



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE LA
PROTEÍNA TIPO TRIPSINA TSAG5 DE
TAENIA SOLIUM, CON ACTIVIDAD
PROTEOLÍTICA, EN UN SISTEMA DE
EXPRESIÓN DE CÉLULAS DE INSECTO
PARA SU POTENCIAL USO EN EL
INMUNODIAGNÓSTICO DE CISTICERCOSIS
PORCINA”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

SUELINE LUIS LAM

LIMA-PERÚ

2023

ASESOR (A):

PhD. Mirko Juan Zimic Peralta

CO ASESORES (AS):

PhD. Mónica Pajuelo Travezaño

PhD. Patricia Sheen Cortavarría

JURADO DE TESIS

PRESIDENTE

PhD. Rosa Patricia Herrera Velit

VOCAL

PhD. Luis Julio César De Stefano Beltrán

SECRETARIO(A)

PhD. Daniel Clark Leza

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por la paciencia y apoyo durante esta etapa de tesista.

AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del laboratorio de Bioinformática y Biología molecular por todos los consejos y ayuda durante la realización de los experimentos.

Al Dr. Mirko Zimic, la Dra. Patricia Sheen y a la Dra. Mónica Pajuelo por el apoyo constante durante todas las etapas de realización de esta tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad-Innovate Perú, contrato 181-FINCyT-IB-2013.

CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TIPO TRIPSINA TSAG5 DE TAENIA SOLIUM, CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA, EN UN SISTEMA DE EXPRESIÓN DE CÉLULAS DE INSECTO PARA SU POTENCIAL USO EN EL INMUNODIAGNÓSTICO

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

hdl.handle.net

Fuente de Internet

1%

2

patents.google.com

Fuente de Internet

1%

3

sgc.anlis.gob.ar

Fuente de Internet

<1%

4

www.jove.com

Fuente de Internet

<1%

5

cybertesis.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

6

Martínez Estrada María Teresa de Jesús.
"Selección de péptidos que unen receptores de las toxinas Cry1A de Bacillus thuringiensis empleando la tecnología de despliegue en fagos", TESIUNAM, 2008

Publicación

<1%

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	4
	2.1 Planteamiento del problema	4
	2.2 Marco Teórico	5
	2.2.1 Taenia solium	5
	2.2.2 Complejo cisticercosis/teniasis y neurocisticercosis	7
	2.2.3 Diagnóstico de cisticercosis porcina	9
	2.2.4 Diagnóstico de neurocisticercosis	10
	2.2.5 Proteína TsAg5 del cisticerco de <i>T. solium</i>	11
	2.2.6 Células de insecto infectadas por baculovirus como sistema de expresión de proteínas	13
III.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	19
IV.	OBJETIVOS	22

4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
V. METODOLOGÍA	23
5.1 Diseño de primers para clonamiento	24
5.2 Obtención de cisticercos para la extracción de ARN	25
5.3 Extracción de RNA	26
5.4 Transcripción reversa para obtener cDNA	26
5.5 Amplificación de los productos por PCR	26
5.6 Purificación de los productos de PCR	28
5.7 Construcción de plásmido recombinante pFastBac HT-A	28
5.7.1 Digestión de productos de PCR y vector pFastBac HT-A con enzimas de restricción	28
5.7.2 Ligación	29
5.7.3 Transformación de células de E. coli	29
5.7.4 Extracción de plásmidos	29
5.7.5 Análisis de transformantes	30
5.8 Generación del bácido recombinante	30

5.9 Verificación de presencia de báculo recombinante	31
5.10 Aislamiento de báculo recombinante	31
5.11 Cuantificación de células de insecto	32
5.12 Transfección de células de insecto	32
5.13 Aislamiento del stock viral P1	34
5.13.1 Determinación del stock viral	34
5.13.2 Amplificación de los títulos virales	36
5.14 Expresión de proteína.	37
5.15 Comprobación de la expresión y purificación del dominio tripsina y de la proteína completa a través de Western immunoblot.	38
5.16 Obtención de las muestras de suero	38
5.17 Estandarización del ensayo de western immunoblot utilizando sueros de cerdos con cisticercosis	39
5.18 Ensayos de actividad enzimática	40
5.19 Aspectos éticos	40
VI. RESULTADOS	41
6.1 Estandarización del método de expresión de TsAg5 en células	

de insecto Sf9, mediante transfección con un baculovirus.	42
6.1.1 Diseño de cebadores para amplificación de los genes de TsAg5 completa y su dominio tipo tripsina	42
6.1.2 Clonación del gen de la proteína TsAg5 y dominio tripsina	43
6.1.2.1 Amplificación de los genes TsAg5 y dominio tripsina a partir de cDNA de cisticercos	43
6.1.2.2 Construcción del plásmido recombinante pFastBac	43
6.1.3 Expresión de TsAg5 completa y dominio tripsina en sistema de baculovirus	48
6.1.3.1 Transposición de pFastBac-TsAg5 completa y dominio tripsina con el bécrido de <i>E. coli</i> DH10Bac	39
6.1.4 Expresión de proteínas recombinantes en el sistema baculovirus	50
6.1.4.1 Infección de las células sf9 sanas con partículas virales	51
6.1.4.2 Extracción de DNA viral utilizando el método de proteinasa K y Fenol-cloroformo-Alcohol isoamílico	52
6.1.4.3 Verificación de la expresión de las proteínas recombinantes TsAg5 y dominio tripsina	52
6.1.5 Determinación de títulos virales por ensayo en placa	56
6.2 Obtención de la proteína TsAg5 expresada en células de insecto Sf9 parcialmente purificada.	58
6.2.1 Purificación de proteínas	58

6.2.1.1 Cromatografía de afinidad	58
6.2.1.2 Cromatografía de intercambio iónico	60
6.3 Estandarización de la prueba de Western immunoblot usando TsAg5 para detectar anticuerpos de cisticercosis porcina	63
6.4 Determinación de la actividad proteolítica de TsAg5 a través de ensayos de actividad enzimática	66
VII. DISCUSIÓN	69
7.1 Expresión de TsAg5 en células de insecto Sf9	69
7.2 Purificación de TsAg5	70
7.3 Expresión de TsAg5 con actividad proteolítica	71
7.4 TsAg5 como antígeno de inmunodiagnóstico	73
7.5 Importancia del diagnóstico de cisticercosis porcina para el control de neurocisticercosis humana	75
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. RECOMENDACIONES	78
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Reactivos utilizados en la amplificación de TsAg5 completa y dominio tipo Tripsina por PCR convencional.

Tabla 2: Condiciones de la PCR para amplificar a proteína completa y el dominio tripsina.

Tabla 3: Secuencias de los cebadores diseñados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de *T. solium*.

Figura 2. Esquema de TsAg5.

Figura 3. Ciclo de replicación de baculovirus.

Figura 4. Flujograma de clonamiento y expresión en el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen).

Figura 5: Sitio de clonamiento múltiple del vector pFastBac HT-A.

Figura 6. Plásmido pFastBac HTA. Generado por SnapGene.

Figura 7. Cromatograma de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína TsAg5 utilizando el sistema Biologic LP (Bio Rad).

Figura 8. Cromatograma de purificación de dominio tripsina por cromatografía de intercambio iónico.

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Electroforesis de agarosa al 1%. Amplificación de TsAg5 completa (1437 pb) y dominio tripsina (900 pb) por PCR convencional

Fotografía 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Digestión de TsAg5 completa y plásmido pFast Bac con enzimas de restricción BamHI y MfeI

Fotografía 3. Clonamiento de TsAg5 completa.

Fotografía 4. Clonamiento de Dominio Tripsina.

Fotografía 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de clonas con TsAg5 completa.

Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de clonas con el dominio tripsina.

Fotografía 7: Análisis de restricción de las clonas con TsAg5 completa.

Fotografía 8. A: Transposición de TsAg5 completa

Fotografía 9. Amplificación por PCR de bácmidos conteniendo el gen de TsAg5 completa.

B: Amplificación por PCR de bácmidos conteniendo el gen del dominio tripsina.

Fotografía 10: Transfección de células Sf9 con TsAg5 completa al día 9.

Fotografía 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación por PCR del gen insertado a partir de DNA viral extraído.

Fotografía 12. Western inmunoblot en una muestra del cultivo celular Sf9 infectada por 9 días con partículas virales que portan el gen de Tripsina completa.

Fotografía 13. Western inmunoblot de una muestra del cultivo celular Sf9 infectada por 8 días con partículas virales que portan el gen de dominio tripsina

Fotografía 14. Western inmunoblot tras sonicado del pellet de las células transfectadas con dominio tripsina.

Fotografía 15. Determinación de partículas virales por ensayo en placa.

Fotografía 16. Western inmunoblot de proteína dominio tripsina producida bajo diferentes MOI.

Fotografía 17. Western inmunoblot de tubos recolectados durante la purificación de la proteína.

Fotografía 18. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie G250 de tubos recolectados durante la purificación por cromatografía de afinidad.

Fotografía 19. Western inmublot de tubos recolectados durante la purificación de la proteína TsAg5.

Fotografía 20. A. Western inmublot de la purificación de proteínas expresadas en células de insectos Sf9.

Fotografía 21. Gel de poliacrilamida al 12 %. con proteína parcialmente purificada.

Fotografía 22. Western inmunoblot utilizando pooles positivos de sueros de cerdos con cisticercosis.

Fotografía 23. Western inmunoblot utilizando sueros de cerdos como controles positivo y negativo.

Fotografía 24. Western inmunoblot con sueros individuales de cerdos.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Actividad enzimática tipo tripsina del dominio tripsina de TSAg5.

Gráfico 2. Actividad enzimática tipo tripsina del dominio tripsina de TsAg5 con uso de inhibidores de actividad tripsina

RESUMEN

La cisticercosis porcina es una enfermedad causada por la ingesta de huevos de *Taenia solium* y su conversión en oncósferas. Las oncósferas penetran el torrente sanguíneo diseminándose en diversos tejidos. La sintomatología depende del sitio en donde se alojen. Los cerdos afectados muchas veces no muestran sintomatología debido al poco tiempo de vida que tienen antes de su sacrificio, por lo que fácilmente pueden diseminar la enfermedad al actuar como hospederos intermediarios en el ciclo de vida del parásito.

El diagnóstico de cisticercosis porcina está basado en la observación de los cisticercos durante la necropsia de las carcasas y a través de la palpación de las larvas en la base de la lengua, estas son pruebas complicadas de hacer debido a que necesitan personal entrenado. Estas pruebas se apoyan de pruebas serológicas como la LL-GP EITB, que tiene moderada sensibilidad (77.37%) y moderada especificidad (76.4%) de diagnóstico, y utiliza un antígeno glicoproteico obtenido de cerdos infectados. Es por esto, que se está buscando proteínas antigénicas que faciliten la detección de anticuerpos utilizando pruebas serológicas y que puedan ser producidas de manera recombinante.

TsAg5 ha sido detectada en el fluido de quistes y en antígenos de excreción/secreción de *T. solium*. TsAg5 expresada en un sistema procariote, sin modificaciones post traduccionales, mostró una sensibilidad moderada para detectar neurocisticercosis y actividad enzimática marginal. En este estudio se expresó TsAg5 en células de insecto, sistema que provee de modificaciones post-traduccionales (ej. glicosilaciones), antigenicidad y correcto plegamiento, generándose proteínas funcionales con actividad enzimática tipo tripsina.

Además, se comprobó su antigenicidad con sueros de cerdos con cisticercosis a través de western immunoblot.

Palabras clave: cisticercosis porcina, TsAg5, actividad enzimática tipo tripsina, expresión de proteínas, inmunodiagnóstico.

ABSTRACT

Porcine cysticercosis is a disease caused by the ingestion of *Taenia solium* eggs and their conversion into oncospheres. Oncospheres penetrate the bloodstream disseminating in various tissues, The symptomatology depends on the place they deposit. Affected pigs often do not show symptoms due to their short lifespan before slaughter, so they can easily spread the disease by acting as intermediate hosts in the parasite's life cycle.

The diagnosis of porcine cysticercosis is based on the observation of the cysts during the necropsy of pig carcasses and through the palpation of the larvae at the base of the tongue, which are complicated tests to perform because they require trained staff. These tests are supported by serological tests such as immunoelectrotransferblot with affinity to lentil lectin glycoproteins (LL-GP EITB) due to its moderate sensitivity (77.37%) and specificity (76.4%) to diagnose it, however this is a test that depends on infected pigs to obtain the glycoproteic antigen. This is the reason we are looking for proteins that are easy to detect using serological tests and can be produced by modern methodologies such as recombinant techniques.

TsAg5 has been detected in cyst fluid and excretion/secretion antigens of *T. solium*, and has been expressed in a prokaryotic system, without post-translational modifications, which showed a moderate sensitivity for detecting neurocysticercosis and a marginal enzyme activity. In this study, TsAg5 was expressed in insect cells, a system that provides post-translational modifications (e.g., glycosylation), antigenicity and correct folding, generating functional proteins with trypsin-like enzymatic activity. In addition, its antigenicity was verified with pigs' sera with cysticercosis through western immunoblot.

Keywords: Porcine cysticercosis, TsAg5, trypsin-like enzyme activity, protein expression, immunodiagnosis.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es un país hiperendémico de cisticercosis, habiéndose encontrado seroprevalencias en cerdos de hasta 75% en la sierra del país (García *et al*, 2003). Sabemos que la cisticercosis porcina nos da un buen panorama de la prevalencia de cisticercosis/teniasis en humanos y esto se debe a que el mayor factor riesgo para la ocurrencia de esta enfermedad es la presencia de un portador en lugares cercanos (González *et al*, 1994; Flisser, 2011).

El ciclo de vida de *Taenia solium* involucra al cerdo como hospedero intermediario y a los humanos como hospederos definitivos e intermediarios (Figura 1). Los huevos son liberados en el ambiente a través de las heces humanas y son ingeridos por cerdos, los cuales desarrollan quistes en diferentes tejidos, a lo que se denomina cisticercosis, encontrándose en 30 a 60 % de los cerdos de vida libre en el Perú (Arana *et al*, 2013). La cisticercosis porcina causa sintomatología asociada al tejido en el que se depositan los cisticercos, pero esto depende de la carga parasitaria. El diagnóstico definitivo es complicado debido a que se basa en la observación de las larvas durante la necropsia de los animales causando pérdidas económicas de los productores de zonas endémicas. Además, se apoya de pruebas inmunológicas como la inmunoelectrotransferencia blot ligada a enzimas (Enzyme-linked Immuno-electrotransfer Blot, (EITB)) que se basa en la detección de anticuerpos anti-cisticercos que se dirigen hacia glicoproteínas con afinidad lenti-lectin con una sensibilidad de 77.37% y una especificidad de 76.4% (Jayashi *et al*, 2014).

La neurocisticercosis humana ocurre cuando los metacéstodes de *T. solium* llegan hasta el sistema nervioso central y se depositan formando quistes en diferentes estructuras anatómicas. La sintomatología varía dependiendo del sitio donde se depositen, pero es la

mayor causante de epilepsia en países en vías de desarrollo (Placencia *et al*, 1992; García *et al*, 2014). El diagnóstico definitivo incluye la identificación de los cisticercos con escólex, los cuales pueden ser observados en el cerebro por resonancia magnética acompañado de resultados positivos en las pruebas inmunológicas (Saavedra *et al*, 2010; Sarria-Estrada *et al*, 2013; Del Brutto, 2014).

El control de la neurocisticercosis humana es sumamente importante debido a que esta enfermedad es la causante de signos neurológicos, los cuales bajan la calidad de vida de los pacientes y muchas veces, pueden causar la muerte si el paciente no es tratado a tiempo. Diversos autores mencionan la importancia del diagnóstico y control de la cisticercosis porcina en el monitoreo de las medidas de control de la neurocisticercosis humana (Lightowers, 2016, García, 2018). Es imperativo que se identifiquen marcadores moleculares específicos de *Taenia solium* para que puedan ser utilizados para la fabricación de pruebas rápidas que ayudarían en el diagnóstico definitivo de la cisticercosis porcina y por lo tanto en el control indirecto de la neurocisticercosis humana.

TsAg5 es una proteína tipo tripsina que ha sido identificada en los antígenos excretorios/secretorios de las oncósferas de *T. solium* y *T. saginata* (Zimic *et al*, 2007), que está compuesta por 2 dominios (dominio tipo tripsina y dominio de adherencia). No se sabe cuál sería la función de esta proteasa en la patogénesis de la cisticercosis, pero se piensa que estaría implicada en el debilitamiento de la pared intestinal para la invasión de las oncósferas (Rueda *et al*, 2011). Esta proteína tiene su homóloga en *Echinococcus granulosus*, conocida como EgAg5, la cual ha sido identificada como altamente inmunogénica (Li *et al*, 2012), y es un componente común de quiste de *E. granulosus* (Lorenzo *et al*, 2003). Por esta razón se considera que TsA5 podría ser una buena candidata para ser antígeno de diagnóstico.

Se han realizado estudios con TsAg5, donde se clonaron sus 2 dominios por separado utilizando vectores procariotes como *E. coli* (Rueda *et al*, 2011). Sin embargo, en dicho estudio, se encontró una baja sensibilidad (39.62%) para diagnosticar neurocisticercosis asociada a quiste único y la especificidad fue de 76.7%. Además, se expresó con una actividad proteolítica marginal.

