cadenas polipeptídicas de las proteínas; el SDS y el calor hacen que exista una carga negativa que rompa las interacciones hidrofóbicas. (Karina Martínez, 2017).

Las muestras son depositadas en un soporte que es el gel formado por poliacrilamida, acrilamida, SDS, TEMED. La corrida de la muestra se realiza en un campo eléctrico y la migración de las moléculas se evalúa posteriormente luego de la corrida. Para detectar las

bandas se utilizan por diferentes tinciones del gel, entre ellas, tinción de azul de Coomasie. (Cardenas Garcia, Martin Rufian, & Lobo Garcia, 2016)

Esta técnica presenta un alto poder de resolución y bajo costo, que permite identificar las proteínas por su peso molecular, existiendo un movimiento de las proteínas en respuesta a un campo eléctrico a través de una matriz porosa (tamiz) o gel de poliacrilamida, dando como resultado la separación de las proteínas. (Carreto et al, 2021). La migración de las proteínas es según su peso molecular, las proteínas más grandes se encuentran al inicio y según su migración las más pequeñas están al final y se puede visualizar por la tinción con bromofenol y el marcador de peso molecular, dicho marcador presenta proteínas purificadas con un peso molecular conocido. (Karina Martínez, 2017)

Diagnóstico por imágenes:

- **Tomografía Axial Computarizada (TAC) y Resonancia Magnética nuclear (RMN)**

Las técnicas de neuroimágenes como la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) son las técnicas recomendadas, sin embargo, su alto precio y baja accesibilidad en lugares alejados impide su diagnóstico en zonas rurales. (Oswgladys & Ferrer, 2016)

- **Tomografía axial computarizada (TAC)**

Este método permite identificar las formas quísticas que se encuentran en el parénquima cerebral, el grado de hidrocefalia y el edema cerebral reaccional. Los hallazgos que el escáner cerebral proporciona varían según la etapa evolutiva y es necesario realizar pruebas serológicas conjuntamente con dicha prueba, para correlacionar los resultados.

- **Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Se tiene evidencia que la RMN presenta mayores ventajas que la TAC, las cuales son: detección de etapas iniciales de la infección, (cuando los embriones se están desarrollando en los tejidos), reconocimiento de quistes isointensos, (no son fácilmente detectables

mediante TAC), visualización de escólex y quistes intraventriculares en ocasiones e información sobre la viabilidad del quiste, según la intensidad de la imagen del contenido quístico. (Néstor Gerardo, 2006)

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio realizado corresponde a un diseño observacional descriptivo.

3.2. POBLACIÓN EN ESTUDIO, ÁMBITO Y PERIODO DE INVESTIGACIÓN.

3.2.1. Sitio / contexto de estudio:

- Sitio de recolección del cerdo infectado con cisticercosis: Municipio de Batallas, provincia Los Andes del departamento de La Paz.
- Lugar del desarrollo del proyecto base del trabajo: Instituto SELADIS Laboratorio de Microbiología Molecular.
- Lugar de recolección de los sueros positivos para Cisticercosis: Banco de sueros del Laboratorio de Parasitología, Instituto SELADIS.

3.2.2. Universo, población y tamaño de muestra

- **Muestra de líquido vesicular de cisticercos:** Se extrajo 15 mL de líquido vesicular y se fue almacenado a -80° C
- **Muestras de suero de pacientes:** 5 sueros de pacientes positivos diagnosticados por el método de ELISA, en el Laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS.

3.2.3. Criterios de inclusión

✓ Parásitos:

- Cisticercos provenientes de carne de cerdo recién faenado (fase de rigor mortis) en un tiempo de 12 hasta 72 horas de la muerte del animal y conservada a 4 ° C.

- La carne porcina infectada debe tener un alto nivel infestación de cisticercos.
- Los cisticercos deben contener líquido vesicular.
 - ✓ **Muestras de sueros de pacientes:**
- Sueros de pacientes positivos a cisticercosis diagnosticados por el método de ELISA

3.2.4. Criterios de exclusión

Parásitos

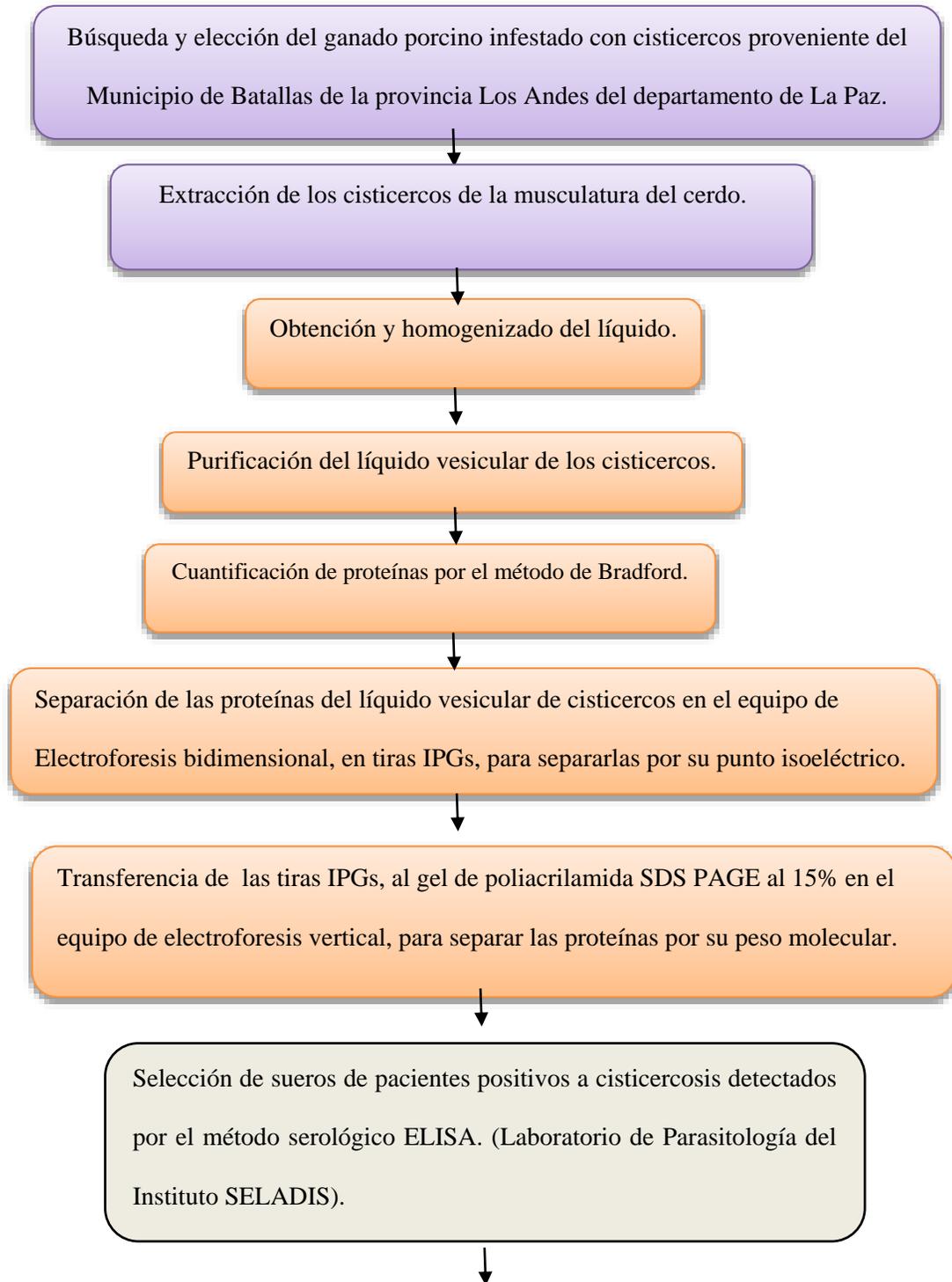
- Carne de cerdo congelada.
- Carne con cisticercos calcificados

Muestras de suero.

- Muestras de suero que provengan de pacientes con otra enfermedad parasitaria tisular como: hidatidosis, triquinosis y sarcocistosis.
- Sueros lipémicos, ictéricos y hemolizados.

3.3. MATERIALES MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS.

3.3.1. Descripción general de técnicas y procedimientos



Transferencia de proteínas (antígenos) del parásito al papel de nitrocelulosa, realizado en el equipo I Blot 2, para el posterior conjugado de los anticuerpos presentes en sueros de pacientes positivos a cisticercosis, determinados por el método de ELISA, realizados en el laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS.



Análisis de los resultados.

4. METODOLOGÍA

Las medidas de bioseguridad fueron implementadas adecuadamente para evitar contaminaciones e infección con la muestra; no obstante, esto no es lo único que se debe tomar en cuenta; ya que, cada paso es sumamente importante para obtener buenos resultados.

4.1 Obtención de la carne de cerdo infestada por cisticercos

En la investigación de Ayala y Miranda (2015), también se seleccionaron cerdos naturalmente parasitados, sin embargo, en nuestro estudio solo se trabajó con un solo cerdo, que fue naturalmente parasitado, procedente de un municipio aledaño a la ciudad de La Paz, debido a la dificultad de encontrar carne de cerdo infestado con cisticercosis en los puntos de venta de carne porcina.

De este modo se obtuvo un solo cerdo y la selección del mismo se realizó mediante el examen de la lengua, que consiste en visualizar o palpar los cisticercos en la superficie de la cara posterior e inferior de la lengua del animal. Este método de selección es relativamente sensible 87% aproximadamente y altamente específico 99%, para detectar cisticercosis porcina mediante técnicas de signos convencionales. Ayala & Miranda (2015)

Para hallar la carne de cerdo infestada por cisticercos, se realizó un viaje al municipio de Batallas de la provincia los Andes en el departamento de La Paz, donde se encontró un cerdo que presentaba en la lengua posterior cisticercos visibles. El faenado del animal lo realizaron pobladores del municipio. Nos llamó la atención que existen lugares clandestinos donde faenan los cerdos para su posterior venta de carne, la comercialización no tiene ningún control sanitario y podemos ver en las calles la venta de este producto cárnico sin garantías de salubridad. Al encontrarnos en los mataderos clandestinos, preguntamos si faenaban cerdos con triquina, a lo cual evadían la pregunta, por temor a represalias, la obtención del porcino se realizó gracias a un comprador de cerdos que conocía las características de estos animales infectados, el mismo que realizó el faenado del animal. La carne se trasladó inmediatamente al Instituto SELADIS.

4.2. Obtención del líquido vesicular a partir de cisticercos de *Taenia solium* de la carne de cerdo

En principio para la recolección de las muestras del líquido vesicular de los cisticercos se tomó el protocolo de extracción mencionado en el trabajo de Kelly Davelois, (2016), utilizando una jeringa de 1mL para la extracción de líquido vesicular y separarlos de los restos del tejido muscular del cerdo de los cisticercos. En el mencionado trabajo se utilizó PBS (solución tamponada con fosfato) a un pH de 7.2; sin embargo, en nuestro trabajo utilizamos solución fisiológica. Se destaca que ambas soluciones, tanto la solución salina como el PBS cumplen la función de otorgar un medio isotónico, para mantener la integridad y viabilidad de las células, debido al pH fisiológico que presenta, por lo que se utilizó esta solución para el enjuague y lavado de los cisticercos extraídos de la carne de cerdo. (BD , 2003)

Los pasos para la recolección de las muestras del líquido vesicular fueron los siguientes: se extrajeron los cisticercos del músculo de carne de cerdo, utilizando material quirúrgico (bisturí, pinzas de disección y aguja quirúrgica) y usando todas las medidas de bioseguridad (bata, gorro, guantes, lentes y barbijo) para evitar la contaminación de la muestra y del personal.

Antes de extraer el líquido vesicular, primero se realizó el lavado con solución fisiológica a cada cisticerco, teniendo cuidado de no romper la membrana, posteriormente con la ayuda de una aguja intradérmica se sujetó al cisticerco y con una jeringa de 1 mL se procedió a extraer el líquido vesicular.

Se obtuvieron, 15 mL del líquido intraquístico del cisticerco, que se llevó a centrifugar durante 30 min a 6000 rpm, el sobrenadante se guardó en tubo falcón a -80°C y la muestra de 1 mL a -20°C, para evitar la degradación de las proteínas. Separando en 9 alícuotas y seguidamente codificadas según el día de extracción.

Desde la llegada de la carne de cerdo al laboratorio extrajimos durante tres días la muestra del líquido de los cisticercos de *Taenia solium* y cuando sentimos el olor de la carne en descomposición procedimos a detener la extracción y desechar la carne de cerdo a residuos biológicos.

4.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la determinación de la concentración de proteínas en la muestra, es importante saber que estas son biomoléculas que están presentes en los seres vivos y forman parte de su metabolismo. Las técnicas colorimétricas para determinar la concentración de proteínas totales en la muestra es el método de Bradford que se fundamenta en las leyes de Beer y Lambert, basadas en la transmitancia y absorbancia de la incidencia de un haz de luz a través de una muestra. Esta metodología también fue utilizada en los trabajos de Escalante y colaboradores y de Kelly Davelois, (2016) (Escalante, Miranda, Lorca, Verastegui, & Torres, S/A)

La cuantificación de proteínas es muy importante, debido a que, si existe una saturación de las mismas, impide la inmunodetección de proteínas antigénicas. En caso de obtener una concentración elevada se debe proceder a homogenizar la muestra. (Karina Martínez, 2017)

El método de Bradford presenta una alta sensibilidad, realizando la lectura de las muestras en un espectrofotómetro. La concentración de proteínas que presentaba la muestra obtenida del líquido de los cisticercos, se determinó mediante la comparación con la curva estándar de Albumina Sérica Bovina, que tenía una concentración inicial de 1 mg/mL.

Las concentraciones de proteínas en las muestras de líquido de *Taenia solium* oscilaron entre 0.019 a 0.053 mg/ dL. La cual se puede evidenciar que la mayor concentración de proteínas se encuentra en la primera extracción del primer día, posterior se observa que las concentraciones pueden variar por diversos factores de los cuales son: la forma de extracción, la ubicación y el tamaño de los cisticercos en la musculatura del porcino, el lavado adecuado de los cisticercos con solución fisiológica y tener en cuenta las causas de la desnaturalización de las proteínas.

4.4. Preparación de la muestra de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*

Tras evidenciar la presencia de las proteínas se procedió a la precipitación de las mismas con TCA (ácido tricloroacético), cuyo mecanismo consiste en la precipitación de proteínas, por el secuestro del agua que está ligada a las mismas; debido a que, el TCA está cargado negativamente e interrumpe las interacciones electrostáticas en la proteína a lo que da lugar a

un estado parcialmente plegado. (i -Ciencias, 2015). Se preparó la muestra del líquido vesicular, siguiendo el protocolo.

✓ **Protocolo María Auxiliadora de Ayuela. Proyecto MAPFRE 2014**

Se trabajó con 50ug de cada muestra se le adicionó una solución precipitante de ácido tricloroacético al 20%, 20 mM DTT en acetona y se incubó a -20°C durante una hora, seguidamente se llevó a centrifugar durante 15 min a 15.000 rpm, para descartar el sobrenadante y se añadió sobre el precipitado 1mL (20 mM DTT en acetona). Posteriormente se centrifugó por 15 min a 15.000 rpm, descartando el sobrenadante y sobre el precipitado se añadió (20mM de DTT en acetona), se llevó a centrifugar por 15 min a 15.000 rpm, al precipitado resultante se le añadió 50uL de solución de rehidratación y luego se añadieron 340 uL de tampón de rehidratación (urea 8M, CHAPS al 2 %, azul de bromofenol 0,002%, 30uL de IPG buffer 0,75% y agua Mili Q 2.5 mL).

Tras preparar la solución de rehidratación se guarda en alícuotas de 2,5 mL a 20 °C, justo antes del uso se añade la cantidad apropiada de tampón IPG de pH igual al que se emplee las tiras IPG. Se utiliza 12.5 uL si se elige una concentración de 0,5% y 18 uL para una concentración de 0,75% se utiliza cuando se pone una cantidad mayor de proteínas o que presente difícil solubilización.

4.5. Electroforesis en primera dimensión

El isoelectroenfoque permite separar proteínas, según su punto isoeléctrico. El análisis se realizó en el equipo Protean i 12, utilizando mezcla de proteínas de concentración de *Escherichia coli* con un valor de 1.35 mg/dL del READYPREP 2-D STARTED KIT y un ladder bidimensional que presenta nueve proteínas con los puntos isoeléctricos determinados, las cuales son: ficocianina 4.45, b-lactoglobina B 5.1, anhidrasa carbonica bovina 6.0, anhidrasa carbonica humana 6.5, mioglobina equina dos bandas 6.8 y 7.0, hemoglobina humana A 7.1, hemoglobina humana C 7.5, lentil lectina 3 bandas 7.8, 8.0 y 8.2; y citocromo C 4 bandas 9.6.

La solución de rehidratación se fracción en alícuotas de 2.5mL a 20°C y para su uso se añadió tampón IPG, posteriormente se procedió a disolver la muestra en 50 uL de tampón de solubilización y luego se añadieron 7mg de DTT. Los volúmenes varían, por tanto se deben

añadir según el tamaño de la tira que se utilizara. 7cm para 125uL, 11cm para 200 uL, 13cm para 250uL, 18cm para 340uL y 24cm para 450 uL.