Baculovirus es un patógeno de insectos que regula la población de insectos en la naturaleza. Estos han sido utilizados satisfactoriamente como vectores de expresión que infectan células eucariotas (Jarvis, 1997). La principal ventaja de utilizar este vector es que, al infectar células eucariotas, estas proveen de modificaciones post-traduccionales las cuales se han identificado en EgAg5 como determinantes de su alta inmunogenicidad (Lorenzo *et al*, 2005) y están asociadas al correcto plegamiento de ciertas serin proteasas (Wang *et al*, 2018). Es por esto que se piensa que baculovirus sería el vector ideal para clonar y expresar a TsAg5 e incrementar la sensibilidad para diagnosticar cisticercosis porcina. Además, pensamos que TsAg5 expresado en células de insecto podría tener actividad proteolítica al ser expresado con modificaciones post-traduccionales importantes para su plegamiento adecuado y por lo tanto su función.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Planteamiento del problema

El diagnóstico de cisticercosis porcina es difícil, muchas veces no se correlaciona los resultados de las pruebas serológicas con los cisticercos encontrados a la necropsia. Para evitar la diseminación del parásito e iniciar un tratamiento, se debe tener un diagnóstico temprano de la enfermedad por lo que es necesario implementar un método de diagnóstico rápido, eficiente y que sea accesible para la mayor cantidad de animales. Sabemos que el diagnóstico definitivo de la cisticercosis porcina se da a través de técnicas complejas como la búsqueda de cisticercos en la carcasa de los animales durante la necropsia o la palpación de las larvas en la lengua apoyada de pruebas serológicas (Lightowers *et al*, 2020).

Se ha comprobado la efectividad de las pruebas serológicas para diagnosticar cisticercosis tanto en cerdos como en humanos, siendo la inmunoelectrotransferencia blot de glicoproteínas de afinidad lenteil lectin (EITB-LLGP) la más exitosa debido a su moderada especificidad y sensibilidad. Sin embargo, su aplicación es poco probable debido a su complejidad. Se han realizado diversos intentos de expresar las 7 glicoproteínas con afinidad lenteil-lectin de manera recombinante, pero hasta el momento no han tenido éxito (Noh *et al*, 2014). Es por esto que es necesario desarrollar nuevas pruebas serológicas económicas y que puedan ser implementadas en campo, que detecten anticuerpos circulantes anti-*T.solium* tanto en cerdos como humanos para evitar la diseminación de los parásitos y así realizar un control de la enfermedad. Diversos estudios en *Echinococcus granulosus* comprueban la importancia de utilizar a EgAg5 como antígeno de diagnóstico para hidatidosis debido a su

alta antigenicidad causada por sus modificaciones post-traduccionales, específicamente N-glicosilaciones (Lorenzo *et al*, 2005; Paschinger *et al*, 2012).

Por esta razón creemos que la proteína homóloga TsAg5 de *T. solium* podría actuar del mismo modo para apoyar en un mejor diagnóstico de cisticercosis porcina si es expresada con modificaciones post-traduccionales adecuadas, las cuales podrían ser provistas por células de insecto infectadas por un baculovirus recombinante. El presente estudio busca explorar si TsAg5 puede ser expresada con actividad proteolítica utilizando un sistema de expresión de células insecto y si esta en consecuencia puede ser una buena candidata para ser utilizada como antígeno de diagnóstico de cisticercosis.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 *Taenia solium*

Taenia solium es un gusano plano parásito perteneciente a la familia Taenidae, clado Cyclophilidae, clase Eucestoda y grupo Lochotrophozoa (Bobes *et al*, 2014). La familia Taenidae está formada por dos géneros: *Taenia* Linnaeus 1758 y *Echinococcus* Rudolphi 1801 (Nakao *et al*, 2013), siendo ambos géneros de importancia médica y veterinaria debido a que causan afecciones intestinales (teniasis) y sistémicas (cisticercosis e hidatidosis). Además, ambos géneros necesitan de hospederos intermediarios mamíferos para completar su ciclo biológico.

El ciclo biológico de *T. solium* incluye al cerdo, como hospedero intermediario y al humano como hospedero definitivo. El humano ingiere las larvas, las cuales se encuentran enquistadas en tejidos de cerdos infectados, y una vez en el intestino delgado estas son liberadas por los jugos gástricos y se adhieren a la pared intestinal. Con el paso del tiempo

se alimentan y crecen desarrollando proglótidos, y gracias a que son hermafroditas pueden autofecundarse y producir huevos, los cuales son expulsados mediante las excretas (García *et al*, 2010; García *et al*, 2014). En condiciones de pobre salubridad, estas excretas contaminan tierras y aguas donde se alimentan cerdos de vida silvestre. Tras ingerir los huevos, estos llegan hasta el intestino delgado donde se liberan oncósferas por acción de la bilis y jugos intestinales. Estas oncósferas debilitan la pared del intestino delgado con ayuda de proteasas y llegan hasta el torrente sanguíneo (Rueda *et al*, 2011; Zimic *et al*, 2007), el cual se encarga de llevarlas a los diferentes tejidos del cuerpo donde se enquistan causando la cisticercosis. Cabe resaltar que los humanos también pueden adquirir cisticercosis debido a que pueden actuar como hospederos intermediarios accidentales de este ciclo a través de la ingestión vía fecal-oral de los huevos de *T. solium* (Figura 1)

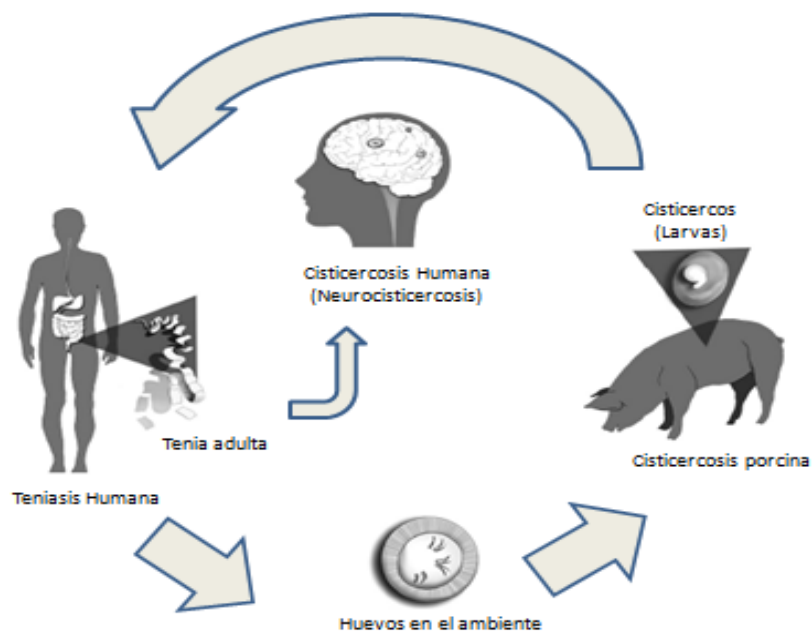


Figura 1. Ciclo biológico de *T. solium*. El ciclo involucra al cerdo como hospedero intermediario y al humano como hospedero definitivo. La tenia adulta espontáneamente

libera proglótidis, proglótidis grávidos o huevos al ambiente a través de las excreciones de humanos infectados con tenias adultas. Cada segmento grávido contiene 30 000 - 50 000 huevos. El ciclo se completa cuando la carne de cerdo poco cocinada conteniendo cisticercos viables es ingerida por el hospedero definitivo. Adaptado de Bobes *et al* (2014).

2.2.2 Complejo cisticercosis/teniasis y neurocisticercosis

Las enfermedades que causa este parásito son conocidas como complejo teniasis/cisticercosis, puesto que una enfermedad depende de la otra para ocurrir. Este complejo es endémico en países de Latinoamérica, África y Asia. Conocer la epidemiología de la cisticercosis porcina es de suma importancia, ya que los cerdos pueden actuar como centinelas para saber la cantidad de huevos que hay en un ambiente (González *et al*, 1994), lo que significa que si tenemos una prevalencia alta de cisticercosis porcina también habrá una alta prevalencia de cisticercosis/teniasis humana.

Se han realizado diversos estudios epidemiológicos en el Perú basados en pruebas serológicas en porcinos, siendo las zonas más afectadas la costa norte, la sierra y la selva alta (García *et al*, 2010). En la costa se han encontrado prevalencias de 5.18% en Monterredondo-Piura hasta 45% en Tumbes (García *et al*, 2011). En la selva se ha encontrado seroprevalencias de 8% en Maceda-Tarapoto (Sánchez, 2019), 28% en Amazonas y 17 % en Tambopata (Rojas, 2021). Por último, en la sierra se han encontrado seroprevalencias de 35% en Andahuaylas-Apurímac (Watanabe, 2012) hasta 72% en Quilcas-Huancayo (Arroyo, 2010).

La sintomatología del complejo teniasis/cisticercosis es inespecífica y muchas veces ausente y esta depende de la localización en que se hayan depositado los quistes. Las localizaciones más comunes son el tejido subcutáneo, los músculos, el sistema nervioso central y los ojos

(Bouteille, 2014). Las formas subcutáneas y musculares son muchas veces asintomáticas. Sin embargo, el problema se agrava cuando las oncósferas atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan a depositarse en el sistema nervioso central, a lo que se le conoce como neurocisticercosis, siendo esta una de las principales causantes de epilepsia en países en vías de desarrollo (Senanayake y Román, 1993). La tasa de epilepsia en países andinos es 17-20 por 1000 comparado con 3-6 por 1000 en países industrializados (Placencia *et al*, 1992). Se ha calculado que solo en el Perú habría aproximadamente 31 000 personas con epilepsia asociada a neurocisticercosis y que en Latinoamérica habría 400 000 (Bern *et al*, 1999). Otros signos asociados a neurocisticercosis son migrañas, psicosis, hidrocefalia, deterioro mental e hipertensión endocraneana (García *et al*, 2000).

Algunos autores describen a la neurocisticercosis como una enfermedad desatendida (Flisser, 2011; Mewara *et al*, 2013), y esto se debe a que si se tomaran las medidas sanitarias adecuadas se podría erradicar a esta enfermedad. Las condiciones de baja salubridad y pobreza son propicias para que el complejo teniasis/cisticercosis prospere, puesto que dentro de los principales factores de riesgo se encuentran el acceso de las heces humanas a los cerdos, el libre deambular de los animales, la presencia de corrales como sitios para defecar, el consumo de carne de cerdo mal cocida, el sacrificio de los cerdos en camales no certificados y la venta ilegal de carne infectada (Flisser, 2011; Watanabe, 2013).

La presencia de un portador de *T. solium* es considerada como el mayor factor de riesgo para la neurocisticercosis (Arroyo, 2010; Flisser, 2011; García, 2014). La primera vez que se describió esta asociación fue en El Sótano-Hidalgo en México puesto que se encontraron anticuerpos anti-cisticercos y sintomatología en gente que vivía en la misma casa y en los cerdos que poseían (Sarti, 1988). Otro ejemplo claro, es que se encontró una seroprevalencia

de 9% en una comunidad judía ortodoxa en Nueva York-Estados Unidos que nunca habían consumido carne de cerdo; esta infección fue asociada a la presencia de empleados inmigrantes que venían de países endémicos (Moore *et al*, 1995).

2.2.3 Diagnóstico de cisticercosis porcina

El diagnóstico de cisticercosis porcina definitivo se basa en la observación directa de los quistes a través de la inspección total de las carcasas tras la necropsia de los animales. En los porcinos, es común encontrar quistes musculares y subcutáneos, y estos animales son sacrificados en promedio a los 8 a 9 meses de vida (García *et al*, 2020). La inspección parcial de las carcasas detecta menos del 50% de los quistes, y esto se debe que no hay una uniformidad al realizar los cortes tangenciales, además de que muchas veces los quistes pueden localizarse en órganos que no son inspeccionados. (Mena, 2002).

Otro método de diagnóstico de la cisticercosis porcina es la palpación de la lengua de los animales. En este método se intenta detectar los quistes en la base de la lengua a través del tacto. Este ha sido descrito como un proceso laborioso, con una sensibilidad del 70% y especificidad del 95% (González *et al*, 1990).

Existen otros métodos de diagnóstico menos invasivos como los serológicos. Dentro de estas pruebas se han descrito a la prueba de ELISA con una alta sensibilidad, pero baja especificidad y la inmunoelectrotransferencia de glicoproteínas con afinidad lenti lectin (LL-GP EITB) (Tsang *et al*, 1989), con una moderada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, ninguno de los métodos descritos se utiliza rutinariamente debido a la falta de disponibilidad de las pruebas para ser utilizadas a larga escala en lugares que son endémicos causada por

diversos factores como los altos costos, accesibilidad limitada, disponibilidad de un laboratorio equipado y/o de personal entrenado para su uso (García *et al*, 2018).

El diagnóstico es sumamente importante para el control de la cisticercosis tanto porcina como humana. Una reducción en la cisticercosis porcina se podrá ver reflejada en una disminución en la presencia de teniasis y cisticercosis humana. Es más fácil y económico hacer las pruebas a los animales y los aspectos éticos son menos complicados (Lightowlers *et al*, 2016).

2.2.4 Diagnóstico de neurocisticercosis humana

El diagnóstico de la neurocisticercosis humana es muy complejo debido a que la sintomatología es muy variable. El diagnóstico definitivo de la neurocisticercosis se da cuando ha habido una observación histológica del parásito en una biopsia de una lesión en el cerebro o médula espinal, cuando se ha observado cisticercos con escólex en una resonancia magnética o tomografía axial computarizada, y/o cuando hay una visualización directa del parásito localizado subretinalmente a través de un examen fundoscópico (Del Brutto, 2012). Sin embargo, llegar a este diagnóstico definitivo muchas veces es muy difícil debido a diversas razones. Entre las principales razones que dificultan este diagnóstico se encuentra la inaccesibilidad a las pruebas debido a un factor económico de los pacientes. Como sabemos, esta enfermedad está asociada a condiciones rurales y de mucha pobreza en la cual carecen de medios económicos para trasladarse hasta un centro especializado que posea la maquinaria que realice el diagnóstico tanto por imágenes, histológico o por fundoscopio.

Del mismo modo, la confirmación del parásito por histología es rara vez posible debido a la dificultad para realizar una toma de muestra. Debido a esto, el diagnóstico definitivo se basa en pruebas de imágenes apoyadas de pruebas serológicas. Dentro de las pruebas serológicas

más utilizadas para el diagnóstico de neurocisticercosis están ELISA e inmunoelectrotransferencia de glicoproteínas con afinidad lentil lectin (LL-GP EITB) (Tsang *et al*, 1989). LL-GP EITB es la más utilizada debido a su alta especificidad (100%) y sensibilidad (98%) cuando se tiene neurocisticercosis con múltiples quistes, pero su sensibilidad baja hasta 60% en el caso de neurocisticercosis de quiste único (Wilson *et al*, 1991; Noh *et al*, 2014; Del Brutto, 2014; García *et al*, 2014) lo que significa que 40% de los pacientes no son identificados.

2.2.5 Proteína TsAg5 del cisticerco de *T. solium*

TsAg5 es una proteína tipo tripsina de 478 aminoácidos (figura 2), que posee dos dominios, el de adherencia en su amino terminal y el tipo tripsina en su carboxilo terminal, los cuales se piensa están unidos por enlaces disulfuro. El dominio tipo tripsina posee actividad enzimática de proteasa y el dominio de adherencia tiene una similitud con una trombospondina tipo 1, que se piensa que se une a iones de calcio y a glucosaminoglicanos para anclarse en la membrana extracelular (Rueda *et al*, 2011). TsAg5 fue descubierta en *T. solium* gracias al estudio de Rueda *et al*, (2011) en el que busca en la secuencia de *T. solium* un marco de lectura que tenga una alta homología con la proteína Ag5 de *Echinococcus granulosus* conocida como EgAg5. Desde finales de los años 60 Capron *et al* (1967) describe una banda que se mostraba en las pruebas de inmunoelectroforesis que se realizaban en pacientes con hidatidosis, a la cual denomina “arc 5” o Ag5. Estudios posteriores comprueban que la reactividad de esta banda estaba asociada al diagnóstico de hidatidosis debido a que era un componente que se encontraba en el fluido del quiste hidatídico (Pozzuoli *et al*, 1974; Lorenzo *et al*, 2003) En cuanto a TsAg5, hasta el momento no se ha descrito que esta misma banda se muestre en pacientes con cisticercosis.

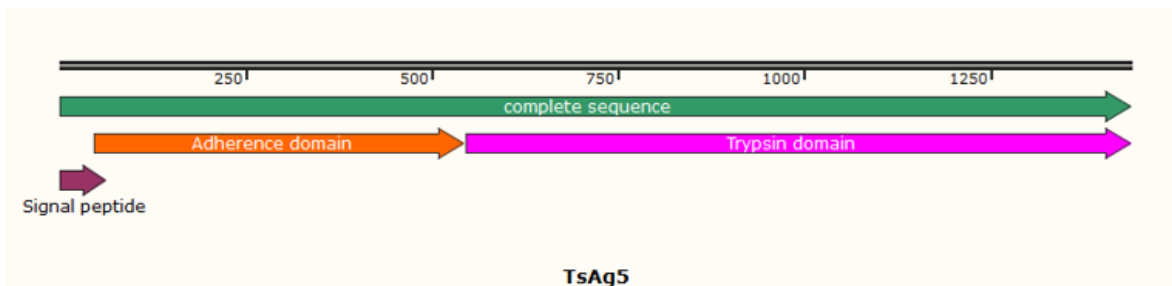


Figura 2: Esquema de TsAg5, que posee 2 dominios: el dominio de adherencia en N-terminal y el dominio tripsina en C-terminal. Generado por SnapGene.