La mezcla fue llevada a shaker por 2 horas a temperatura ambiente para favorecer la solubilización de las proteínas y luego se llevó a centrifugar durante 5 min. Las tiras de papel filtro fueron humedecidas, para colocarlas en los sarcófagos, cubriendo los electrodos de 3 mm y luego se pusieron 340 uL de mezcla en el sarcófago. Luego se colocaron las tiras IPG y se cubrió con aceite mineral, esto para evitar la deshidratación de la muestra, cabe mencionar que la rehidratación se efectuó en el aparato de Ettan IPGphor durante 12 horas a 20°C y un voltaje de 50 V. Las tiras entre rangos de pH 4-7 presentan los siguientes pasos de cambio de voltaje, en caso de que la muestra presente proteínas que están en la tabla N° 2.

Tabla N° 2

Tiempo y voltaje de las muestras en el equipo de electroforesis bidimensional.

VOLTAJE	TIEMPO
50V	12 h
150V	1h
500V	1h
1000V	1h
2000V	1h
8000V	8h y 30min

Nota. Datos tomados del programa del equipo de electroforesis bidimensional 2D en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

✓ **Equilibrado de las tiras IPG**

Para el equilibrado de tiras IPG, se preparó el tampón de equilibrado (2% SDS, 50mM Tris HCL pH 8.8 M, 6M urea, 30 % glicerol, 0,002% azul de bromofenol). El paso siguiente fue la incubación de las tiras IPG, adicionando 10 mL del preparado y 100mg de DTT, durante

20 min y posterior se incubó durante 30 min con la solución de equilibrado y la adición de 300 mg de iodoacetamida.

Las tiras de IPG se transfirieron a los geles de acrilamida al 15% y piperazina, con una dimensión de 100 x 75x 1 mm, 16mA y aumentando 30mA. El tiempo de corrida de las proteínas, de acuerdo a la migración completa.

Se lavó las tiras en agua Mili Q y se colocó sobre el frente del gel SDS PAGE, se debe sellar con la solución de agarosa de forma que queden en perfecto contacto la superficie de las tiras con el gel.

4.6. Electroforesis en segunda dimensión

La electroforesis SDS- PAGE monodimensional nos permitió elegir el uso de la muestra de líquido obtenida del primer día de extracción para la separación de proteínas por Electroforesis bidimensional; sin embargo, no existieron variaciones en la presencia de proteínas de las muestras obtenidas.

Para la electroforesis en segunda dimensión también utilizamos estándares proteicos únicos que proporcionan referencias calibradas para el pI y el peso molecular de las proteínas en las aplicaciones 2-D SDS-PAGE, las cuales son: siete proteínas reducidas y desnaturalizadas (albumina, BSA, actina muscular bovina, GAPDH, anhidrasa carbónica, inhibidor de la tripsina y mioglobina equina) que pueden ser visualizadas con colorante azul de plata o Coomassie.

Cabe mencionar que la electroforesis vertical también fue optimizada junto con el isoelectroenfoque 2D y se realizó la corrida por separado de las muestras de líquido vesicular de los cisticercos en el equipo de electroforesis vertical, en su forma nativa y reducida con β -mercaptoetanol. El β -mercaptoetanol es un agente reductor que actúa sobre los enlaces de disulfuro de las proteínas a grupos sulfidrilo, permitiendo así el despliegue completo de una proteína y separar las subunidades proteicas, para que la movilidad de las proteínas sea acorde con su peso molecular. Por lo que podemos confirmar que la acción del β -mercaptoetanol no fue tan eficaz, posiblemente debido a que el tiempo de exposición al agente reductor fue mínima.

✓ Preparación del gel SDS-PAGE al 15 %

Se preparó los geles SDS-PAGE al 15%, para lo cual se pesó 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida en una balanza analítica y se diluyó en 100 mL de agua Mili Q, para obtener agua Mili Q se procedió a esterilizar el agua destilada en una autoclave.

Luego se preparó el tampón Resolving Tris -HCl pH 8.8, pesando 181.7 g de Tris base diluido en 750 mL de agua Mili Q y se procedió al armado de la cámara de electroforesis y se colocaron los vidrios para preparar el gel separador, en la tabla N° 3 muestra el protocolo del gel separador.

Al evidenciar la polimerización del gel SDS- PAGE al 15% se preparó el gel stacking con los siguientes reactivos que presenta en la tabla N° 4 y se colocó el peine para formar los carriles de corrida de las muestras.

Tabla N° 3

Protocolo del gel separador.

Reactivos	Volumen
Acrilamida 30%	6.37 mL
Tampón Resolving	4.15 mL
SDS 10%	150 uL
Agua Mili Q	3.675 mL
PSA 10%	75uL
TEMED	16.6 uL
Piperazina	0.612 mL

Nota. Datos propios obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

Tabla N° 4

Protocolo gel stacking.

Reactivos	Volumen
Agua	1.2 mL
Acrilamida/ Bisacrilamida	0.3mL
Buffer STACKING	0.5mL
PSA	14.5uL
TEMED	6uL
SDS 10%	46uL

Nota. Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

Los geles se polimerizaron a temperatura ambiente, luego se procedió a preparar las muestras con la solución de cargado, para la corrida electroforética, que presenta la figura N° 5.

Tabla N° 5

Soluciones de cargado para la corrida electroforética de proteínas.

Reactivos	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Solución STACKING 0.5 M pH 6.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 MI
SDS al 10%	4.0 mL	2.5 mL	4.0 MI
Glicerol	1.0 mL	2.5 mL	1.0 mL
Azul de bromofenol	2.0 mg	1 mg	2.0 mg
DTT	0.31 g		
β-mercaptoetanol		2.5 mL	

Nota. Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

Para obtener el perfil proteico de las muestras de líquido de los cisticercos. Las muestras fueron evaluadas en diferentes condiciones nativas y reductoras, adicionando β -mercaptoetanol, DTT y sometidas al calor de 100°C por 5 min. Las muestras se mezclaron en volúmenes iguales con buffer de cargado, los geles se corrieron a 100 V y al finalizar la corrida se tiñeron los geles con azul de Coomassie R 250.

- **Western blot**

Se empleó el gel sin teñir y se colocó en el soporte de papel de nitrocelulosa; utilizando el equipo de I Blot 2 de la línea INVITROGEN, con las siguientes condiciones de electrotransferencia, de la tabla N° 6.

Tabla N° 6

Condiciones de electrotransferencia aplicadas en el equipo de I BLOT 2.

PASOS	Step 1	Step 2	Step 3
Tiempo	01:00	08:00	02:00
Voltaje	20V	23V	25V

Nota. Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

Una vez realizada la transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa, se procedió a bloquear la membrana con una solución bloqueante que es la solución de leche desnatada al 1% en buffer PBS 1x, por un tiempo de 1 a 2 horas en temperatura ambiente. Luego se procedió al lavado de la membrana con PBS – TWEEN por 15 min en agitación, este procedimiento se repitió tres veces.

Posteriormente se obtuvieron las muestras de suero de pacientes positivos a cisticercosis, diagnosticados por el método inmunológico ELISA, que fueron suministradas por el Laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS de la Universidad Mayor de San Andrés del departamento de La Paz y se añadió el suero diluido en 1/300, a una solución de PBS –

TWEEN y leche desnatada a 0.1%., volviendo a lavar la membrana PBS – TWEEN por 15 min en agitación, este procedimiento se repitió tres veces.

Después se procedió a la adición del conjugado de dilución 1/3500 con PBS- TWEEN y leche desnatada a 0,1% y se incubó de 2 a 3 horas en shaker y se volvió a lavar la membrana con PBS – TWEEN por 15 min por tres veces y dos lavados con PBS 1x cada 10 min. Finalmente se realizó el revelado con la solución de diaminobencidina (diaminobencidina 0,05g, solución de PBS 1x 100 mL y agua oxigenada 100mL), el procedimiento se realizó cubierto de la luz.

5. RESULTADOS

5.1. Cuantificación de proteínas

Las concentraciones de las proteínas del líquido vesicular de cisticercos, que obtuvieron por el método de Bradford, oscilaron entre 0.019 a 0.053 mg/ dL; de las cuales, la muestra 2.3 presento una concentración menor, debido a una degradación, que podemos ver en la tabla N° 7.

Tabla N° 7

Concentración de proteínas totales de líquido vesicular de cisticercos.

Días de obtención de muestra	Códigos	Concentración de proteínas mg/dL
Primer día	1.1	0.04
	1.2	0.035
	1.3	0.043
Segundo día	2.1	0.042
	2.2	0.021
	2.3	0.019 (*)
Tercer día	3.1	0.053
	3.2	0.035

Muestras con indicios de descomposición. (*)

Nota. Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS

5.2. Electroforesis bidimensional 2D

- **Electroforesis en primera dimensión (isoelectroenfoque)**

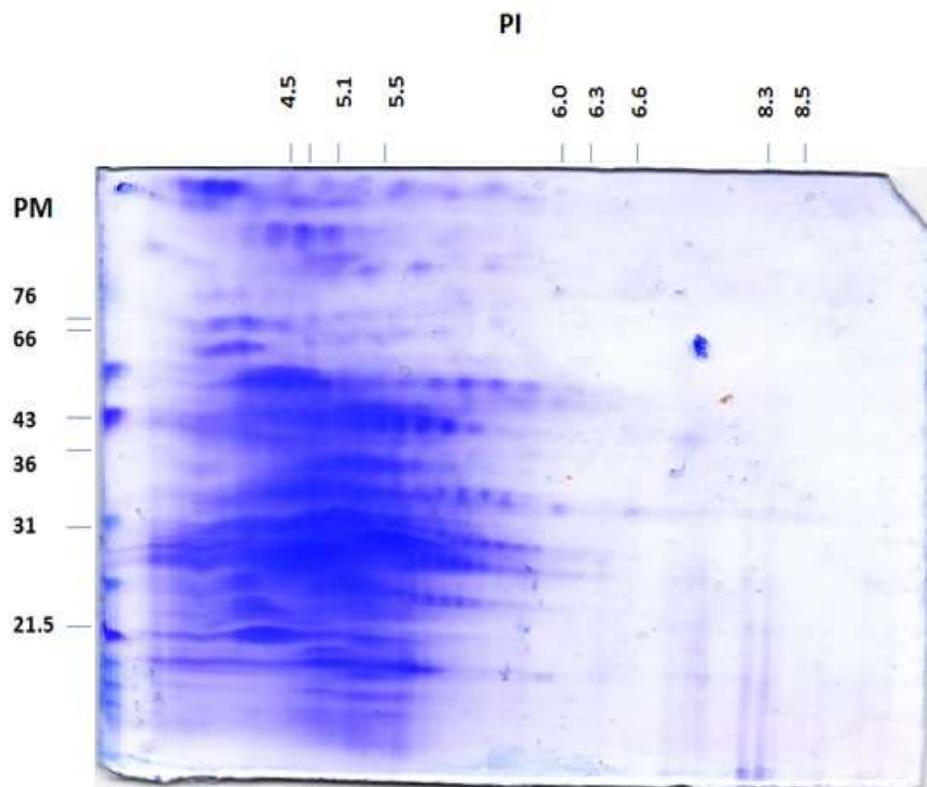
El proceso de optimización de electroforesis en primera dimensión se realizó con los estándares utilizado mezcla de proteínas de *Escherichia coli*, ladder 2-D y posteriormente la aplicación las condiciones de corrida para obtener el patrón de proteínas dirigida al líquido vesicular de *Taenia solium*.

- **Proteínas de *Escherichia coli* teñidas con azul de Coomassie R-250**

Tras la corrida de la muestra en el equipo de IEF se obtuvo el patrón proteico de las proteínas de *Escherichia coli* las tiras de IPG y posterior se transfirió a los geles poliacrilamida SDS-PAGE con piperazina, utilizando las condiciones de separación ya descritas, se obtuvo la agrupación de las fracciones proteicas entre los puntos isoelectricos (PI de 3.0 a 6.0) entre los pesos moleculares de 66 a 10 kDa, visualizada con la tinción de azul de Coomassie R-250, presente en la figura N° 4.

Figura N° 4

Perfil proteico de *Escherichia coli*, en geles de SDS – PAGE.



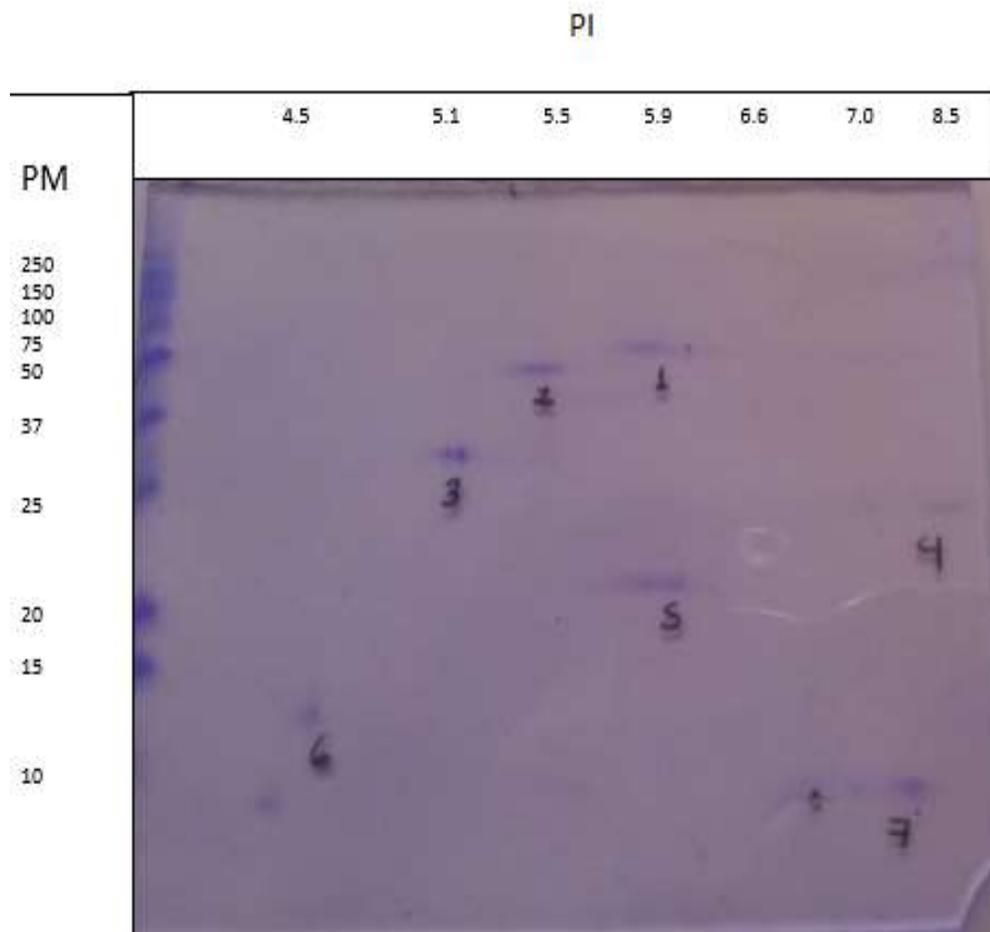
Nota. Imagen obtenida en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

- **Proteínas del estándar 2-D teñidas con azul de Coomassie R-250**

A fin de establecer las condiciones de isoelectroenfoque se evaluó la separación del procedimiento con el estándar bidimensional de la línea BIORAD figura N° 5.

Figura N° 5

Proteínas del estándar 2 –D.



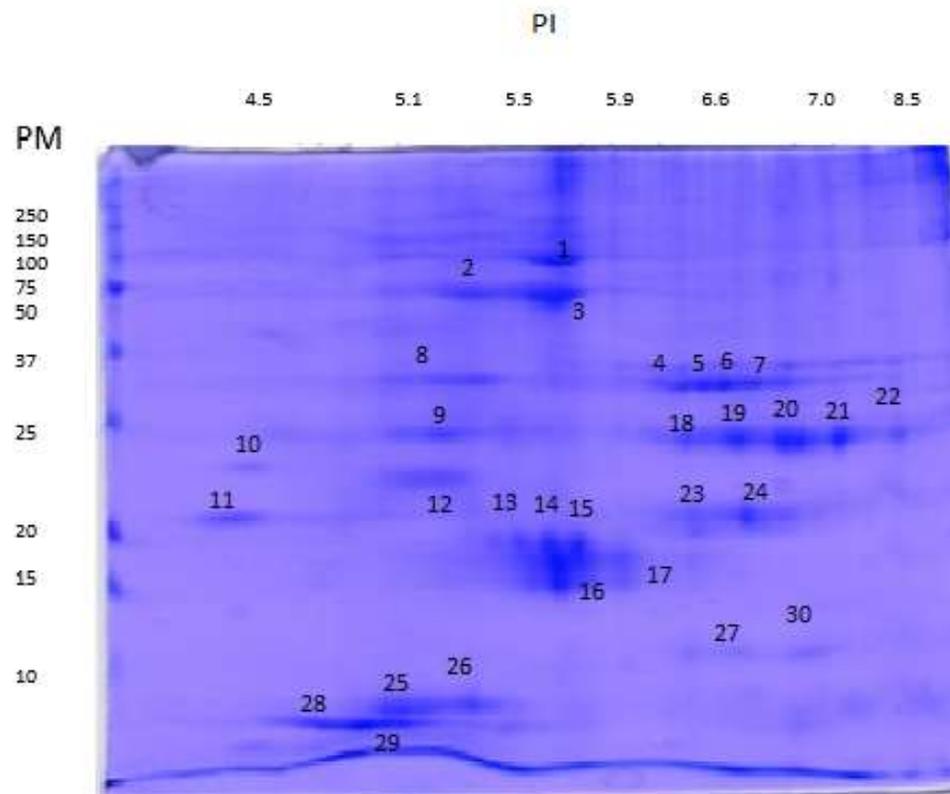
Nota. Imagen obtenida en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

- **Patrón proteico para líquido vesicular de cisticercos de *Taenia solium***

Las proteínas presentes en el líquido vesicular, fueron separadas de acuerdo a su punto isoelectrico y peso molecular usando tiras IPG de rango de pH 3 a 10 y electroforesis 2-D (gel al 15 %), en el cual se evidenció la presencia de aproximadamente 30 spots de proteínas en el rango pH de 3 a 10, presentes en la figura N° 6.