Sabemos que *T. solium* y *E. granulosus* pertenecen a la misma familia, es por esto que se pensó que sus secuencias tendrían alta homología. Existe una identidad de 82% entre las secuencias de TsAg5 y EgAg5. Esta última, también está constituida por 2 dominios, uno de 38 kDa y otro de 22 kDa, unidas por un solo enlace disulfuro. No se ha observado antigenicidad en el dominio de 22 kDa, pero si en el de 38 kDa y se sabe que está dada por las modificaciones post-traduccionales en esta proteína, especialmente por las N-glicosilaciones, que se han predicho que se encuentran en los residuos Asn⁵⁴ y Asn²¹³ (Lorenzo *et al*, 2005; Paschinger *et al*, 2012). Se piensa que TsAg5 también tendría estas modificaciones post-traduccionales (Arana *et al*, 2013), que incrementarían su antigenicidad y por lo tanto la sensibilidad para ser detectado por Western inmunoblot y/o ELISA. Análisis bioinformáticos utilizando programas en línea revelan tres posibles sitios de N-glicosilación en el dominio tipo tripsina de TsAg5. Pero no se ha encontrado sitios de O-glicosilación, aunque sabemos que estos son difíciles de predecir (Eisenhaber y Eisenhaber, 2010).

TsAg5 ya ha sido clonada, expresada y probada como antígeno de diagnóstico para neurocisticercosis humana por Rueda *et al* en el 2011. En los trabajos realizados, se clonó cada dominio de TsAg5 por separado utilizando un sistema de expresión procariótico (*E.*

coli). Como resultados encontraron que el dominio de adherencia no era inmunogénico mientras que el dominio tipo tripsina sí lo era. Además, encontraron una sensibilidad del dominio tipo tripsina de 96.36% para diagnosticar neurocisticercosis extraparenquimal, 75.44% para diagnosticar neurocisticercosis con múltiples quistes y solo de 39.62% para diagnosticar neurocisticercosis de quiste único. Sumado a esto, la especificidad solo fue de 76.70%. Todas estas pruebas fueron realizando sueros de pacientes humanos con neurocisticercosis. Se espera que la expresión de TsAg5 con las modificaciones post-traduccionales adecuadas sea más reactiva a los anticuerpos producidos. Se piensa que estas modificaciones post-traduccionales pueden ser provistas por un sistema de expresión eucariótico como células de insecto infectadas por baculovirus.

2.2.6 Células de insecto infectadas por baculovirus como sistema de expresión de proteínas

Los baculovirus son una gran familia de virus patogénicos en insectos que fueron utilizados en un principio como biopesticidas. Los baculovirus tienen cubierta, tienen forma abastionada y son virus de DNA que se replican en el núcleo de células de insectos. El genoma de baculovirus consiste en una molécula de DNA circular de doble cadena covalentemente cerrado de 80 a 180 kb de tamaño, dependiendo de la especie. Existen al menos 56 especies de baculovirus (Contreras-Gómez *et al*, 2014). Estos virus son utilizados para infectar células de insecto que se encargarán de expresar proteínas debido a ciertas propiedades que poseen, como, por ejemplo, el alto nivel de expresión de genes, las modificaciones post-traduccionales que proveen, su fácil manipulación en laboratorios con nivel 1 de bioseguridad y la posibilidad de cargar insertos grandes (al menos 38 kb) e incluso múltiples (Airenne *et al*, 2013).

Se han identificado dos fenotipos de viriones en la mayoría de baculovirus. Estos son los viriones derivados de oclusión (occlusion derived virus (ODV)) y los viriones de gemación (budded virus (BV)). Los BV salen de la membrana celular por gemación y se encargan de transmitir el virus dentro del mismo hospedero, mientras que los ODV son ensamblados completamente en el núcleo de células infectadas y luego son ocluidos en grandes cuerpos de oclusión poliédricos. Los ODV se encargan de que el virus sobreviva en el ambiente externo de la célula y contribuyen a que se disemine de insecto a insecto. Tras la ingesta del virus, el ambiente alcalino del intestino medio de insecto disuelve los cuerpos de oclusión poliédricos y libera los ODV, los cuales inician la infección en las células epiteliales intestinales. Es aquí donde se replican los virus y se forman los BV, para luego ser liberados de la célula vía gemación a través de la membrana plasmática para infectar otros tejidos causando infecciones secundarias. Estas infecciones secundarias resultan en el desarrollo de más ODVs que son liberados al ambiente por lisis celular y muerte del insecto (Figura 2) (Jarvis, 1997; O'Reilly, 1997; Van Oers, 2011; Airene *et al*, 2013; Contreras-Gomez *et al*, 2014)

Basado en las diferentes morfologías de los ODV, los baculovirus se pueden dividir en nucleopolihedrovirus (NPV) y granulovirus. Los NPV contienen múltiples partículas de virus mientras que los granulovirus solo contienen un virión. Algunos NPV tienen solo una nucleocápside (SNPV) mientras que otros tienen múltiples nucleocápsides (MNPV). A pesar de haberse descrito al menos 56 especies de baculovirus, dos de estas especies son las más utilizadas como vectores de sistemas de expresión de proteínas y son *Autographa californica* multiple nucleopolihedrovirus (AcMNPV) y *Bombix mori* nucleopolihedrovirus (BmNPV) (Jarvis, 1997). La mayor utilización de estas especies quizás se deba a que han sido estudiadas

más extensivamente y se ha comprobado su alta expresión genética tras ser utilizados como vectores de expresión.

La expresión genética de baculovirus ocurre en 4 fases. La primera es la fase inmediata temprana en la cual la RNA polimerasa II codificada por el hospedero transcribe genes tempranos cuyos productos activan genes retardados-tempranos y tardíos. La segunda fase es la retardada temprana en la cual se transcriben genes que codifican proteínas necesarias para la replicación de DNA y para que ocurra la expresión genética tardía (incluyendo DNA polimerasa, RNA polimerasa viral y factores esenciales tardíos). La tercera fase es la tardía en la cual ocurre la replicación del DNA y se producen las proteínas necesarias para el ensamblaje de viriones y gemación viral. Por último, está la fase retardada tardía en la cual los viriones son ocluidos y se producen dos proteínas en grandes cantidades, la polihedrina de 33 kDa y una proteína de 10 kDa llamada P10 (Van Oers, 2011).

La proteína polihedrina forma la matriz de los cuerpos de oclusión poliédricos mientras que se desconoce la función de la proteína P10, pero se piensa que está involucrada en la liberación de los cuerpos de oclusión desde el núcleo de las células infectadas (Carpentier *et al*, 2008; Van Oers, 2011; Contreras-Gomez *et al*, 2014). Los promotores de ambas proteínas son aprovechados para estimular una alta expresión genética en sistemas de expresión baculovirus debido a que ambas proteínas son producidas en grandes cantidades durante la fase retardada tardía de la expresión genética de baculovirus. Asimismo, la expresión de ambas proteínas *in vitro* no es necesaria para que el virus sobreviva debido a que estas proteínas solo se encargan de formar parte de los ODVs por lo que los BVs se pueden encargar de infectar los cultivos celulares, es por esto que los baculovirus recombinantes son contruidos a través del reemplazo del gen de polihedrina y/o P10 por un gen heterólogo

controlado por un promotor muy fuerte de polihedrina y/o P10, lo que permite la producción de la proteína recombinante en grandes cantidades (Drugmand *et al*, 2012). Un sistema de expresión baculovirus que posee promotores de polihedrina y/o P10 de *Autographa californica* es Bac-to-Bac (Invitrogen).

Bac-to-Bac (Invitrogen) es un sistema de expresión de proteínas de baculovirus que se basa en la transposición sitio específica de un casete en un báculo, el cual es propagado en *E. coli*. Este sistema contiene plásmidos donadores pFastBac™ que permiten la generación de un constructo o inserto que contenga el gen de interés que se quiere expresar y que estará controlado por un promotor de baculovirus. Además, el sistema posee una cepa de *E. coli*, DH10Bac™ que contiene un báculo y un plásmido helper o de ayuda, que permite la generación de un báculo recombinante a través de una transposición sitio específica del inserto. Este báculo recombinante será utilizado para transfectar células de insecto, las cuales se encargarán de expresar la proteína deseada.

El sistema Bac-to Bac permite escoger entre tres diferentes plásmidos donadores pFastBac. El primero es pFastBac-1, el cual posee un promotor fuerte de polihedrina de AcMNPV que garantiza un nivel de expresión de proteínas alto. El segundo es pFastBac-HT, el cual posee también un promotor fuerte de polihedrina, pero además posee una etiqueta de seis histidinas en su amino terminal para facilitar la purificación de la proteínas recombinantes utilizando resinas quelantes de metales, y también posee un sitio de corte para una proteasa que facilita la remoción de la etiqueta de seis histidinas. Por último, está el plásmido pFastBac-Dual, el cual contiene dos promotores de AcMNPV, uno de polihedrina y otro de P10, lo que permite la expresión simultánea de dos proteínas (Bac-to-Bac® baculovirus expression system, 2004).

Sumado a esto, el sistema Bac-to-Bac permite trabajar con células de insecto en medios libres de suero. Las células de lepidópteros han sido utilizadas tradicionalmente para producir proteínas vía sistemas de expresión baculovirus. Tres líneas lepidópteras son las más utilizadas en la producción de proteínas por vectores de expresión baculovirus. Dos de ellas son derivadas de tejido de ovario de pupa del insecto *Sporodoptera frugiperda*. Estas son IPLB-Sf21-AE (Sf21) y Sf9, una subclona de Sf21. La tercera es BTI-Tn-5B1-4, derivada de tejido de ovario de adulto de *Trichoplusia ni* comercializada como High Five (Invitrogen) (Ikonomuo *et al*, 2010). Las tres líneas celulares se reproducen bien en cultivos adherentes y en suspensión; y pueden adaptarse a medios libres de suero. Los medios libres de suero son los preferidos para trabajar con células de insecto y esto se debe principalmente a que los medios suplementados con suero suelen introducir agentes nocivos que pueden afectar a los cultivos y bajar la cantidad de proteínas expresadas (Drugmand *et al*, 2012).

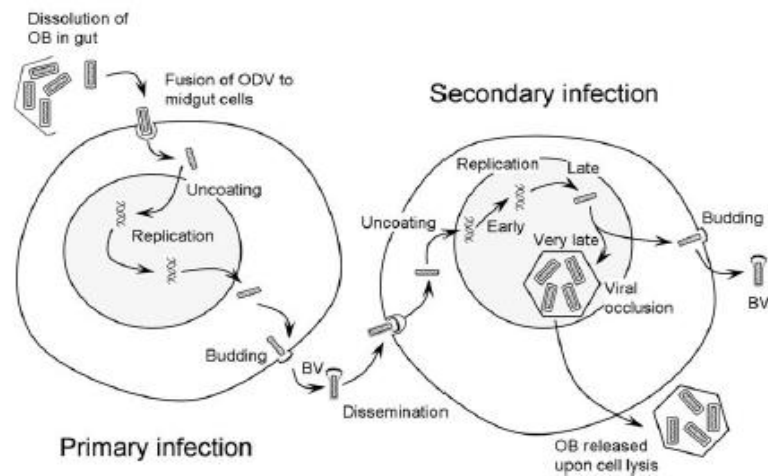


Figura 3. Ciclo de replicación de baculovirus. El ambiente alcalino del intestino medio de un insecto que haya ingerido el virus disuelve los cuerpos de oclusión (occlusion bodies (OB)) para liberar los ODVs. Los ODVs inician la infección primaria de las células epiteliales del intestino medio de insectos. Los virus se replican en las células del intestino medio y los

BV son formados. Los BVs son liberados de las células vía gemación a través de la membrana plasmática y se van a infectar otros tejidos en una infección secundaria. La infección secundaria resulta en el desarrollo de OBs, los cuales son liberados por lisis celular y por la muerte del insecto, lo que continúa la transmisión horizontal de la infección. Tomada de Contreras-Gomez *et al*, 2014.

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El diagnóstico de la cisticercosis porcina es complejo debido a que es una enfermedad pleomórfica, y a que los métodos utilizados para su diagnóstico definitivo incluyen a la necropsia y la examinación total de la carcasa por cortes tangenciales, lo cual genera pérdidas económicas grandes para los productores. Esto determina que los cerdos enfermos sean vendidos ilegalmente sin pasar por una correcta inspección y que la enfermedad prevalezca a medida que se consuma esta carne sin la debida cocción. Además, el diagnóstico de cisticercosis porcina se apoya en pruebas inmunodiagnósticas como EITB y ELISA. La importancia de este estudio es que a partir de sus resultados se podría desarrollar una prueba rápida y de bajo costo para diagnosticar cisticercosis con una alta sensibilidad y especificidad, con la finalidad de que pueda ser utilizada como tamizaje de los animales y evitar que se realice la examinación total de las carcasas por necropsia en lugares endémicos de *T. solium*. Sabemos que la necropsia de los cerdos con cisticercosis es bastante costosa para los productores por lo que se debe encontrar una prueba serológica que evite tantas pérdidas económicas.

Aunque se desconoce la función de la proteína TsAg5, se sabe que tiene actividad tipo tripsina y se presume que forma parte de las proteasas que debilitan la pared del intestino delgado para ayudar a que las oncósferas lleguen al torrente sanguíneo. Rueda *et al* comprobaron que TsAg5 se encuentra presente en el fluido quístico, en las proteínas de excreción-secreción de los cisticercos y en las oncósferas. Asimismo, Zimic *et al* (2007) demostraron que existe una alta actividad proteolítica en los productos de excreción-secreción de oncósferas y que esta actividad es causada en su mayoría por serino proteasas como quimiotripsinas y tripsinas. Debido a esto, se piensa que las serino proteasas son los

antígenos secretorios de oncósferas más abundantes y podrían ser detectados fácilmente a través de pruebas serológicas.

A pesar de que TsAg5 ya ha sido clonada, expresada y probada como antígeno de diagnóstico por Rueda *et al* (2011), la sensibilidad para diagnosticar neurocisticercosis de quiste único fue muy baja (39.62%) y esto podría deberse a que TsAg5 fue expresada en un sistema de expresión procariótico (*E. coli*). Sabemos que los sistemas de expresión procarióticos son los más utilizados para expresar proteínas debido a que son económicos, fáciles de manipular, son capaces de expresar proteínas recombinantes en altas concentraciones, entre otras razones. Sin embargo, estos sistemas de expresión tienen también diversas desventajas. La desventaja más importante para considerar es que no proveen modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones, fosforilaciones, miristoilaciones, prenilaciones, entre otras. Además, aunque pueden permitir la formación de enlaces disulfuro, tienen dificultad para hacerlo en caso las proteínas sean ricas en estos enlaces. Asimismo, algunas proteínas se quedan en corpúsculos de inclusión, lo que las hace difícil de purificar y conllevan un mayor trabajo debido a que se deben solubilizar con agentes reductores y necesitan replegarse (Demain y Vaishnav, 2009).

Otro problema relacionado al uso de un sistema procariótico es el sesgo del uso de codones (codon usage/codon bias) que consta en la utilización sesgada de ciertos codones sinónimos (Behura y Severson, 2013). Es decir, durante la traducción de genes algunos organismos procarióticos, como por ejemplo *E. coli*, prefiere utilizar ciertos codones sinónimos para traducir un aminoácido en particular. El problema viene cuando el organismo al que pertenece la proteína heteróloga que se quiere expresar no usa este mismo codon usage, lo que se traduce en una expresión pobre de proteínas (Ernst, 1988; Gustafsson *et al*, 2004)

Diversos estudios demuestran que baculovirus presenta un bajo sesgo en el codon usage (Levin y Whittome, 2000; Jiang *et al*, 2008) lo que se traduciría en una alta expresión de proteínas.

El presente trabajo utiliza células de insecto (eucarióticas) como sistema de expresión para la proteína TsAg5 de *T. solium*. Se piensa que al expresar a TsAg5 en un sistema de expresión eucariótico, esta será expresada con modificaciones post-traduccionales adecuadas, lo cual se traducirá en la producción de una proteína funcional que podría incrementar la sensibilidad para diagnosticar cisticercosis porcina. Asimismo, el sistema de expresión de baculovirus expresará una alta cantidad de TsAg5, lo que eliminará la necesidad de utilizar tejido de cisticercos para purificar antígenos que serían utilizados para detectar anticuerpos. Este trabajo desea optimizar la utilización del sistema de expresión células de insecto/baculovirus para ser utilizado para expresar proteínas eucarióticas que podrían ser utilizadas con diversos objetivos, como por ejemplo la producción de antígenos de diagnóstico y de vacunas.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Explorar la capacidad inmunodiagnóstica de la proteína tipo tripsina TsAg5 obtenida del sistema de expresión baculovirus/célula de insecto.

4.2 Objetivos específicos:

- Estandarizar el método de clonamiento y expresión de proteínas en células de insecto Sf9, mediante su transfección con un baculovirus.
- Obtener la proteína TsAg5 expresada en células de insecto Sf9.
- Determinar si el dominio tripsina de TsAg5 tiene actividad proteolítica a través de ensayos de actividad enzimática.
- Explorar potencial antigénico de TsAg5 para detectar anticuerpos de cisticercosis porcina a través de la prueba de Western Immunoblot.