Figura N° 6

Patrón de electroforesis bidimensional 2D en geles de acrilamida SDS- PAGE y piperazina.



Nota. Imagen obtenida en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

Con la identificación de las proteínas presentes en el líquido vesicular de los cisticercos, las proteínas halladas en el líquido vesicular tienen un peso de 75 a 7 KDa y puntos isoeléctricos de 4.0 a 7.0, presentes en la tabla N° 8.

Tabla N° 8

Proteínas halladas en líquido vesicular.

No	Peso molecular	PI	No	Peso molecular	PI	No	Peso molecular	PI
1	75	5.7	11	22	4.0	21	25	7.0
2	50	5.3	12	23	5.1	22	25	8.3
3	50	5.3	13	20	5.5	23	21	6.4
4	32	6.2	14	20	5.6	24	21	6.7
5	32	6.4	15	20	5.7	25	8	5.1
6	32	6.6	16	15	5.8	26	8	5.3
7	32	6.8	17	15	5.9	27	13	6.7
8	32	5.1	18	25	6.4	28	7	4.7
9	25	5.1	19	25	6.7	29	7	5.1
10	24	4.5	20	25	6.9	30	14	7.0

Nota. Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

5.3. Electroforesis monodimensional

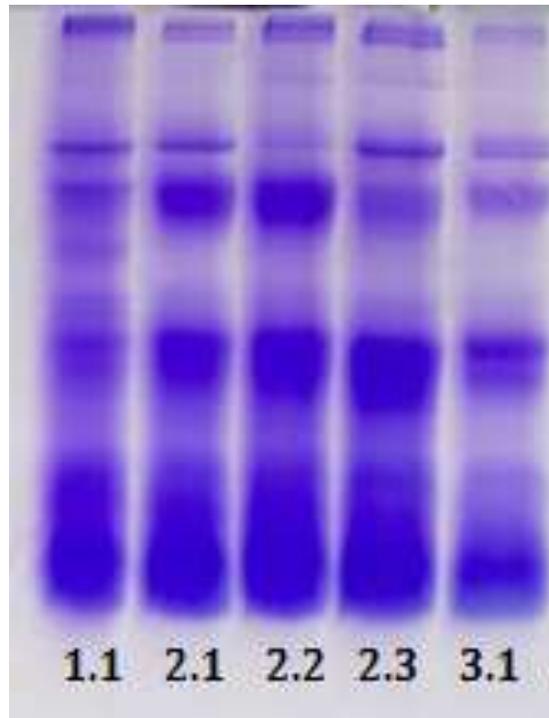
Al realizar la electroforesis monodimensional de proteínas, tanto en condiciones nativas de la figura N° 7 y la forma reducida que se presenta en la figura N° 8, nos permitió determinar la existencia de similitudes o variaciones en el perfil proteico de cada muestra, que pudieron deberse al tiempo de colecta y/o al efecto de la descongelación y congelación experimentada. Se escogieron solo cinco muestras para esta comparación.

En cuanto a las muestras de líquido vesicular en condiciones nativas, se observó un patrón electroforético similar en casi la totalidad de las muestras, con la presencia de cinco grupos

de bandas nítidas de tamaño aproximado de 100, 75,40, 35 y 20 kDa; otras no representativas, que son de menor tamaño posiblemente debido a degradación de la muestra.

Figura N° 7

Gel SDS – PAGE al 15% de proteínas, en condiciones nativas.



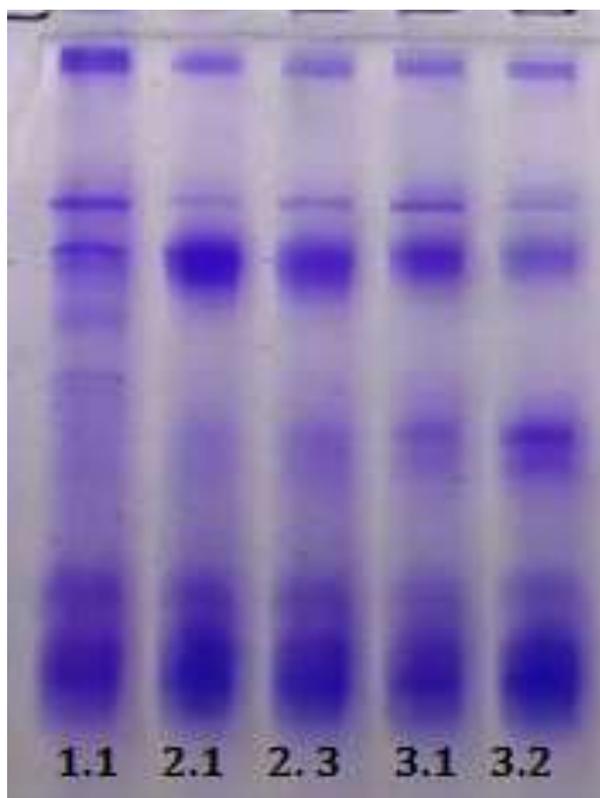
Nota. Imagen obtenida en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

En las condiciones reducidas (con β -mercaptoetanol) (Figura N° 8), presento un perfil similar a las condiciones nativas, solo con la diferencia de presentar mayor concentración en bandas proteicas de bajo peso molecular. Por lo que podemos confirmar que la acción del β -mercaptoetanol no fue eficaz, posiblemente debido a que el tiempo de exposición al agente reductor fue mínima.

Las muestras extraídas en diferentes días no presentaron variación a simple vista en la presencia de estos cinco grupos de proteínas.

Figura N° 8

Gel de SDS – PAGE al 15% en condiciones reducidas con β - mercaptoetanol.



Nota. Imagen obtenida en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

5.4. *Western blot*

Para el análisis de las proteínas antigénicas se trabajaron con cinco sueros de pacientes positivos a cisticercosis, en la figura N° 9 presenta los resultados de los pacientes diagnosticados por ELISA, muestras que el laboratorio de Parasitología de Instituto SELADIS nos proporcionó.

Para el análisis del *Western blot*, escogimos cinco sueros positivos de pacientes con cisticercosis con ISR mayor a 2.1.

Tabla N° 9

Resultado de pacientes positivos por el método de ELISA.

N°	Genero	Edad	
1	Masculino	67	2.1
2	Masculino	67	2.1
3	Femenino	36	5.1
4	Masculino	42	4.6
5	Masculino	56	4.2

Nota. Datos seleccionados en el Laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS.

Se encontraron proteínas con características antigénicas, de la tabla N° 10, presenta que antígenos proteicos reaccionaron frente a los anticuerpos IgG; las proteínas encontradas fueron cinco con pesos moleculares similares de 25 kDa y diferente punto isoeléctrico, que se observa en la figura N° 9.

Tabla N° 10

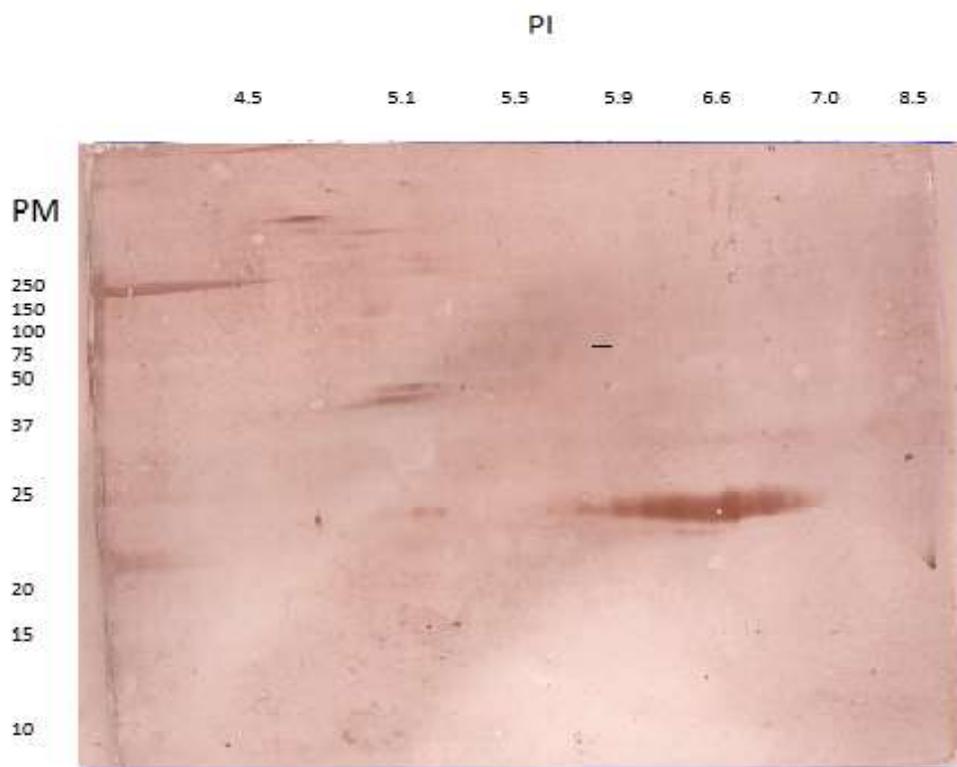
Proteínas antigénicas encontradas por el método de *Western blot*.

N°	Peso Molecular (kDa)	PI
1	25	6.4
2	25	6.7
3	25	6.9
4	25	7.0
5	25	8.3

Nota. Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

Figura 9

Resultado del *Western blot* 2D.



Nota. Imagen obtenida en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto SELADIS.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de la cuantificación de las proteínas antigénicas del presente estudio, muestran que las concentraciones de los antígenos nativos totales extraídos de los cisticercos de *Taenia solium*, oscilaron entre 0.019 a 0.053 mg/ dL, logrando observar que estos valores de concentración que obtuvimos son muy bajos, en comparación al estudio de Kelly Davelois (2016), indica que la concentración óptimas de los antígenos para el desarrollo de la prueba deberían estar en una concentración de 0,035 ug/uL, sin embargo la concentración de los antígenos que obtuvimos en la prueba colorimétrica de Bradford fue entre los rangos de 0,00019 ug/uL - 0,00053 ug/uL, como se puede apreciar las concentraciones más baja fue del segundo día con un valor de 0,00019 ug/uL, esto nos puede indicar que probablemente se deba a la extracción del líquido vesicular de la carne de cerdo, que posiblemente estaba empezando en un estado de putrefacción, ya que la carne estaba empezando a presentar un olor, por la descomposición de aminoácidos que resulta en una variedad de subproductos que se detectan organolépticamente.

Cabe mencionar que la carne de cerdo fue almacenada en un envase de plastroforno con hielo desde el momento de la llegada a laboratorio, lo cual posiblemente, no mantuvo la carne fresca en su totalidad, por lo que la degradación cárnica fue avanzando conforme los días. Por lo que optamos por tomar las muestras por tres días, ya que notamos que la vesículas de *Taenia solium* presentaban una coloración roja, de la cual no se tomaron las muestras.

Según Luzardo (2017), indica que existen tres mecanismos para el deterioro de la carne luego de la faena y durante su procesamiento y almacenamiento los cuales son: el deterioro por contaminación microbiana, que proviene del lugar del faenado y el medio de transporte de la carne, los cuales incrementa el desarrollo de los microorganismos por el pH, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y la disponibilidad del oxígeno; otro factor es la oxidación lipídica y la pigmentación que se origina por autooxidación, fotooxidación y mecanismos de oxidación enzimática y por último el deterioro enzimático autolítico. Lo cual se debe tomar en cuenta al obtener carne para extraer proteínas antigénicas de interés.

En el estudio de Ayala y Miranda (2015), nos indica que a mayor concentración de antígeno total existe mayor concentración de antígeno nativo purificado, no obstante, podemos indicar que a pesar de obtener la mínima concentración de proteínas en las muestras de

líquido vesicular se logró encontrar una cantidad considerable de antígenos proteicos, que son posibles candidatos para el diagnóstico de cisticercosis.

El resultado de la figura N° 4, presenta el patrón proteico de *Escherichia coli* entre los rangos de puntos isoelectricos de 3.0 – 6.0 y pesos moleculares de 10 a 66 KDa, según Biorad (S/A), la imagen del gel presenta rayas verticales en blanco, esto posiblemente se deba a las burbuja de aire atrapada en la agarosa, el fondo difuso e irregular que presenta el gel puede ser debido a un lavado insuficiente, cuando se realizó la tinción con azul de coomassie.

La corrida de la muestra tiene el propósito de probar el buen funcionamiento del sistema completo, tanto en el isoelectroenfoque en primera dimensión y la electroforesis vertical que es la segunda dimensión, en los estudios de (Monroy, Alarcon, & Dura, 2003) se evidencia que también se trabajó con las proteínas de *Escherichia coli* con un peso molecular de un rango de 15 - 115 KDa y sus puntos isoelectricos van de 5.0 a 8.5, obteniendo resultados aproximados. La imagen de nuestro trabajo en comparación con el estudio de Monroy & col. (2003), utilizaron una concentración de 120ug de *Escherichia coli* y en nuestro caso fue de 1.35 mg/dL, lo que nos indica que colocamos una concentración mayor, por lo que creemos que posiblemente, la concentración de la muestra de *Escherichia coli* fue elevada, por lo que pueda ser otro de los factores para que el gel presente manchas borrosas, difusas, que impide observar las proteínas con claridad.

Según el manual del equipo de IEF PROTEAN i 12 Biorad, para optimizar el equipo se debe realizar la corrida con los estándares establecidos, como indicamos son proteínas conocidas, de *Escherichia. coli* y posteriormente, realizamos la comparación con los resultados del patrón, para finalmente aplicar las mismas condiciones de corrida y encontrar el patrón proteico del líquido vesicular de *Taenia solium* de nuestro trabajo.

Tanto en la tabla N° 8 y la figura N° 6, muestran el patrón proteico del líquido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*, obtenidas por isoelectroenfoque bidimensional, donde encontramos aproximadamente 30 spots de proteínas de secreción y excreción del parasito con los pesos moleculares de (GPC: 75, 50, 32, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 15, 14, 13, 8, 7 KDa) y diferentes puntos isoelectricos.

Comparando con el estudio realizado por Kelly Davelois (2016) se observa que obtuvieron ocho antígenos de excreción/secreción de *C. cellulosa* para cisticercosis, con pesos moleculares de (GPC: 35, 31, 24, 23, 18, 17, 14, 13 KDa), los cuales se puede evidenciar que presentan los mismos resultados, tanto en el trabajo realizado por Ayala & Miranda (2015) y el trabajo de Kelly Davelois (2016), del cual comparando con nuestros resultados, verificamos que si existe una similitud en cuatro proteínas antigénicas las cuales son: 24, 23, 14 y 13 KDa, tanto en los resultados de Kelly Davelois (2016) y Ayala & Miranda (2015) identificaron los mismos antígenos proteicos. En los datos teóricos encontrados de proteínas antigénicas de *Taenia solium*, también nos llamó la atención, que existe la misma similitud con el estudio de Escalante & Verastegui (SA), donde encontraron nueve bandas antigénicas con los pesos moleculares de (42, 35, 24, 23, 18, 17, 14 y 13 kDa) y también existe la misma presencia de las cuatro proteínas antigénicas las cuales son: 24, 23, 14 y 13 KDa.

Según la Organización Panamericana de La Salud (OPS) recomienda como diagnóstico de la neurocisticercosis al ensayo de EITB, usando siete glicoproteínas de metacestodo de *Taenia solium* las cuales son: (GP50, GP42-39, GP24, GP21 GP18, GP14 y GP13) que fueron purificadas por la cromatografía de afinidad. En la figura N° 6 se aprecia que obtuvimos la mayoría de las proteínas antigénicas para el diagnóstico de cisticercosis los cuales menciona la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que son: (GP 50, 24, 21, 14, 13 KDa).