V. METODOLOGÍA

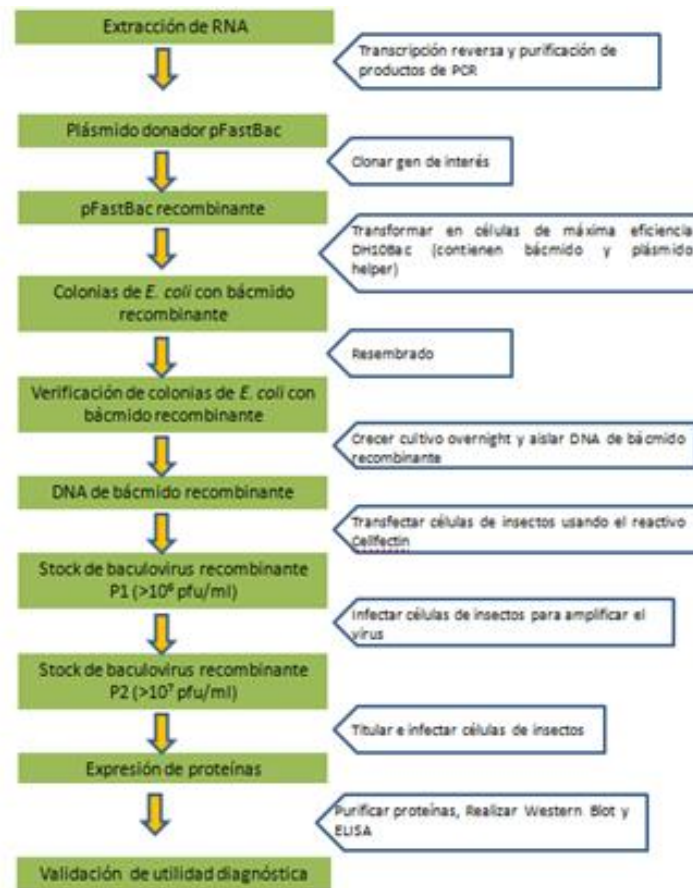


Figura 4. Flujograma de clonamiento y expresión en el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen).

Adaptado de Bac-to Bac ® baculovirus expression system (2004)

5.1 Diseño de primers para clonamiento

Se diseñaron primers para clonamiento para amplificar a la proteína completa TsAg5, y el dominio tripsina. Para el diseño de primers se utilizó la secuencia de mRNA de TsAg5 localizada en GenBank con identificación HQ393478.1 y se utilizaron los programas en línea primer BLAST y BLAST. Se tuvo en cuenta en el diseño los sitios de clonación del vector

Figura 5. Sitio de clonamiento múltiple del vector pFastBac HT-A. El sitio de restricción BamHI se encuentra en la posición 4127 y el sitio de restricción MfeI se encuentra en la posición 4332. Además, se verificó que no hubiera sitios de corte de las enzimas de restricción en la secuencia de los genes que se quería clonar. A pesar de que el sitio de corte de la enzima MfeI se encontraba fuera del sitio de clonamiento múltiple, lo que nos indica que pudo cortar la señal de poliadenilación, se decidió utilizar esta enzima para hacer el clonamiento debido a que se observó que era una de las pocas enzimas que no cortaba la secuencia del gen que codifica a TsAg5 completa.

5.2 Obtención de cisticercos para la extracción de ARN.

Se usó cisticercos de cerdos infectados naturalmente que no hayan tenido tratamiento alguno, recolectados y donados por el Grupo de Cisticercosis en el Perú (CWGP).

5.3 Extracción de RNA

Se extrajo mRNA de cisticercos obtenidos de cerdos infectados utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante con la finalidad de utilizar el mRNA para producir cDNA. Brevemente, se homogenizó aproximadamente 200 mg de cisticercos en 1 ml de reactivo Trizol utilizando un homogenizador de tejidos Omni™ con puntas azules Omni™ y un tubo eppendorf de 2 ml; se incubó en frío y se le agregó 200 ul de cloroformo, se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos y se realizaron lavados con isopropanol al 75%, se precipitó con etanol al 75% y se suspendió con agua libre de RNAsas. Se comprobó la integridad del RNA realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Por último, se realizó las lecturas de concentración utilizando espectrofotometría (Nanodrop 2000).

5.4 Transcripción reversa para obtener cDNA

Se sintetizó cDNA utilizando un kit de amplificación de RT-PCR (oligodT) siguiendo el protocolo de Applied Biosystems con la finalidad de utilizar el cDNA como molde para amplificar la proteína de interés. El perfil de síntesis de cDNA fue de 25°C por 10 minutos, 48°C por 30 segundos, 95°C por 5 minutos por un ciclo.

5.5 Amplificación de los productos por PCR

Se amplificaron los productos de PCR convencional utilizando el Máster Mix de PCR Phusion Flash de alta fidelidad (Thermo Scientific), minimizándose así la introducción de mutaciones que podrían afectar la estructura de TsAg5 cuando sea expresada. Se utilizaron los reactivos de la tabla 1 y se puede observar las condiciones de la PCR para amplificar el gen de TsAg5 completa y el dominio tripsina en la tabla 2. Además, se comprobó la amplificación de los productos a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Reactivos utilizados la amplificación de TsAg5 completa y dominio tipo Tripsina por PCR convencional.

Reactivo	[Inicial]	[Final]	Volumen (ul)
2X Phusion Flash PCR Master Mix	2X	1X	10
Primer forward	10 uM	0.5 uM	1
Primer reverse	10 uM	0.5 uM	1
cDNA		100 ng	1
Agua PCR			7
Volumen final			20

Tabla 2. Condiciones de la PCR para amplificar a proteína completa y el dominio tripsina.

Temperatura en °C	Tiempo	N° de ciclos
98	10 segundos	1
98	1 segundo	30
62	5 segundos	
72	25 segundos	
72	1 minuto	1

5.6 Purificación de los productos de PCR

Se purificaron los productos de PCR y el vector pFastBac-HTA utilizando el kit PCR quick spin siguiendo el protocolo del fabricante con la finalidad que no ingresen impurezas que podrían afectar la clonación. Brevemente, se utilizaron tubos de microcentrífuga para agregar los productos de amplificación o el vector pFastBac-HTA, se añadieron 500 ul de Binding Buffer y se mezcló por inversión para incubarlo por 1 minuto a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 13 000 rpm por 1 minuto, se agregó 700 ul de Washing Buffer, se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm por 1 minuto y por último se agregó 40 ul de Elution Buffer para obtener el eluido que contenía los productos purificados. Se midieron las concentraciones utilizando espectrofotometría (Nanodrop 2000).

5.7 Construcción de plásmido recombinante pFastBac HT-A

5.7.1 Digestión de productos de PCR y vector pFastBac HT-A con enzimas de restricción

Se digirieron los productos de PCR y el vector pFastBac HT-A (figura 5) con la finalidad de clonar estos productos en el vector. Para esto, se utilizaron 2 enzimas de restricción que corten tanto el inserto como el vector. Para escoger las enzimas de restricción que se utilizaron, se tuvo en cuenta que estas enzimas no deben cortar el inserto en la región codante y deben estar en la localización deseada en el vector recipiente. Se escogió al vector pFastBac HTA debido a que posee una etiqueta de seis histidinas y un sitio de corte para una proteasa, lo cual facilitará la purificación de la proteína expresada.

5.7.2 Ligación

Se realizó la ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs) con un volumen total de 20 ul. La ligación se realizó “overnight” y la relación volumen de inserto/vector fue de 3 a 1. Se utilizó 100 ng de DNA total por cada reacción de ligación (Sambrook *et al*, 1989). En este paso, se incluyeron controles negativos en paralelo, los cuales consideraron al vector sin inserto en una reacción de ligación. Esto último se realizó como control del proceso de ligación.

5.7.3 Transformación de células de *E. coli*

Se transformaron células competentes de *E. coli recA* y *endA*, utilizando shock térmico. Para seleccionar a las transformantes se usaron placas de LB agar con 100 ug/ml de Ampicilina, es decir, se seleccionaron las colonias que crecieron en presencia de Ampicilina debido a que estas eran las que contenían el plásmido.

5.7.4 Extracción de plásmidos

Se extrajo el DNA plasmídico utilizando el método de lisis alcalina. Brevemente, se picaron colonias que crecieron en agar LB con Ampicilina y se cultivaron en agar líquido LB a 37°C “overnight”. Luego se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 minutos para eliminar el sobrenadante, se utilizaron las soluciones I (15 mM Tris Cl, EDTA, 10 mM EDTA, 100 ug/ul RNAsa A, pH 8), II (0.2 N NaOH, 1% SDS) y III (Acetato de potasio 3 M), y se centrifugaron a 13 000 rpm por 5 minutos para obtener el DNA plasmídico en el sobrenadante. Este fue precipitado utilizando isopropanol, lavado con etanol al 70% y suspendido en buffer TE pH 8.

5.7.5 Análisis de transformantes

Se realizaron ensayos de restricción utilizando digestiones simples y/o dobles. Se observó si el inserto se encontraba, utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1%. Además, se realizó PCR para amplificar el inserto y confirmar su presencia. Y por último se envió a secuenciar las clonas para observar si el inserto estaba en la dirección correcta para expresarse y para verificar que no había errores de secuencia generados durante la amplificación por PCR.

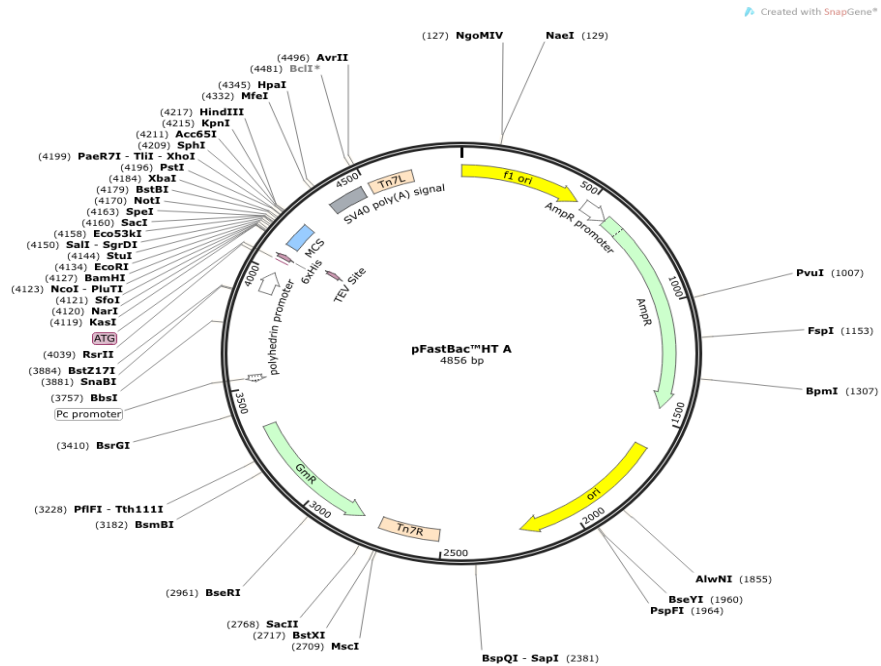


Figura 6. Plásmido pFastBac HTA. Generado por SnapGene.

5.8 Generación del báculo recombinante

Una vez que tuvimos nuestro vector pFastBac HT-A recombinado, es decir con el inserto, procedimos a transformar células DH10Bac por shock térmico. Estas células contienen un báculo y plásmido helper. En las células DH10Bac ocurrió una transposición sitio-específica del inserto, en este caso del gen que codifica a la proteína TsAg5 y/o el dominio tripsina, en el báculo, ocurre una transposición mediada por una transposasa Tn7 que se expresa a partir del plásmido helper. El báculo es DNA de baculovirus que contiene un replicón mini-F, un marcador de selección y un sitio de transposición Tn7 en la secuencia que codifica un péptido LacZ. Se ingresó un plásmido donador, el cual contiene la secuencia de cDNA deseada y un marcador de selección de resistencia a gentamicina que se posiciona entre los brazos izquierdo y derecho de Tn7 con la ayuda de la transposasa codificada por el plásmido helper. El resultado fue un báculo recombinante que fue utilizado para transfectar

células de insecto (Jarvis, 1997). Además, se utilizó una selección azul/blanco para reconocer las colonias con báculos recombinantes. Brevemente, se incubaron las células DH10Bac más 1 ng del plásmido pFastBac transformado con el inserto en hielo por 30 minutos. Luego se realizó el shock térmico llevando las células a 42°C por 45 segundos y luego a hielo por 2 minutos. Se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en medio SOC y se sembró cada dilución en placas con agar LB más Kanamicina, Tetraciclina, Gentamicina, IPTG y X-Gal, esto último para realizar una selección por antibióticos y para poder hacer una selección de colonias blancas y azules. Por último, se incubaron las placas por 48 horas a 37°C.

5.9 Verificación de presencia de báculo recombinante

Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en agar LB con Kanamicina, Gentamicina, Tetraciclina, X-Gal e IPTG. Al ocurrir la transposición del inserto entre los brazos izquierdo y derecho de Tn7 se rompió la expresión del péptido LacZ, por lo que se observó como colonias blancas en presencia de X-Gal e IPTG.

5.10 Aislamiento de báculo recombinante

Se extrajeron las colonias blancas (con inserto) y se purificaron los plásmidos por lisis alcalina (Midiprep). Cabe resaltar que el Midiprep puede darnos de 20-50 ng de DNA. Se verificó si las colonias contenían el báculo recombinante a través de una PCR convencional utilizando los primers M13 forward y M13 reverse (que hibridan con los sitios que bordean los sitios de inserción para Tn7) y los primers diseñados para amplificar los genes recombinantes. Se visualizaron los productos con una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar el DNA de alto peso molecular. En las colonias blancas en que ocurrió la recombinación del báculo se observó bandas de 2430 pb más el peso de nuestro inserto. Es

decir, en el caso del gen de la proteína completa, se observó un producto de amplificación de 3867 pb, mientras que en el caso del dominio tripsina se observó un producto de amplificación de 3330 pb.

5.11 Cuantificación de células de insecto

Los fabricantes del sistema de expresión baculovirus Bac-toBac® (Invitrogen) recomiendan utilizar células Sf en medio de cultivo celular de insecto no suplementado. Estas células son las más utilizadas con vectores de expresión de AcMNPV y se han descrito 2 líneas, la Sf-21 y la Sf-9. Ambas líneas fueron originadas de tejidos de ovarios de pupas de *Sporodoptera frugiperda* (O'Reilly, 1997). Se utilizaron células Sf-9 debido a que las Sf-21 son más frágiles que las Sf-9, además son menos tolerantes a cambios en la osmolaridad, cambios en el pH, estrés mecánico y tienen una tasa menor de crecimiento (O'Reilly *et al*, 1992; Drugmand *et al*, 2012).

Se realizó la cuantificación de células de insecto, para esto se separó 1 mL de cultivo celular crecido y se hizo una dilución con medio no suplementado de Grace. Se mezcló con reactivo de Tripán Blue y se colocó en una cámara de Neubauer para realizar la lectura del número de células en el microscopio. Para proceder con transfección se consideró que más del 97% de las células estuvieran vivas y viables.

5.12 Transfección de células de insecto.

Para realizar la transfección de las células Sf-9 se utilizó el reactivo Cellfectin® (Invitrogen), el cual es un lípido catiónico que viene en forma de liposomas. Este reactivo forma micelas alrededor de los baculovirus lo que facilita la entrada del virus a las células de insecto. Además, se incluyó un control negativo que constó de células no infectadas.

Brevemente, con los datos del número total de células de insectos, se calculó el volumen requerido para tener 1 millón de células en 2 mL (por cada pozo). Luego se prepararon 100 uL de medio (SF-900II o medio no suplementado de Grace) con 5 ug, 10 ug, 20 ug, 40 ug y 80 ug del bécrido en diferentes tubos numerados del 1 al 5, y se consideró como control negativo, células que no estaban infectadas.

Asimismo, en otros tubos se preparó una mezcla de 8 ul de Cellfectin® (miscelas) con 100 ul de medio (SF-900II o medio no suplementado de Grace). Cabe resaltar que se preparó esta mezcla por cada tubo con bécrido y medio, y a estos tubos se les denominó tubos 6, 7, 8, 9 y 10. Luego se juntó la mezcla de Cellfectin® con cada dilución de bécrido recombinante (es decir el tubo 1 con el tubo 6, el tubo 2 con el tubo 7, el tubo 3 con el tubo 8, el tubo 4 con el tubo 9 y el tubo 5 con el tubo 10) y se incubó por 15 minutos protegidos de la luz (los baculovirus son fotosensibles). Luego, se tomó el contenido total de la mezcla de cada tubo (con tip de 1000 uL) y por goteo se distribuyó en toda la superficie de un pozo de una placa de 6 pozos que contuviera 1 millón de células en 2 ml y se incubó por 5 horas a 27°C. Por último, se extrajo el medio inicial y se le reemplazó con 2 ml de medio Grace 1X con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico 1X (Gibco).

Las células Sf9 se revisaron a diario al microscopio en búsqueda de signos de infección tardía, que es cuando ocurre la producción de proteínas cuya expresión es controlada por el promotor de polihedrina (en este caso el gen recombinante); el baculovirus tiene capacidad lítica, por lo que las células deben cosecharse antes de que ocurra esta lisis. La transfección viral induce cambios citopáticos como la caída en el número de células, la disminución de la viabilidad, el aumento del tamaño celular y la pérdida de adherencia celular (Üstün-Aytekin, 2014). Se encontró que la mayoría de las células en infección tardía se veían más redondeadas

y grandes que las del control negativo (células sanas), puesto que estaban a punto de entrar en lisis celular; además, se observó una mayor cantidad de células muertas y una mayor cantidad de células que se encontraban flotando (por haber perdido su capacidad de adherencia). En nuestro caso, al octavo día se observó estos signos de infección tardía, que es cuando se realizó la cosecha de las células que estaban produciendo las proteínas recombinantes

5.13 Aislamiento del stock viral P1

Se recolectó el medio que contiene el virus de cada pozo con diferentes concentraciones de báculo (2 ml aproximadamente), y se transfirieron a tubos snap-cap de 15 ml estériles. Se centrifugaron los tubos a 500 x g por 5 minutos para eliminar las células y el detrito. Los sobrenadantes claros se transfirieron a tubos snap-cap de 15 ml nuevos (este fue el stock viral P1)-y se almacenaron a -4°C protegidos de la luz para su posterior uso en la amplificación del stock viral.

5.13.1 Determinación del stock viral

Se determinaron los títulos del stock viral a través de un ensayo en placa. Para esto, el día de la infección, se cultivaron células Sf-9 y se prepararon 30 ml de suspensión celular (5×10^5 células/ml en medio Sf-900 II SFM). Se colocó 2 ml de la suspensión celular en cada pozo de 2 placas de 6 pozos cada una. Se dejó que las células se queden en el fondo del plato y se incubaron a temperatura ambiente cubiertas por una hora. Las células debían estar en confluencia de 50%. Luego se preparó una dilución serial 8-log (10^{-1} a 10^{-8}) del stock de baculovirus en Sf-900 II SFM. Para esto se diluyó secuencialmente 0.5 ml del stock en 4.5

ml de medio. Luego, se incubaron las células Sf9 con las diluciones virales por 1 hora a temperatura ambiente.

Comenzando desde la más alta dilución (10^{-8}) a la más baja dilución (10^{-3}), se retiró el medio que contiene el virus de los pozos y se reemplazó con 2 ml de medio de plaqueo (Agarosa al 1%). Se dejó que la agarosa se endurezca por 10-20 min a temperatura ambiente y se incubaron las células a 27°C en una incubadora humidificada por 7-10 días, hasta que las placas se hicieron visibles y se pudieran contar. Además, se agregó la solución Neutral Red en el día 4, puesto que este es un colorante supravital que se acumula en los lisosomas de células viables, es decir, permite distinguir más fácilmente las células vivas de las muertas, como las presentes en las placas.

Para hallar los títulos virales se contó el número de placas presentes en cada dilución, y se utilizó la siguiente fórmula para calcular los títulos (ufp/ml) del stock viral (el rango óptimo es 3-20 placas por pozo).

$$\text{Título viral (ufp/ml)} = \text{Número de placas} \times \text{factor de dilución} \times \frac{1}{\text{ml de inóculo/pozo}}$$

Por ejemplo, si agregamos 1 ml de inóculo y observamos 20 placas en un pozo que contiene una dilución viral de 10^{-6} -se tendrá,

$$\text{Título viral (ufp/ml)} = 20 \text{ placas} \times 10^6 \times \frac{1}{1} = 2 \times 10^7 \text{ ufp/ml}$$

1 ml de inóculo/pozo

5.13.2 Amplificación de los títulos virales

Para amplificar el stock viral P1 se utilizó P1 para infectar células Sf9 a una Multiplicidad de infección (Multiplicity of Infection (MOI)) de 0.05 a 0.1. MOI se define como el número de partículas de virus por célula, y para obtener una MOI específica se debe calcular cuánto del stock viral se debe agregar a las células de insecto con la siguiente fórmula:

$$\text{Inóculo requerido (ml): } \frac{\text{MOI (ufp/célula)} \times \text{número de células}}{\text{Título del stock viral (ufp/ml)}}$$

Por ejemplo, si se quiere infectar con una MOI de 1 y tenemos 1×10^6 células de insecto Sf9 en el pozo y 2×10^7 ufp/ml de título viral, debemos calcular el inóculo requerido para hacerlo de la siguiente manera:

$$\text{Inóculo requerido (ml): } \frac{1(\text{ufp/célula}) \times 10 \times 10^6 \text{ células}}{2 \times 10^7 \text{ ufp/ml}} = 0.5 \text{ ml}$$

Por lo tanto, utilizaríamos 0.5 ml de inóculo inicial para infectar 10×10^6 células con una MOI de 1. Entonces, si queremos amplificar el stock viral P1 con un MOI de 1, utilizaríamos un inóculo de 0.5 ml para infectar 10×10^6 células. El stock P1 debe ser centrifugado a baja velocidad (500 x g por 5 minutos) para obtener el sobrenadante, el cual debe pasar por un filtro de proteínas de 0.2 μm . Este filtrado puede utilizarse para infectar cultivos de células más grandes y obtener el stock P2. Se puede utilizar luego el stock P2 para infectar cultivos celulares más grandes y obtener el stock viral P3.

5.14 Expresión de proteína.

Primero, se sembró 6×10^5 células Sf9 por pozo en una placa de 6 pozos y se dejó que las células se adhieran por al menos 30 minutos. Luego, se retiró el medio y se lavó las células una vez con medio de crecimiento fresco, para luego reemplazarlo con 300 ul de medio fresco.

Se agregó el stock P1 a frascos con cultivos celulares de células de insecto Sf9 a una MOI de 1y se incubaron las células en una incubadora humidificada a 27°C. Luego, se cosecharon las células y el medio tras observar signos de infección tardía. Para cosechar, se retiró el medio y se lavó las células una vez con medio libre de suero. Se recolectaron estas células en un tubo snap cap y se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos. Para comprobar la presencia de bácmidos recombinantes, se extrajo DNA viral a partir de 300 ul del medio retirado inicialmente. Las células se lisaron con 400 ul de buffer SDS-PAGE 1X (62.5mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS). Por último, se comprobó la expresión de las proteínas. Cabe resaltar que las células de insecto infectadas por un bácmido recombinante expresan las proteínas del baculovirus que las infectó y la proteína que codifica el gen recombinante incorporado en el bácmido.

Las muestras se congelaron a -20°C para almacenarlas. Posteriormente se hirvieron por al menos 3 min para separar y visualizar las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

5.15 Comprobación de la expresión y purificación del dominio tripsina y de la proteína completa a través de Western immunoblot.

Se comprobó la expresión y la purificación de las proteínas por western immunoblot, enfrentando las proteínas expresadas por las células de insectos Sf9 con sueros de conejos hiperinmunizados con TsAg5 y el dominio tripsina. Brevemente, tras la separación de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Luego las membranas fueron bloqueadas con PBS pH 7.3, 0.3% Tween 20 y leche descremada al 5% por 10 minutos. Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 1 hora a 37°C con sueros de conejos hiperinmunizados con TsAg5 o con el dominio tripsina. Por último, las proteínas fueron visualizadas utilizando una anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa, seguida de la adición de 3,3'diaminobenzadine.

Comprobada la expresión de TsAg5 y el dominio tripsina, se procedió a purificarlas por cromatografía de afinidad utilizando columnas His Trap HP (GE Healthcare), ya que los genes de dichas proteínas fueron clonados de modo que la proteína recombinante tenga una cola de 6 histidinas. Las columnas His Trap están empacadas con una resina que consiste en perlas de agarosa entrecruzada, donde se ha acoplado un grupo quelante. Este grupo quelante está precargado con níquel, que retiene de manera selectiva proteínas con grupos de histidina expuestos; es por esto que tiene la capacidad de retener a las proteínas recombinantes que se expresan con cola de histidina.

5.16 Obtención de las muestras de suero

Las muestras serológicas fueron proporcionadas por el Grupo de Trabajo de Cisticercosis del Perú.

5.17 Estandarización del ensayo de Western immunoblot utilizando sueros de cerdos con cisticercosis

Previamente a la realización del ensayo, se estimó la cantidad de anticuerpos (sueros de cerdos con cisticercosis porcina) y antígenos (TsAg5 expresada por células de insecto Sf9) que se utilizaron en el ensayo, para lo cual se realizó un “checkerboard” donde se probó utilizar diferentes concentraciones de anticuerpo primario (suero de cerdos con cisticercosis porcina); además, se probó diferentes agentes bloqueantes (leche al 5% y BSA al 3%). Una vez que se fijaron las condiciones adecuadas para hacer los ensayos, se realizó el Western immunoblot con sueros de cerdos individuales, del mismo modo que en el punto 5.15, solo que la membrana fue cortada en tiras que fueron las que se incubaron con los sueros de cerdos individuales. Brevemente. Se corrió un gel de poliacrilamida al 12% utilizando la proteína TsAg5 o el dominio tripsina. Luego, se realizó la inmunotransferencia utilizando una cámara de transferencia Trans Blot Cell de Bio Rad a una membrana de nitrocelulosa por 1 hora a 1 A. Se realizó el bloqueo utilizando PBS con leche descremada al 5% por 1 hora en agitación y posteriormente se lavó 3 veces con PBS con Tween 20 al 0.3%. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario (suero de cerdo con cisticercosis) diluido en PBS con leche descremada al 5%-y se lavó 3 veces con PBS al 0.5%. Luego se incubó con el anticuerpo secundario (Anti-IgG de cerdo) por 1 hora en agitación y se realizaron 3 lavados con PBS con leche descremada al 0.5%. Por último, se reveló utilizando DAB diluido en PBS, y se detuvo la reacción con peróxido de hidrógeno al 30%. Se observó si estaban presentes las bandas reactivas del tamaño correspondiente a la proteína TsAg5 (55 KDa) o al dominio tripsina (40 KDa).

5.18 Ensayos de actividad enzimática

Se comprobó que la proteína expresada tuviera actividad proteolítica a través de ensayos de actividad enzimática tipo tripsina. Para esto, se utilizó el sustrato Z-Arg (N Benzoil-Arg-7-Amido-4-methylcoumarine hydrochloride) (Sigma-Aldrich), el cual es un sustrato fluorogénico para tripsina; en presencia de actividad tipo tripsina se produce un corte en el sustrato que hace que se libere fluorescencia, la cual puede ser medida utilizando un Fluorómetro. Se midió la actividad del dominio tipo tripsina expresado en células de insecto Sf9, sin purificar, y como control negativo se utilizó células de Sf9 sanas, células de insecto infectadas con báculo sin inserto y proteína hervida a 100°C por 3 minutos. Además, se utilizó como control positivo Tripsina bovina en una dilución 1:2000 y como blanco solo se utilizó tampón de reacción (Fosfato pH7.3). Sumado a esto, se agregó un inhibidor de actividad tripsina (Pefabloc) para observar el comportamiento de la proteína. Se utilizó un Fluorómetro modelo Twinkle LB 970 de Berthold Technologies con una longitud de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm en reacciones de 85 ul. El tiempo de conteo (counting time) fue 1.5 segundos y la energía de lámpara (Lamp energy) 3000.

5.19 Aspectos éticos

Sobre las muestras que se utilizaron, estas fueron tomadas de acuerdo a lo estipulado en el protocolo aceptado por el Comité Institucional de Ética (CIE) como parte del proyecto de investigación titulado “Desarrollo de una prueba de inmunodiagnóstico para cisticercosis asociado a quiste único” con código SIDISI 61571, el cual ya ha sido revisado, registrado y calificado como éticamente, según el Manual de Procedimientos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en la categoría de Exonerado de Revisión.

VI RESULTADOS

6.1 Estandarización del método de expresión de TsAg5 en células de insecto Sf9, mediante transfección con un baculovirus.

6.1.1 Diseño de cebadores para amplificación de los genes que codifican la proteína TsAg5 completa y su dominio tipo tripsina

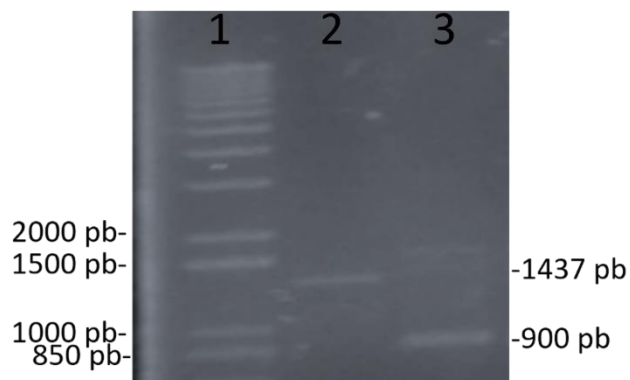
A partir del genoma anotado de *Taenia solium*, se identificaron las secuencias de nucleótidos y de cDNA de gen de TsAg 5 (localizado en genbank # HQ393478.1). A partir de estas secuencias se diseñó 1 par de cebadores para cada gen, los cuales tienen como blanco las zonas “upstream” y “downstream” del gen; este último se divide básicamente en dos dominios: un dominio de adherencia y uno de tripsina propiamente. Sin embargo, no se consideró clonar el dominio de adherencia debido a los pobres resultados que obtuvo Rueda y colaboradores en el 2011 (Rueda *et al*, 2011). En la tabla 3 podemos observar los cebadores diseñados para amplificar los genes que codifican el dominio tripsina y la proteína TsAg5 completa.

Tabla 3. Secuencias de los cebadores diseñados

Dominio	Secuencia (5'3')	Tm (°C)	Enzima de restricción
Dominio Tripsina	F: AAGGATCCAATGATTCTTAACGGGA R: CAATTGTTAGACTGTGTAGCGGTTGAT	65.1 66.4	BamHI MfeI
Proteína completa	F: AAGGATCCGATGGTAAGATCGCAG R: TTTTCAATTGTTAGACTGTGTAGCGGTT	67.1 66.4	BamHI MfeI

6.1.2 Clonación del gen de la proteína TsAg5 y dominio tripsina

6.1.2.1 Amplificación de los genes TsAg5 y dominio tripsina a partir de cDNA de cisticercos. Para realizar la clonación de los fragmentos amplificados a partir de cDNA de cisticercos, previamente se realizó una estandarización de PCR. En la fotografía 1 podemos ver una imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó para comprobar la amplificación de los productos de PCR del gen de la proteína completa (1437 pb) y del gen del dominio tripsina (900pb).

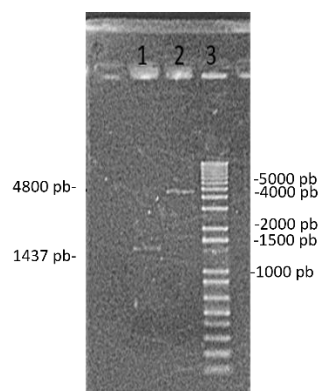


Fotografía 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: 1 Kb plus DNA Ladder.: Amplificación de TsAg5 completa (1437 pb) (Carril 2) y del dominio tripsina (900 pb) (Carril 3) por PCR convencional utilizando el máster mix High fidelity 2X Phusion Flash (Thermo Scientific).

6.1.2.2 Construcción del plásmido recombinante pFastBac

Se obtuvieron concentraciones de 28.5 ng/ul para los productos de PCR de TsAg5 completa y de 44.2 ng/ul para pFastBac-HTA tras la digestión simple con BamHI y la purificación por columna con kit medidas por espectrofotometría (Nanodrop 2000). Sumado a esto, se obtuvieron concentraciones de 3.8 ng/ul para los productos de PCR y de 5.7 ng/ul para

pFastBac-HTA tras la digestión simple con MfeI y la purificación por gel con beads, medidas por espectrofotometría (Nanodrop 2000). Y se observaron las bandas correspondientes a los productos de PCR (1437 pb) y pFastBac-HTA (4.8 Kb) (fotografía 2). Sin embargo, para el caso del dominio tripsina la digestión, tanto del plásmido (pFastBac-HTA) como del producto de PCR, fue doble, es decir, se utilizaron ambas enzimas al mismo tiempo en una sola reacción. Y tras la purificación por gel con beads con el kit QIAEX II (Qiagen), se obtuvieron concentraciones de 5.7 ng/ul de plásmido y 11 ng/ul de producto de PCR.

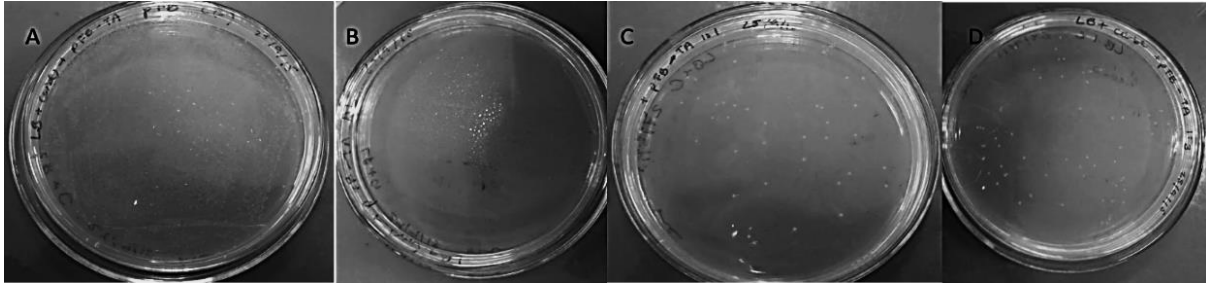


Fotografía 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Digestión de TsAg5 completa y plásmido pFast Bac con enzimas de restricción BamHI y MfeI. Carril 1: Proteína completa digerida con BamHI y MfeI (1437 pb). Carril 2: pFastBac digerido con BamHI y MfeI (4.8 Kb). Carril 3: 1 kB plus DNA ladder

Tras comprobar los pesos tanto de los productos de PCR como el vector que se utilizarían para la clonación, se procedió a realizar la ligación con razones molares vector: inserto 1:1 y 1:3. Además, se consideró un control negativo, un control autoligado y un control positivo (células competentes transformadas con el vector no digerido).