Las proteínas antigénicas obtenidas, con los pesos moleculares de 50, 24, 14, 13 KDa, están descritas en la guía de Larralde (2006) y son para la detección de anticuerpos en suero, saliva y líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis y cisticercosis porcina, detección de casos con teniasis, detección de personas expuestas al parásito, localización de las glicoproteínas antigénicas durante diferentes estadios parasitarios y durante la inflamación, proliferación específica de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con NC, evaluación de la contribución de los carbohidratos a la antigenicidad y la descripción de los componentes bioquímicos de las diferentes fracciones glicoproteínas. Lo cual nos indica que los resultados hallados son de un elevado valor, para diagnóstico y considerando que en nuestro país no hay estudios relacionados.

En el resultado de la Figura N° 7 y N°8, nos muestra el grupo de proteínas antigénicas del líquido de cisticercos de *Taenia solium*, de la corrida electroforética vertical en geles de

poliacrilamida SDS – PAGE al 15%, para tal efecto, las muestras se procesaron en condiciones nativas y reducidas con β mercaptoetanol, esto con la finalidad de permitirnos conocer la existencia de similitudes o variaciones en el perfil proteico de cada muestra, que posiblemente pudieron deberse al tiempo de colecta o al efecto de la descongelación y congelación experimentada por las muestras del líquido de cisticercos de *Taenia solium*.

En cuanto a las muestras de líquido vesicular en condiciones nativas, se observó un patrón electroforético con una bandas que están más concentradas, esto posiblemente a que las muestras no fueron reducidos por agentes químicos, sin embargo se puede apreciar cinco grupos de bandas de tamaño aproximado de 100, 75,40, 35, 20 kDa, existió también otras proteínas no representativas, que son de menor tamaño posiblemente debido a degradación de la muestra.

En las condiciones reducidas (con β -mercaptoetanol) que está en la figura N° 8, presento un perfil similar a las condiciones nativas, solo con la diferencia de presentar mayor nitidez de las bandas proteicas y una concentración mayor en bandas proteicas de bajo peso molecular. Por lo que podemos confirmar que la acción del β -mercaptoetanol fue eficaz casi en su totalidad. Las muestras extraídas en diferentes días no presentaron variación a simple vista en la presencia de estos cinco grupos de proteínas.

Para el análisis del *Western blot* de las proteínas antigénicas se trabajaron con cinco sueros de pacientes positivos a cisticercosis, diagnosticados por ELISA, datos que fueron seleccionados en el Laboratorio de Parasitología del Instituto SELADIS, en la Tabla N° 9, muestra los resultados de pacientes positivos por el método de ELISA, de los cinco datos obtenidos los pacientes en su mayoría son del género masculino y una sola paciente femenina, con un rango de edad entre 36 – 67 años, que presentaron un índice de reactividad de 2.1 a 5.1.

En la tabla N° 10 se observa la presencia de proteínas con características antigénicas que reaccionaron frente a los anticuerpos IgG; las proteínas encontradas fueron cinco con pesos moleculares similares de 25 kDa y diferentes puntos isoeléctricos (6.4, 6.7, 6.9, 7.0, 8.3) que muestra la figura N° 9, por lo que estas proteínas inmunogénicas son posibles candidatas, para el diagnóstico de cisticercosis por la técnica de *Western blot*. En el trabajo de Zimic (2009) se purificaron las fracciones proteicas a partir del líquido de cisticercos con pesos

moleculares de 35 y 25 KDa, ambas presentaron una actividad similar a la catepsina L y estos antígenos se utilizaron para el diagnóstico humano de cisticercosis por *Western blot*, con una sensibilidad 98 % y una especificidad de 96% en pacientes con múltiples quistes y una sensibilidad de 78% en pacientes con un solo quiste. Nancy León (2013).

Con los antecedentes encontrados podemos indicar que las proteínas antigénicas para el diagnóstico de cisticercosis, también podrían ser propias del lugar, como menciona el trabajo de Ayala & Miranda (2015), debido a que utilizaron un antígeno mix nativo purificado de líquido de cisticercos de *Taenia solium* para el diagnóstico de cisticercosis humana, para realizar la prueba de EITB, que presentó una sensibilidad de 100% y una especificidad al 100%, comprobando así que estamos al alcance de realizar kits in house para estudios con antígenos nativos mix de regiones endémicas con la finalidad de mejorar la eficiencia del diagnóstico, cabe mencionar que la prueba también es eficaz para pruebas simultáneas de anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana, y puede ser utilizada como prueba de descarte o confirmatoria en zonas endémicas como menciona en el trabajo de Kelly Davelois (2016), obteniendo una sensibilidad de 96% y una especificidad de 100%. Otro de los trabajos que respalda nuestro estudio es el trabajo de Hermes, Miranda & otros (S/A) el cual presenta una sensibilidad de 91% y una especificidad al 100% para el diagnóstico de cisticercosis.

7. CONCLUSIONES

Al ser el objetivo fundamental de la tesis optimizar el uso del *Western blot* como técnica inmunoproteómica para la identificación de proteínas antigénicas con fines de diagnóstico de cisticercosis, se logró el objetivo planteado, debido a que, pudimos encontrar proteínas antigénicas del líquido vesicular de *Taenia solium* reactivas al anticuerpo del paciente positivo a cisticercosis, utilizando la combinación de las herramientas proteómicas.

Se concluye que en esta tesis las combinaciones de técnicas proteómicas pueden aportar de gran manera al estudio detallado de las proteínas antigénicas nativas que posee un parásito, en nuestro caso la *Taenia solium*, para fines de diagnóstico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ADN SURESTE. (6 de Febrero de 2017). Recuperado el 4 de Abril de 2022, de ADN SURESTE: <https://www.adnsureste.info/50-de-casos-de-adultos-que-inician-con-epilepsia-en-mexico-se-debe-a-la-cisticercosis-2200-h/>
- Aguirre, A. Y. (2017). Deteccion de microRNAs predichos para *Taenia Solium* en muestras del parasito y sus hospederos. 1-51. Lima, Peru. Recuperado el Marzo de 23 de 2022, de https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/939/Deteccion_YupariAguirre_Ayme.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Alares, I. M. (29 de Enero de 2020). *Madrid*. Recuperado el 9 de Marzo de 2022, de Segurida Alimentaria y Alimentacion Centro de Vigilancia Sanitaria (VISAVET) U.C.M.: <https://www.madrimasd.org/blogs/alimentacion/2020/01/29/131984>
- Alberto Orfao, J. B. (2019). *Ciencias Omicas*. Fundacion Instituto Roche, Madrid. Recuperado el 12 de Junio de 2021, de https://www.institutoroche.es/static/archivos/Informes_anticipando_CIENCIAS_OMICAS.pdf
- Antonio, M. N., & Antonio, L. F. (30 de Noviembre de 2016). *Electroforesis: fundamentos avances y aplicaciones*. Recuperado el 2 de Julio de 2021, de <file:///C:/Users/Carmen/Desktop/PROTEOMICA/96-Texto%20del%20art%C3%ADNarticulo-149-1-10-20200131.pdf>
- Ayala, E., & Miranda, E. (2015). Evaluación de Electroinmunotransferencia utilizando antígeno mix nativo purificado de líquido de cisticerco de *Taenia solium* para el diagnóstico de cisticercosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. Recuperado el 27 de junio de 2022, de <https://rpmesp.ins.gob.pe/rpmesp/article/view/1678/1765#:~:text=Sus%20prote%C3%ADnas%20antig%C3%A9nicas%20espec%C3%ADficas%20m%C3%A1s,ant%C3%ADgenos%20del%20cisticerco%20de%20T>.
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., & Roosens, N. H. (2013). Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for

- detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 4021 - 4037.
- BD . (agosto de 2003). *BD Instruccion de uso – medios en frascos listos para usar*. Recuperado el 12 de abril de 2023, de <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/hb/ce/ba/es-ba-257204.pdf>
- Biorad. (S/A). Flujo de trabajo de electroforesis 2D. 4(2651), 72. Recuperado el 24 de Junio de 2024, de www.bio-rad.com/2DeElectroAnalysis
- Biorad. (S/A). *Protean IEF cell instruccion manual*. Recuperado el 15 de julio de 2024, de www.bio-rad.com
- Callastegui, C. y. (2022). Recuperado el 4 de junio de 2023, de <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP11.pdf>
- Cardenas Garcia, C., Martin Rufian, M., & Lobo Garcia, C. (2016). *scai uma.es Proteomica*. Recuperado el 23 de Agosto de 2021, de *scai uma.es Proteomica*: <https://www.scai.uma.es/areas/ccvi/pro/pro.html>
- Carlos Zapata, S. V. (2017). Neurocisticercosis racemosa (sic), diagnostico orientado por neuroimagenes. *Biomedica Revista del Instituto Nacional de Salud*, 26-32.
- Chile, I. d. (2020). *Resultados de casos confirmados por Laboratorio de cisticercosis por infeccion con Taenia solium Chile 2011-2019*. Instituto de Salud Publica de Chile. Recuperado el 17 de Marzo de 2022, de https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnCisticercosis-3oct2020_FINAL.pdf
- Escalante, H., Miranda, E., Lorca, M., Verastegui, M., & Torres, P. (S/D de S/M de S/A). *La técnica de «Western blot» con antígenos de fluido vesicular de Cysticercus cellulosae para el diagnóstico de la cisticercosis*. Recuperado el 24 de junio de 2022, de https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/parasitologia/v11_n1/pdf/a07v11n1.pdf
- Institute, N. H. (1 de marzo de 2023). *National Human Genome Research Institute*. Recuperado el 2 de marzo de 2023, de www.genome.gov