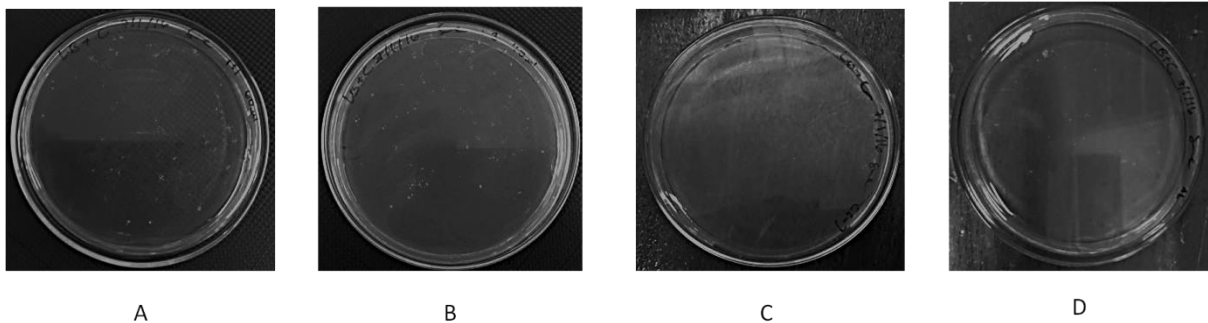
Como podemos observar en las fotografías 3 y 4, hubo crecimiento de colonias tras la transformación con los plásmidos recombinantes. El crecimiento en el control autoligado fue muy escaso, lo que nos indica que las colonias que crecieron en las placas transformadas con ratios molares 1:1 y 1:3 vector: inserto podrían presentar el plásmido recombinante. Además, no hubo crecimiento alguno en el control negativo, lo que indica que no hay contaminación de las células competentes. Seguido a esto, se realizó la extracción de los plásmidos para corroborar que estos tuvieran el inserto. Como podemos observar en la fotografía 5, los plásmidos recombinantes en los carriles 4, 7 y 8 (clonas 3, 6 y 10 respectivamente) eran un poco más grandes que el plásmido pFastBac-HTA solo presente en el carril 1. De igual modo, en la fotografía 6 se puede observar que las clonas 2, 4, 5, 7, 9, 10, 13, 14 y 15 son más grandes que el plásmido solo pFastBac-HTA presente en el primer carril. Debido a esto, se decidió hacer los ensayos de restricción en estas clonas realizando tanto digestiones simples como dobles. En la fotografía 7, podemos observar que las clonas 6 y 10 presentes en los carriles 12 y 13 liberaron un inserto del tamaño aproximado de la proteína completa (1437 pb), lo que indicaría que la clonación de esta proteína en pFastBac-HTA había sido exitosa. Además, se realizaron ensayos de restricción en las clonas conteniendo el dominio tripsina; sin embargo, hubo problemas en estos ensayos debido a que las clonas no eran cortadas adecuadamente por las enzimas de restricción por causas desconocidas. Por ello, se procedió a realizar el secuenciamiento de las clonas 3, 6 y 10 pertenecientes a clonas con TsAg5 completa y de las clonas 1, 7 y 9 pertenecientes a las clonas con dominio tripsina. Los resultados mostraron que las tres clonas pertenecientes a TsAg5 completa y las clonas 1 y 9 pertenecientes al dominio tripsina eran de tipo nativo (datos no mostrados), es decir, no presentaban mutaciones en su secuencia, por lo que se procedió a hacer la transposición del inserto con el báculo en células de *E. coli* DH10Bac.

Cabe mencionar, que de las clonas 3, 6 y 10, pertenecientes a la clonas con TsAg5 completa, solo las clonas 6 y 10 liberaron el inserto de 1437 pb, sin embargo, tras el secuenciamiento se pudo observar que la clona 3 también tenía el inserto sin mutaciones. Algo que podría explicar esto es que las enzimas de restricción tuvieron dificultades para cortar la secuencia, quizás por la presencia de inhibidores del corte que pudieron haber quedado tras la extracción

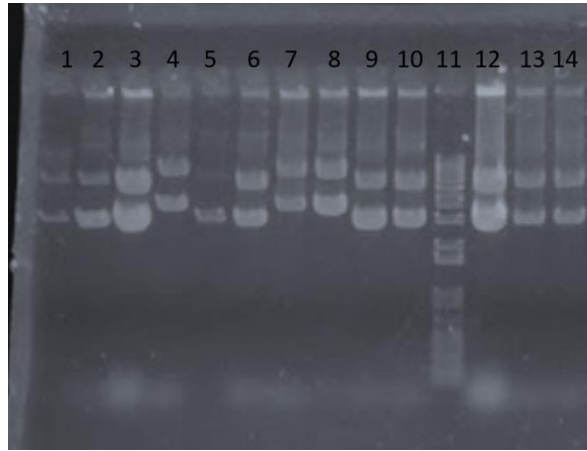


de plásmidos por lisis alcalina.

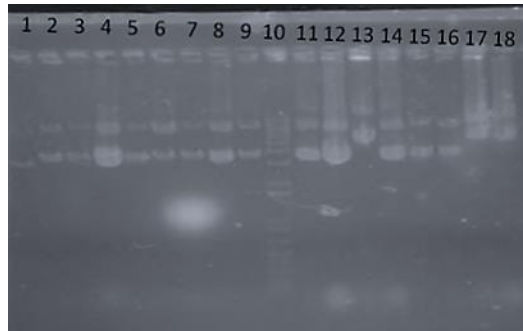
Fotografía 3. Clonamiento de TsAg5 completa. A: Control positivo. B: Control autoligado. C: Transformación con ligación con ratio molar inserto: plásmido 1:1. D: Transformación con ligación con ratio molar inserto: plásmido 3:1.



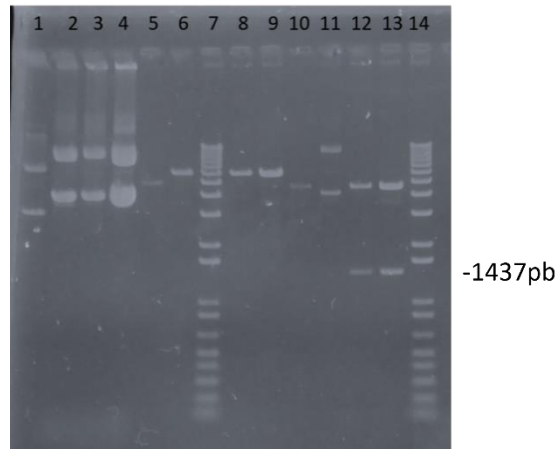
Fotografía 4. Clonamiento de Dominio Tripsina. A: Transformación con ligación con ratio molar inserto: plásmido 1:1. B: Transformación con ligación con ratio molar inserto: plásmido 3:1. C: Control negativo. D: Control autoligado.



Fotografía 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de clonas con la proteína completa. Carril 1: pFastBac-HTA. Carriles 2-10: Clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11 y 12. Carril 11: 1 Kb plus DNA ladder. Carriles 12-14: Clonas 13, 15 y 16.



Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de clonas con el dominio tripsina. Carril 1: pFB-HTA. Carriles 2-9: clonas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. Carril 10: 1 KB plus DNA ladder. Carriles 11-18: Clonas 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 18.



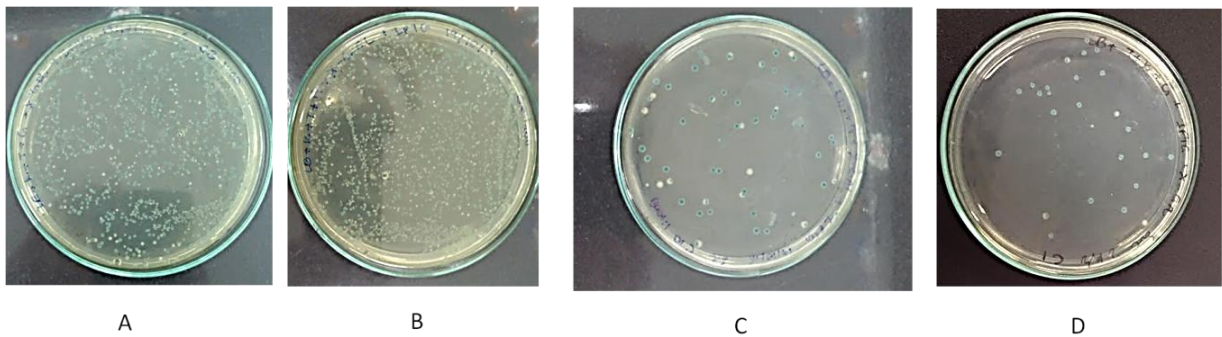
Fotografía 7: Análisis de restricción de las clonas con TsAg5 completa. Carril 1: pFastBac-HTA. Carril 2-4: Clona 3, 6 y 10. Carril 5: pFastBac-HTA digerido con BamHI. Carril 6: Clona 3 digerida con BamHI. Carriles 7 y 14: 1 Kb plus DNA ladder. Carril 8-9: Clona 6 y 10 digerida con BamHI. Carril 10: pFastBac-HTA digerido con BamHI y MfeI. Carril 11-13: Clona 3, 6 y 10 digerida con BamHI y MfeI.

6.1.3 Expresión de TsAg5 completa y dominio tripsina en sistema de baculovirus

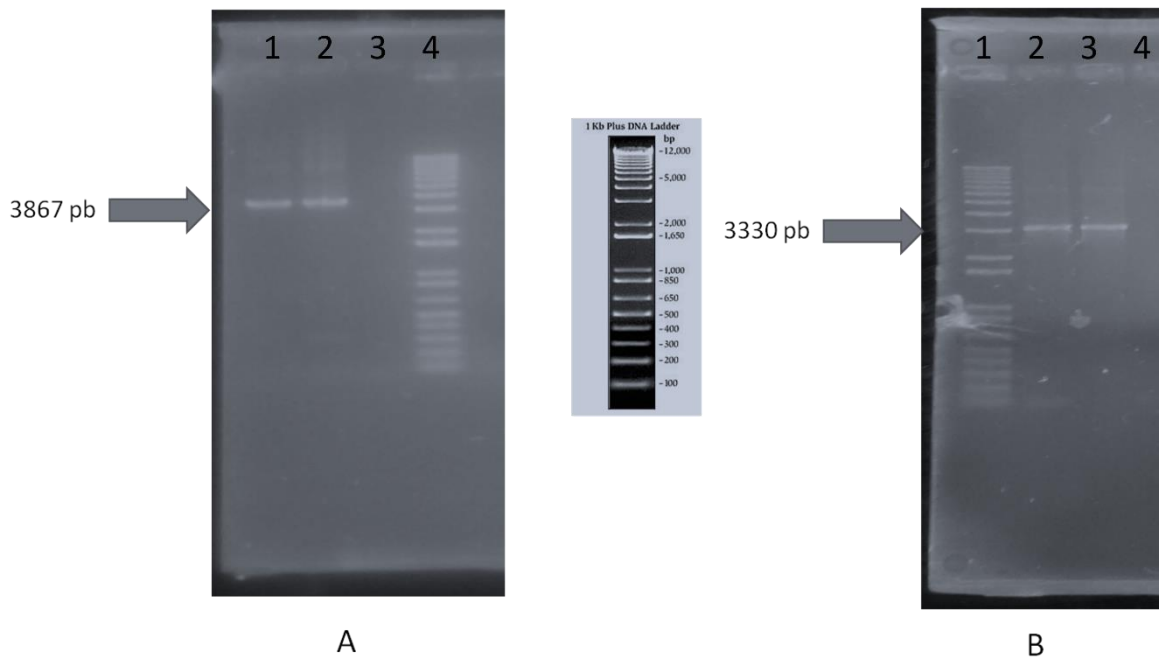
6.1.3.1 Transposición de pFastBac-TsAg5 completa y dominio tripsina con el bÁcmido de *E. coli* DH10Bac

En la fotografía 8 podemos observar el crecimiento de colonias blancas en agar LB con 10 ug/mL de Tetraciclina, 50 ug/mL de Kanamicina, 5 ug/mL de Gentamicina, 40 ug/mL de IPTG y 100 ug/mL de X-gal, en la transposición de 4 clonas (3 clonas correspondientes al gen que codifica TsAg5 completa y una clona correspondiente a la transposición del gen que codifica el dominio tripsina). Podemos concluir que ocurriÓ la transposición del gen de la proteína completa y del dominio tripsina en el bÁcmido de las células DH10Bac exitosamente. Para comprobar esto, se procedió a realizar una PCR con cebadores pUC/M13, los cuales amplificaron un producto de 2430 pb más el tamaño del gen. Esto se verifica al

observar la fotografía 9, en la cual se observa la corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% del producto de amplificación obtenido a partir de DNA de báculo por PCR convencional, utilizando cebadores pUC/M13. En la fotografía 9A, podemos observar la amplificación del DNA de báculo con el gen correspondiente a la proteína completa (3867 pb), y, además, en la fotografía 9B- podemos observar la amplificación del DNA de báculo con el gen correspondiente al dominio tripsina (3330 pb).



Fotografía 8. Transposición del gen que codifica TsAg5 completa en a partir de diferentes clonas A: clona 3 B: clona 6 C: clona 10. D: Transposición del gen correspondiente al dominio tripsina (clona 1)

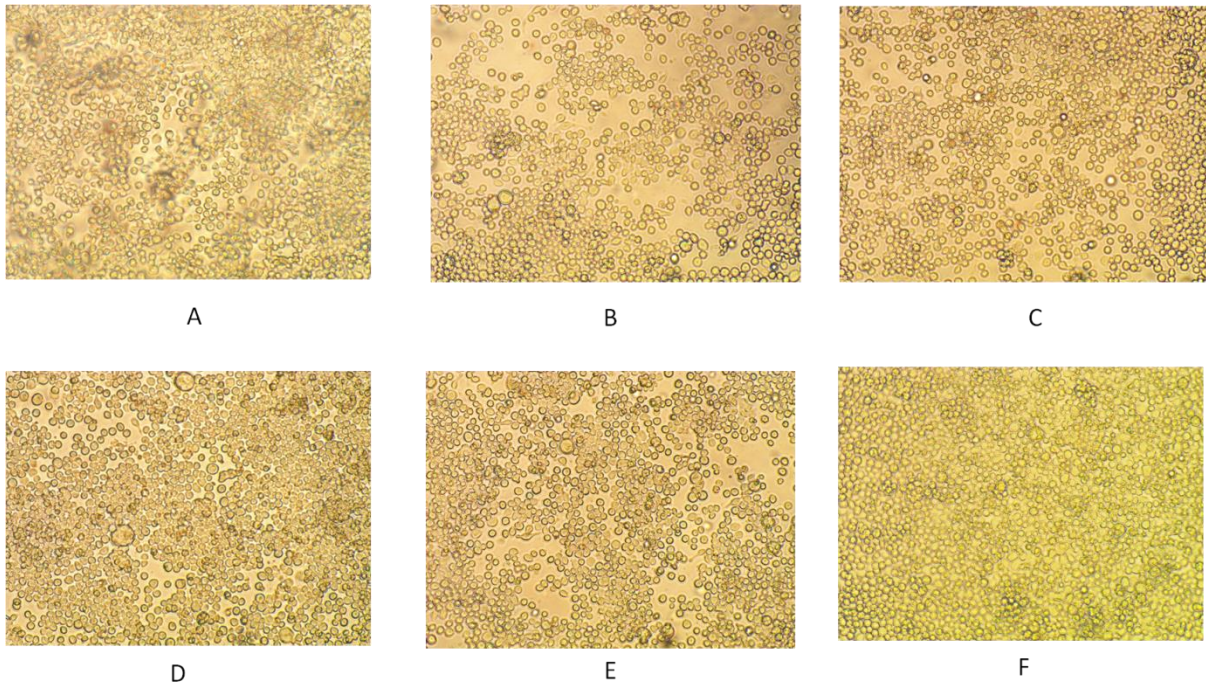


Fotografía 9. Electroforesis en gel agarosa al 1%. A: Amplificación por PCR de b́acmidos conteniendo el gen que codifica TsAg5 completa. Carril 1: clona 6. Carril 2: clona 10. Carril 3: Control negativo (máster mix sin DNA). Carril 4: 1 Kb plus DNA ladder. B: Amplificación por PCR de b́acmidos conteniendo el gen-que codifica el dominio tripsina. Carril 1: 1 Kb plus DNA ladder. Carril 2 y 3: B́acmido de la clona 1. Carril 4: control negativo (máster mix sin DNA).

6.1.4 Expresión de proteínas recombinantes en el sistema baculovirus

6.1.4.1 Infección de las células Sf9 sanas con partículas virales

Después de 8 días de incubación post-transfección observamos señales de infección tardía de las células de insecto (fotografía 10). Se suspendieron las células de cada pozo, se centrifugaron y el sobrenadante se usó para infectar células sanas en spinner y/o en frascos de 75cm³, para posteriormente obtener más proteína de interés.

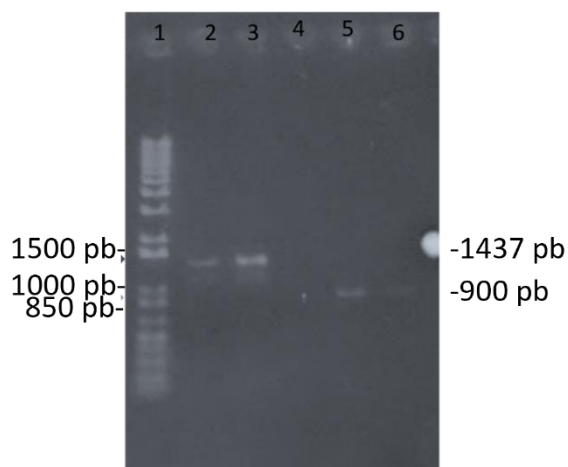


Fotografía 10.: Transfección de células Sf9 con TsAg5 completa al día 8. Células transfectadas con A: 5 ug de bÁcmido recombinante. B: 10 ug de bÁcmido recombinante C: 20 ug de bÁcmido recombinante. D: 40 ug de bÁcmido recombinante. E: 80 ug de bÁcmido recombinante. F: Control negativo (células de insecto sanas). Las células transfectadas se observaron con signos de infección tardía (aumento en el tamaño celular, pérdida de viabilidad y de adherencia celular), previamente a entrar a lisis celular.

6.1.4.2 Extracción de DNA viral utilizando el método de proteinasa K y Fenol-cloroformo-Alcohol isoamílico

Tras la cosecha de las células infectadas se tomó 300 ul del sobrenadante para utilizarlo para la extracción viral utilizando el método de proteína K y fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Luego se verificó la obtención de partículas virales a través de una PCR convencional

utilizando primers para la amplificación de los genes que codifican la proteína completa (1437 pb) y el dominio tripsina (900 pb) (Fotografía 11-).



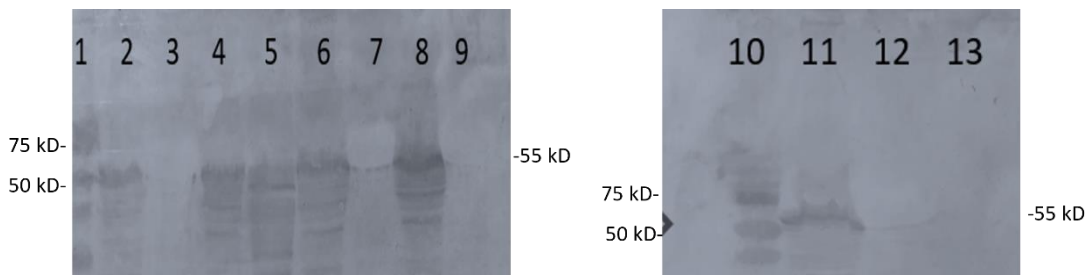
Fotografía 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: 1 Kb plus DNA ladder. Carriles 2 y 3: Amplificación del gen de la proteína completa a partir de DNA viral extraído mediante el método de proteína K y Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Carril 4: Control negativo (máster mix sin DNA viral). Carriles 5 y 6: Amplificación del gen del dominio tripsina a partir de DNA viral extraído mediante el método de proteína K y Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

6.1.4.3 Verificación de la expresión de las proteínas recombinantes TsAg5 y dominio tripsina

Se realizó un SDS-Page al 15% para verificar la expresión de la proteína, pero lamentablemente no se pudo realizar la visualización de la proteína posiblemente debido a la poca producción; sin embargo, se realizó un western immunoblot en los cultivos a pequeña escala de la proteína completa y dominio tripsina, utilizando sueros de conejos hiperinmunizados, encontrando resultados positivos. En las fotografías 12, 13 y 14 se

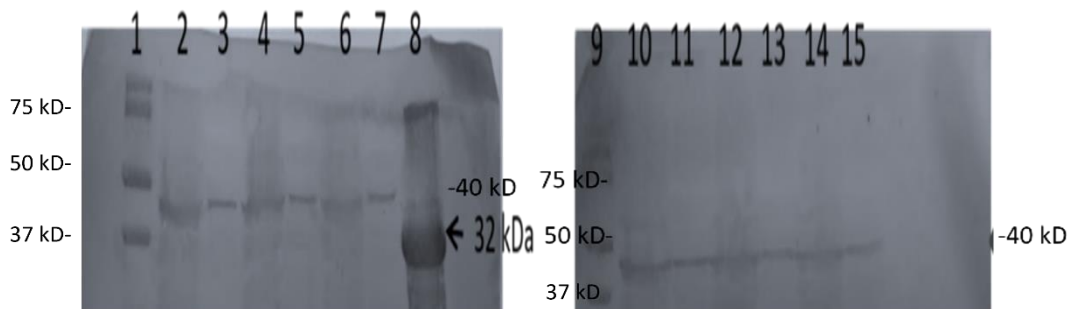
muestra la expresión con las bandas correspondientes a TsAg5 completa con un tamaño aproximado de 55 KDa (fotografía 12-) y al dominio tripsina con un tamaño aproximado de 40 KDa (fotografía 13 y 14-).

Se debe mencionar, que en la fotografía 12-, correspondiente al western inmunoblot de la expresión de la proteína TsAg5 completa, se ven múltiples bandas más pequeñas que la banda de 55 kD. Esto podría indicarnos que la proteína posiblemente se estaba degradando parcialmente, generando bandas más pequeñas de la misma proteína, ya que se utilizó anticuerpos anti TsAg5 de conejos hiperinmunizados. Además, en la fotografía 13 podemos notar que existe una diferencia en el tamaño entre el dominio tripsina expresado en *E. coli* (32 KDa) y el dominio tripsina expresado en células de insecto Sf9 (40 KDa), lo que puede explicarse por las modificaciones post traduccionales que provee el sistema eucariote.



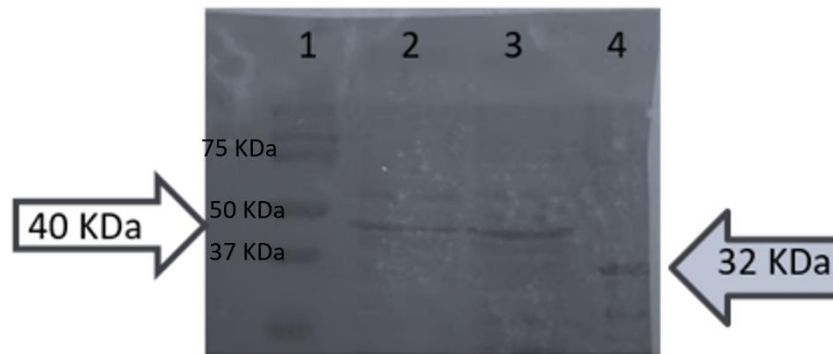
Fotografía 12. Western inmunoblot en una muestra del cultivo celular Sf9 infectada por 8 días con partículas virales que portan el gen correspondiente a la TsAg5 completa (55 kDa aproximadamente). Carril 1 y 10: Marcador Dual color. Carril 2 y 3: Pellet y sobrenadante de células de insecto infectadas con 5 ug de báculo recombinante. Carril 4 y 5: Pellet y sobrenadante de células de insecto infectadas con 10 ug de báculo recombinante. Carril

6 y 7: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 20 ug de bÁcmido recombinante. Carril 8 y 9: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 40 ug de bÁcmido recombinante. Carril 11: Pellet de células de insecto transfectadas con 80 ug de bÁcmido recombinante. Carril 12 y 13: Pellet y sobrenadante de células de insecto Sf9 sanas. Western blot se realizó con anticuerpos anti-TsAg5 de conejos hiperinmunizados.



Fotografía 13. Western inmunoblot de una muestra del cultivo celular Sf9 infectada por 8 días con partículas virales que portan el gen que codifica el dominio tripsina (40 KDa aproximadamente). Carriles 1 y 9: Marcador Dual color. Carril 2 y 3: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 5 ug de bÁcmido recombinante Carril 4 y 5: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 10 ug de bÁcmido recombinante. Carril 6 y 7: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 20 ug de bÁcmido recombinante. Carril 8: Dominio tripsina expresado en sistema de expresión procariote (*E. coli*). Carril 10 y 11: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 40 ug de bÁcmido recombinante. Carril 12 y 13: Pellet y sobrenadante de células de insecto transfectadas con 80 ug de bÁcmido recombinante. Carril 14 y 15: pellet y sobrenadante de células sanas Sf9 (sin infección). Western blot se realizó con anti – dominio

Tripsina de conejos hiperinmunizados. Pudimos notar que se observan las bandas correspondientes de 40 kDa en los carriles 14 y 15 (que contienen pellet y sobrenadante de células Sf9 sanas), esto fue causado por errores que ocurrieron al momento de cargar los pozos del gel de poliacrilamida, en el que ocurrió el traspaso del contenido de un pozo a otro. Esto se comprobó repitiendo el ensayo en el que ya no observamos dicha banda (datos no mostrados).



Fotografía 14. Western inmunoblot tras sonicado del pellet de las células transfectadas con dominio tripsina. Carril 1: Marcador Dual color. Carril 2: Fase insoluble. Carril 3: Fase soluble. Carril 4: Dominio Tripsina expresado en sistema procariote (*E. coli*) como control positivo. Se puede observar que la proteína se produce tanto de manera soluble como insoluble.

Sin embargo, tuvimos problemas durante la expresión TsAg5 completa debido a que a medida que se amplificaban la cantidad de partículas virales escalando a cultivos celulares más grandes, la proteína completa se dejó de expresar en su tamaño de 55 KDa. Al realizar el western inmunoblot de los cultivos, se observó proteínas de 40 KDa (del tamaño de

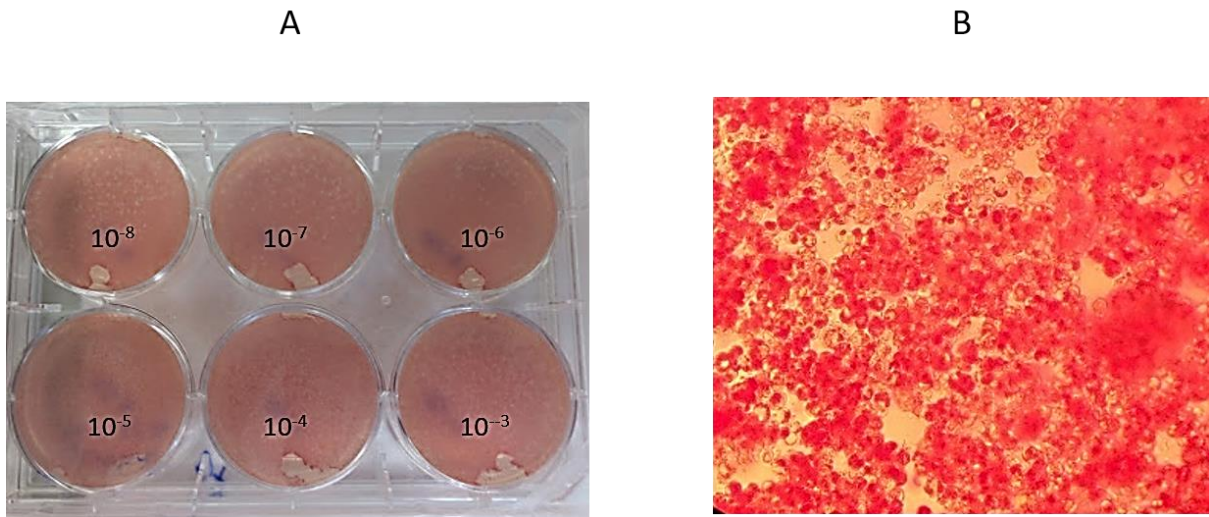
dominio tripsina); esto nos hizo pensar que la proteína estaba siendo degradada por sí misma o por otras proteasas presentes en los cultivos de células de insectos infectadas con baculovirus. Además, llegamos a pensar que, al expresar ambas proteínas al mismo tiempo, aunque en cultivos celulares distintos, los baculovirus con el dominio tripsina podrían haber migrado a los cultivos celulares que fueron transfectados con Baculovirus con proteína completa, por lo que se decidió esperar y solo usar TsAg5 completa para producir proteínas. Se usaron nuevos cultivos celulares y se comenzó todo el proceso nuevamente, pero ocurría lo mismo, la proteína se expresaba en un tamaño de 40 KDa; en este momento se decidió parar la producción de TsAg5 y solo producir el dominio tripsina para realizar los experimentos posteriores.

6.1.5 Determinación de títulos virales por ensayo en placa

Contamos 145 placas en una dilución de 10^{-8} , por lo que se calculó que habían 9.67×10^9 partículas virales (fotografía 15.). A partir de esto calculamos el inóculo requerido para infectar las células con una MOI definida. Se probaron diferentes MOI, 0.1, 0.5, 1 y 5, en la expresión de las proteínas de interés.

Las células transfectadas con un MOI de 0.1 fueron cosechadas en 10 días, las de 0.5 en 9 días, las de 1 en 7 días, mientras que la de 5 solo en el día 4. En cuanto a cantidad de proteína expresada, no se pudo observar que hubiera diferencia significativa en el ancho de las bandas de la proteína observada por western immunoblot (fotografía 16); por esta razón se decidió utilizar una MOI de 1, a que permite que las células produzcan proteína sin morir tan rápidamente. Algo resaltante, es la presencia de una banda inmediatamente inferior a la banda de 40 kD en el western immunoblot, que podría explicarse si la proteína se estuviera

autodegradando o siendo degradada por proteasas virales o de las células de insecto, generando versiones de la proteína más pequeñas.



Fotografía 15: Determinación de partículas virales por ensayo en placa. A: Placa de 6 pozos con células de insecto Sf9 infectadas con diferentes diluciones del stock viral (10^{-3} a 10^{-8}). B: Células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus recombinante con el gen del dominio tripsina y teñidas con Neutral Red (tinción que colorea células vivas, haciendo más simple de visualizar el crecimiento de placas que se observan de color amarillo).



Fotografía 16: Western inmunoblot del dominio tripsina producido bajo diferentes MOI. Carril 1: MOI de 0.1. Carril 2: Marcador Dual color. Carril 3: MOI de 0.5. Carril 4: MOI de 1. Carril 5: MOI de 5.

6.2 Obtención de la proteína TsAg5 expresada en células de insecto Sf9 parcialmente purificada.

6.2.1 Purificación de proteínas

6.2.1.1 Cromatografía de afinidad

Ya que el gen que codifica el dominio tripsina fue clonado de manera que este se fusione con una secuencia de seis histidinas en el extremo amino terminal, se intentó purificar la proteína expresada por cromatografía de afinidad utilizando columnas His Trap (Thermo Fisher). Para esto, se diluyó la proteína en buffer de unión (Binding Buffer) y se pasó por la columna, para luego eluirla con diferentes concentraciones de imidazol utilizando el sistema Biologic LP (Bio Rad). Como podemos observar en la figura 7, no hubo un pico correspondiente a la elución de la proteína en ninguna concentración de imidazol, lo cual indica que la proteína podría haber salido en el eluido inicial y no haberse fijado en la columna. Para verificarlo, se realizó un western immunoblot de diversos tubos recolectados durante la purificación y se observó que la proteína estaba en los tubos 5, 6 y 7 (fotografía 17), que correspondían al eluido inicial, lo que significa que la proteína no fue retenida por la columna.

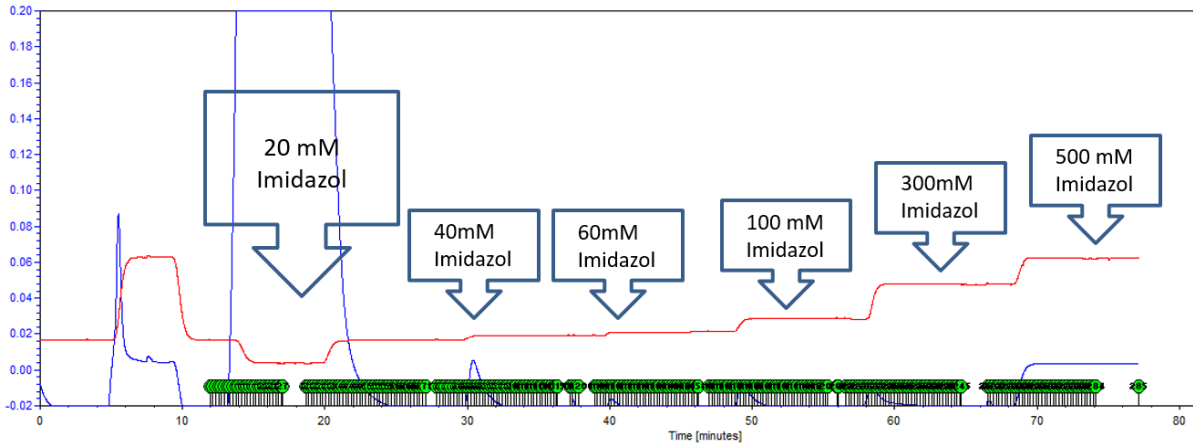
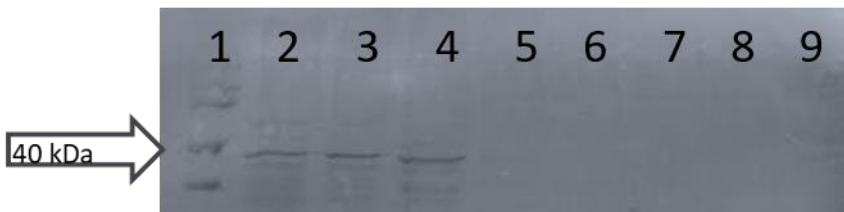


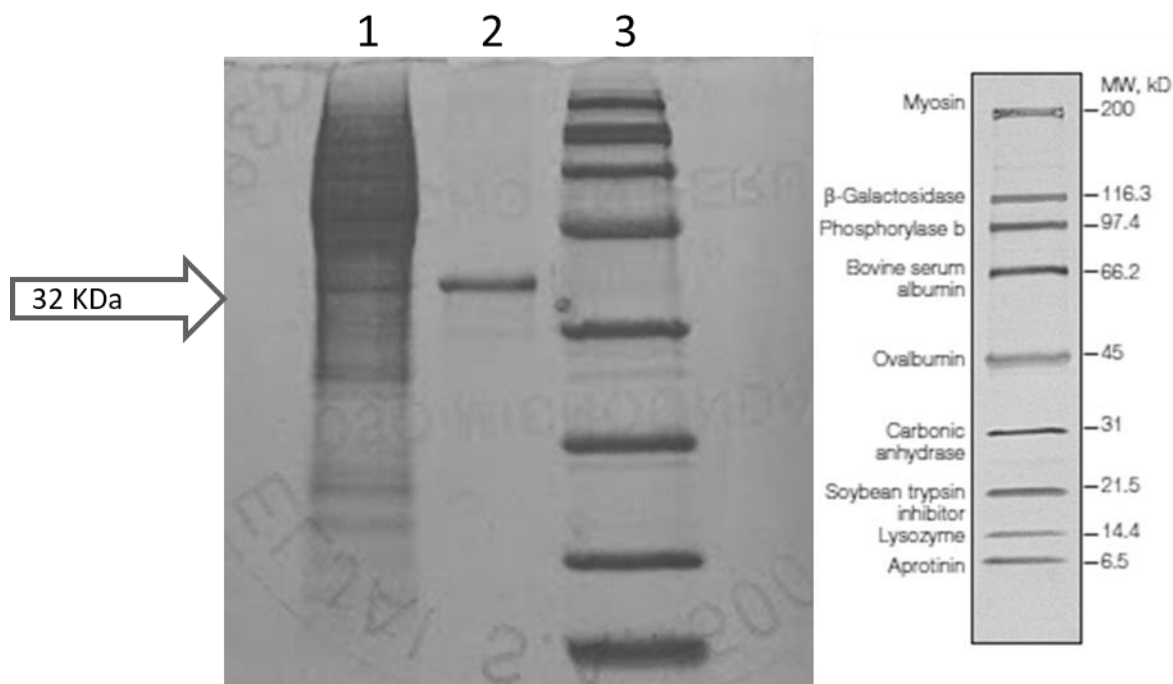
Figura 7: Cromatograma de purificación por cromatografía de afinidad de la proteína TsAg5 utilizando el sistema Biologic LP (Bio Rad).