- Instituto Claret. (2020). *Guía-Desnaturalizando-proteínas-3º-Biología-Celular-y-molecular-17-a*. Recuperado el 1 de junio de 2023, de <https://institutoclaret.cl/wp-content/uploads/2020/08/Gu%C3%ADa-Desnaturalizando-prote%C3%ADnas-3%C2%B0-Biolog%C3%ADa-Celular-y-molecular-17-al-28-de-agosto-2020.pdf>
- Julio Giraldo, D. C. (2016). Sintomatología asociada a Neurocisticercosis en personas de área urbana y periurbana del municipio de coyaima del departamento de Tolima y posibles variables asociadas. *Revista Med*, 8-22.
- Kelly Davelois, H. E. (2016). Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. *Revista peruana de Medicina experimental y Salud Pública*, 10. Recuperado el 24 de Mayo de 2022, de <https://rpmpesp.ins.gob.pe/index.php/rpmpesp/article/view/523/529>
- Larralde, C., & S. de Aluja, A. (2006). *Cisticercosis guía para profesionales de la salud* (Vol. Primera Edición). Mexico. Recuperado el 23 de octubre de 2022
- Leòn, K. d. (2016). Aplicación de herramientas bioinformáticas para la clasificación taxonómica de *Taenia solium* y *Taenia saginata*, para el diagnóstico clínico de Neurocisticercosis. *Revista Parasitología Latinoamericana*, 62.
- Luzardo, B. (2017). *Vida útil de la carne: influencia del envasado y sistema de producción*. Recuperado el 27 de junio de 2024, de Sitio Argentino de Producción Animal: https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/198-LUZARDO-BUIATRIA.pdf
- Maldonado Alconada, A. M., Echeverría Zomeño, S., González, R., & Vázquez, J. (Febrero de 2010). Proteómica. (SEPROT, Ed.) *Revista de la Sociedad española de proteómica*(5), 1-178. Recuperado el 27 de Julio de 2021, de http://www.seprot.es/wp-content/uploads/2016/05/Proteomica_Vol5.pdf
- Miranda, E., Sandoval, R., Eduardo, A., & Vaquez, J. (11 de junio de 2014). Evaluación de las pruebas dot blot y aglutinación de látex para el diagnóstico de cisticercosis en Per

- ú. *Rev Perú Med Exp Salud Publica*, 297-301. Recuperado el 13 de julio de 2022, de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v31n2/a17v31n2.pdf>
- Monroy, R., Alarcon, F., & Dura, G. (2003). *Estandarización de la Electroforesis Bidimensional para la Determinación de Albúmina S-Nitrosada*. Mexico. Recuperado el 22 de junio de 2024, de <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=14317&docs=UAMI14317.PDF>
- Murillo, A., Ponce, J., Zavala, A., & Solorzano, N. (20 de marzo de 2019). Epidemiología y diagnóstico en Latinoamérica de *Taenia solium*. *Polo del conocimiento*, 56(3), 2617-2646. doi:10.23857/pc.v6i3.2707
- Myriam Consuelo, L. P., Augusto, C. A., & Ruben, N. O. (2006). *Atlas de Parasitología*. Bogota, Colombia: El Manual Moderno Colombia Ltda. Recuperado el 24 de Marzo de 2022, de <http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/0539.%20Atlas%20de%20parasitolog%C3%ADa.pdf>
- Nancy Leon, C. P. (2013). Cisteinoproteasas cathepsinas L de *Taenia solium* rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis. *Rev. Peru Med Exp Salud Pública*, 446-452.
- Néstor Gerardo, F. (2006). *Efecto de la edad en un modelo de infección experimental de cisticercosis porcina*. Recuperado el 23 de agosto de 2022, de chrome-extension://efaidnbnmnibpcjpcglclefindmkaj/https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1250/Falcon_pn.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- OMS, & OPS. (2019). *Pautas operativas para las actividades de control de teniasis y la cisticercosis causadas por la Taenia solium*. Washington D. C. Recuperado el 3 de Mayo de 2022, de <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51660>
- OPS, & OMS. (Octubre de 2015). *Informe Primera Reunión Regional sobre control de Taenia solium en América Latina*. Recuperado el 7 de Octubre de 2021, de <https://www.paho.org/es/documentos/informe-primera-reunion-regional-sobre-control-taenia-solium-america-latina-2015>

- Oswaldo Germán, A., Rodolfo Gustavo, D., Lucia, I., & Marcelo, R. (8 de mayo de 2019). *Evaluación del método de ELISA para detección de anticuerpos anti-cisticercos en sueros humanos*, 59(3). Recuperado el 25 de agosto de 2022, de <https://www.redalyc.org/journal/535/53562084015/html/>
- Oswgladys, L., & Ferrer, E. (noviembre de 2016). Clonación y caracterización de moléculas de *Taenia solium* procesadas post-transcripcionalmente mediante trans-splicing. 1-110. Maracay. Recuperado el 10 de agosto de 2022
- Pablo Lorenzana Pombo, A. d. (27 de Enero de 2021). Complejo teniasis/ cisticercosis. *Acta neurologica Colombia*, 129-140. doi:<https://doi.org/10.22379/24224022345>
- Picoaga, R. J. (2017). Evaluación de la capacidad antigénica de proteínas expuestas/inmunogénicas de cisticercos de *Taenia solium*, para su potencial uso en el inmunodiagnóstico de cisticercosis. 91. Recuperado el 23 de febrero de 2023
- Robles, R. V., & Mendoza, H. L. (13 de Mayo de 2009). La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud Publica de Mexico*, 51, 386-394. Recuperado el 14 de Junio de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900004
- Rosirys Velásquez Salazar, S. R. (2016). Neurocisticercosis: enfermedad infecciosa desentendida, olvidada y emergente. A propósito de un caso. *Red de revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*, 14-21.
- Salud, O. M. (2020). *Teniasis y cisticercosis*. Recuperado el 12 de Noviembre de 2020, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
- Sara Quero, N. P., & Sabria, M. (2016). Proteómica en enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Elsevier*, 253-260. Recuperado el 16 de junio de 2021, de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X14003991>
- Villegas, G., Torres, M., Röthlisberger, S., & Delgado, E. (1 de marzo de 2019). Procesamiento de imágenes de electroforesis bidimensional: una revisión. *Scientia et Technica Año XXIV*, 9. Recuperado el 1 de junio de 2023, de chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/file:///C:/Users/Micro%20Molecular
/Downloads/Dialnet-ProcesamientoDeImagenesDeElectroforesisBidimension-6888
650.pdf

ANEXOS

ANEXO: 1

Protocolo de corridas del isoelectroenfoco para *Escherichia coli*, realizadas en el equipo de IEF PROTEAN i12 BIORAD, Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS.

Paso	voltaje		uAmp	Value	Unidades
1	250	RAPID	50	0:30	HH:MM
2	500	RAPID	50	0:30	HH:MM
3	4000	LINEAR	50	2:00	HH:MM
4	4000	RAPID	50	1000	HH:MM
5	500	HOLD	50		

ANEXO 2:

Protocolo de corridas del isoelectroenfoco para Ladder bidimensional, realizadas en el equipo de IEF PROTEAN i12 BIORAD, Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS.

Paso	voltaje		uAmp	Value	Unidades
1	250	RAPID	50	0:30	HH:MM
2	500	RAPID	50	0:30	HH:MM
3	4000	LINEAR	50	2:00	HH:MM
4	4000	RAPID	50	1000	HH:MM
5	500	HOLD	50		

ANEXO 3:

Protocolo de corridas del isoelectroenfoque para las proteínas de *Teania solium*, realizadas en el equipo de IEF PROTEAN i12 BIORAD, Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto SELADIS.

Paso	voltaje		uAmp	Value	Unidades
1	250	RAPID	50	0:30	HH:MM
2	500	RAPID	50	0:30	HH:MM
3	4000	LINEAR	50	2:00	HH:MM
4	4000	RAPID	50	1000	HH:MM
5	500	HOLD	50		