Fotografía 17. Western immunoblot de tubos recolectados durante la purificación de la proteína. Carril 1: Marcador dual color. Carril 2-9: fracciones 6 a 12 eluidas de la columna.

Debido al intento fallido de la purificación de la proteína, se decidió cambiar el buffer de purificación a buffer Tris-HCl. Además, se cambió el buffer de unión a uno que no tuviera imidazol y que tuviera urea, puesto que se pensó que la proteína quizás se estaba plegando de una manera que estuviera escondiendo la secuencia de histidina. Después de varios ensayos, se llegó a adherir la proteína a la columna utilizando como buffer de unión a Tris HCl 8 M urea y 5 mM de imidazol. Y se realizó la elución utilizando 20 mM de imidazol. Sin embargo, tras correr un gel SDS PAGE se observó que la proteína no se encontraba pura

(fotografía 18). Por lo que se decidió realizar otra purificación, utilizando cromatografía de intercambio iónico.



Fotografía 18. Gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie G250. Carril 1: TsAg5 purificada por cromatografía de afinidad concentrada por ultracentrifugación. Carril 2: dominio tripsina expresado en *E. coli*. Carril 3: marcador Broad Range.

6.2.1.2 Cromatografía de intercambio iónico

Para realizar la cromatografía de intercambio iónico se utilizó una matriz aniónica Q sepharose fast flow. Se utilizó como fase móvil un buffer Tris HCl 20mM pH 8 para la purificación. Este sirvió como buffer de unión (binding buffer), y luego se realizó una gradiente continua de 4 horas en el que se incrementó los niveles de NaCl (desde 0 hasta 1 M) para eluir la proteína por un cambio en la fuerza iónica. Como podemos observar en la

figura 8, hay un pico medido a una absorbancia de 280 nm en los tubos 37 a 44, por lo que se realizó un Western immunoblot en estos tubos para comprobar que la proteína se encontrara ahí. Como podemos observar en la fotografía 19, la proteína había eluido en las fracciones 37 a 44. El paso siguiente era concentrar la proteína por ultracentrifugación y hacer un gel de poliacrilamida para comprobar que la proteína se encontrara pura, y aunque esto no ocurrió, como podemos ver en las fotografías 20B y 21, la proteína había sido separada de muchas otras que eluyeron en otras fracciones en la cromatografía de afinidad. No podíamos seguir realizando más ensayos debido a la poca proteína que se producía y a que durante la purificación se perdía mucho más, por lo que se procedió a realizar los ensayos de Western immunoblot utilizando sueros de cerdos con cisticercosis. Cabe resaltar, que no se pudo calcular la concentración de TsAg5 que fue producida por el sistema debido a la poca cantidad que se producía que no pudo visualizarse en geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomassie G250, cuyo límite de detección es de 1 ng, pero sí pudimos visualizarlo tenuemente en un gel SDS PAGE teñido con nitrato de plata, cuyo límite de detección es 0.6 ng, por lo que se asume que lo producido era cercano a esta cantidad.

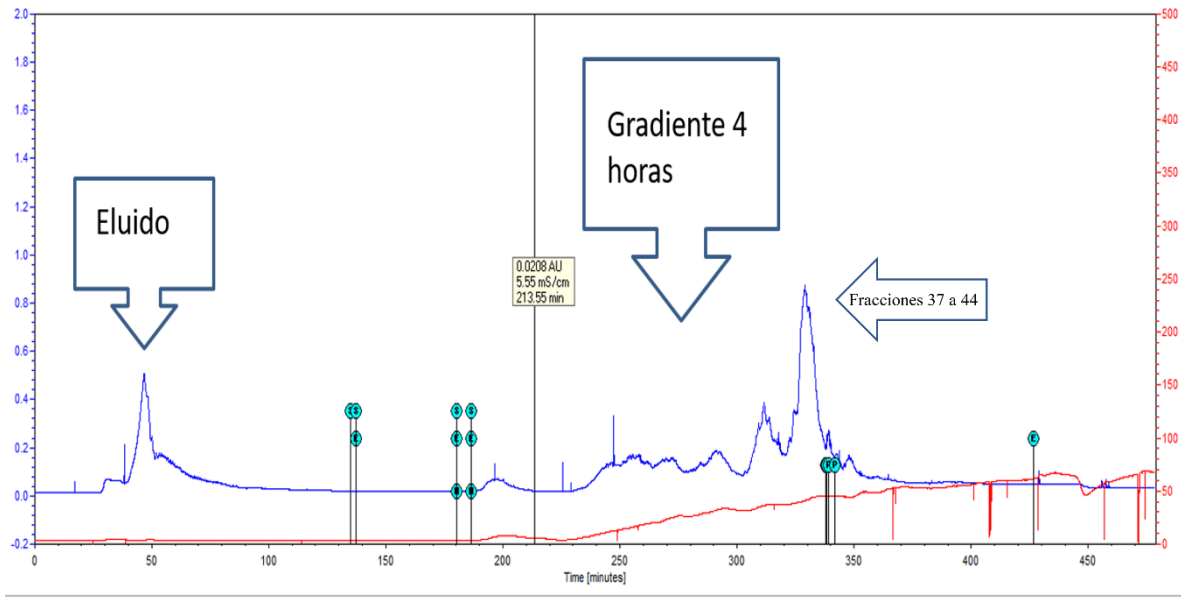
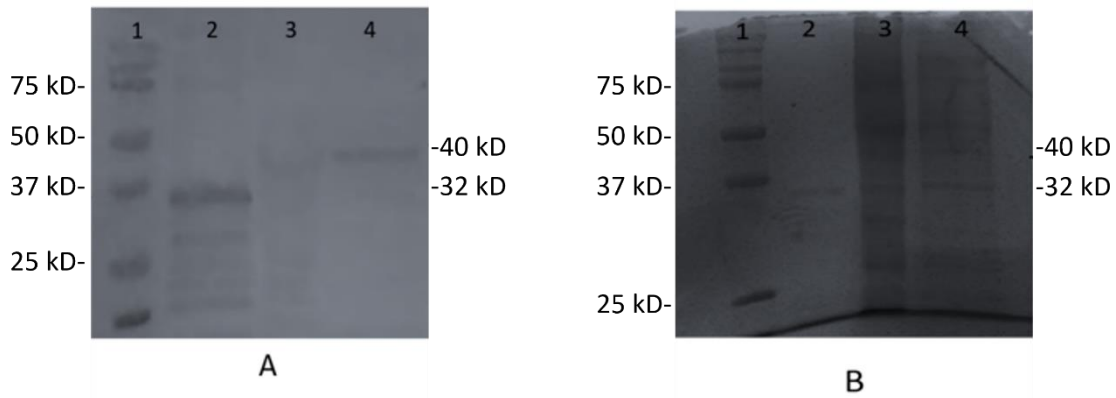


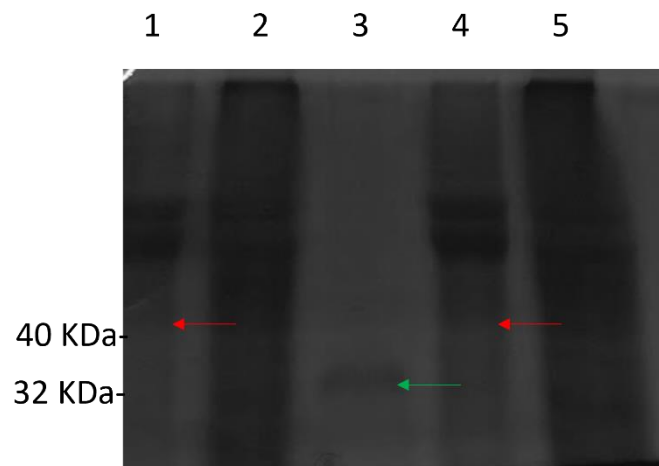
Figura 8 Cromatograma de purificación de dominio tripsina por cromatografía de intercambio iónico. Se realizó un gradiente de 4 horas en los que se ve un pico en la absorbancia 280nm en los tubos 37 a 44.



Fotografía 19. Western inmublot de tubos recolectados durante la purificación de la proteína TsAg5. Carril 1: tubo 37 Carril 2: tubo 38. Carril 3: tubo 39. Carril 4: tubo 40. Carril 5: tubo 41. Carril 6: tubo 42. Carril 7: tubo 43. Carril 8: tubo 44. Los tubos recolectados que contenían a la proteína fueron los tubos 37 al 44 que correspondían a los eluidos con una cantidad de NaCl de 40 mM aproximadamente.



Fotografía 20. A. Western inmunoblot de la purificación de proteínas expresadas en células de insectos Sf9. 1. Marcador molecular dual color (Bio Rad). 2. Dominio tripsina expresado en *E. coli*. 3. Dominio tripsina expresado en células de insectos Sf9. 4. TsAg5 completa expresada en células de insectos Sf9. B. Gel de poliacrilamida al 12% donde se corrió las proteínas expresadas concentradas por ultrafiltración (Amicon). 1. Marcador molecular dual color (Bio Rad). 2. Dominio tripsina expresado en *E. coli*. 3. Dominio tripsina expresado en células de insectos Sf9. 4. TsAg5 completa expresada en células de insectos Sf9.



Fotografía 21. Gel de poliacrilamida al 12 %. Carril 1 y 4: dominio tripsina parcialmente purificado. Carriles 3: dominio tripsina no purificado. Las flechas rojas señalan a una proteína

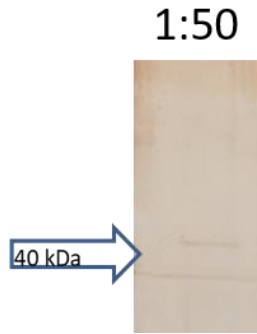
de 40 KDa aproximadamente, mientras que la flecha verde, señala una proteína de 32 KDa aproximadamente.

6.3 Estandarización de la prueba de Western immunoblot usando TsAg5 para detectar anticuerpos de cisticercosis porcina

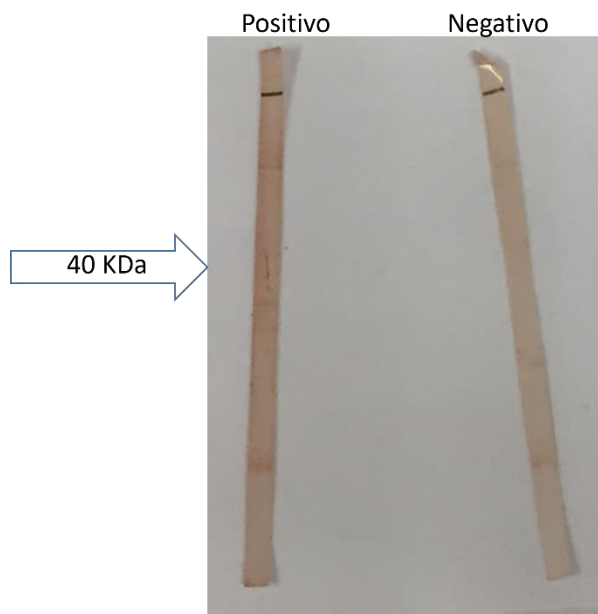
6.3.1 Ensayos de Western immunoblot indirecta para evaluación de proteínas como herramientas de inmunodiagnóstico

Previamente a realizar los ensayos con diversos sueros de cerdos, se estandarizaron las condiciones. Se probó utilizando varias concentraciones de anticuerpos primarios (1:200, 1:100 y 1:50) y se encontró que la proteína recién podía visualizarse a partir de una concentración 1:50, como podemos observar en la fotografía 22. Además, se realizaron ensayos en los que se probó con BSA al 3% en PBS y con leche descremada al 5%, también en PBS, como agentes bloqueantes, y se encontró que el mejor fue la leche descremada al 5% (datos no mostrados). Por último, se decidió utilizar una concentración de 1:2500 del anticuerpo secundario (Anti-IgG cerdo), puesto que esto es lo que recomendaba el fabricante. Se probaron controles positivos y negativos (fotografía 23).

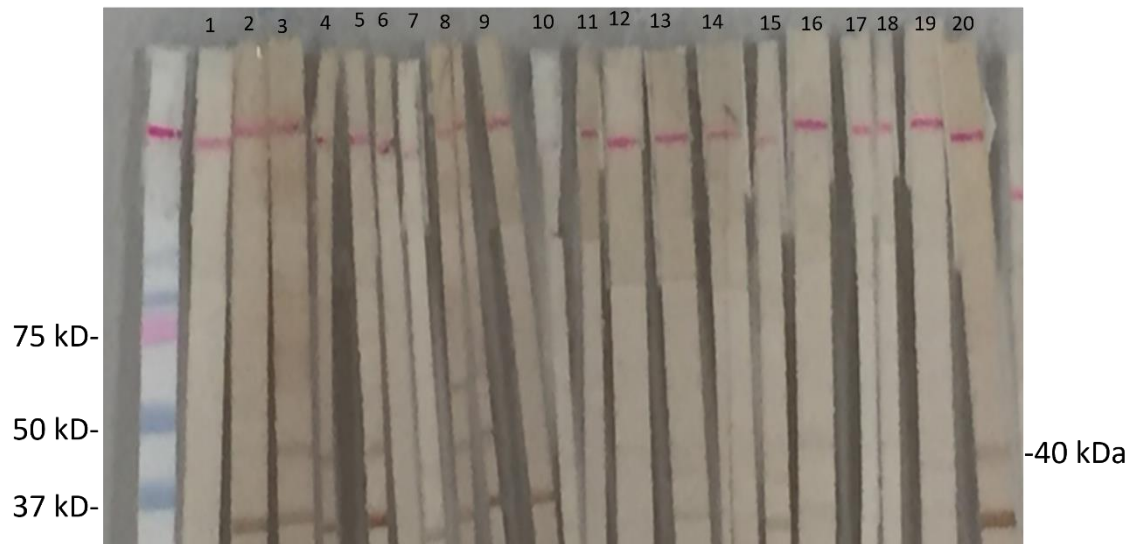
Una vez estandarizado el método, se realizó western immunoblot utilizando sueros de cerdos individuales (fotografía 24). Se utilizó 10 sueros positivos a cisticercosis y 10 sueros negativos (provenientes de una granja tecnificada en Lima). El ensayo se realizó en ciego, es decir, sin saber la naturaleza de los sueros. Al realizar el ensayo por triplicado, pudimos calcular una sensibilidad de 62.5 % y una especificidad de solo el 40% para detectar cisticercosis.



Fotografía 22. Western blot utilizando pools positivos de sueros de cerdos con cisticercosis. Se realizó un “checkerboard” para definir las condiciones adecuadas del Western Blot. Se concluyó que se debía utilizar una concentración de 1:50 de anticuerpo primario (pool positivo), 1:2500 de anticuerpo secundario (Anti –IgG cerdo). El bloqueo fue con leche al 5% en PBS y los lavados con PBS –Tween 0.05%.



Fotografía 23. Western immunoblot utilizando sueros de cerdos como controles positivo y negativo. En el control positivo podemos observar una banda tenue de 40 KDa, mientras que esta no puede observarse con el control negativo.



Fotografía 24. Western immunoblot con sueros individuales de cerdos. Las tiras 1 al 20 fueron incubadas en sueros de cerdos con cisticercosis porcina. Los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4 Determinación de la actividad proteolítica de TsAg5 a través de ensayos de actividad enzimática

Se midió la capacidad de la proteína expresada en células de insectos para cortar un sustrato fluorogénico de serina-proteasas. Para esto, se utilizaron controles positivos y negativos. Como control positivo se utilizó una Tripsina bovina (Sigma-Aldrich T7309) en una dilución 1:2000, y como control negativo se utilizó sobrenadante de cultivo celular sano y sobrenadante de cultivos infectados con bécrido sin inserto. Además, se utilizó un blanco; de solo buffer fosfato pH 7.3 (20 mM Na_2HPO_4 , 0.5M NaCl).

Para realizar los ensayos se utilizaron sobrenadantes de cultivos de células de insecto Sf9 de 8 días con 7×10^{18} células/mm³ aproximadamente. Se tomó 4 ul de estos sobrenadantes, y se mezclaron con 5 ul de sustrato fluorogénico y 76 ul de buffer fosfato pH 7.3 para obtener un volumen total de reacción de 85 ul. Lamentablemente no se pudo medir la cantidad de proteína que se utilizó en los ensayos debido a la baja producción, la cual se encontraba por debajo del límite de detección del ensayo de Bradford (1 ug). Es por esto por lo que se decidió utilizar sobrenadante de cultivos celulares con cantidad de células de insecto conocida. Se utilizó un cultivo de células del mismo tamaño, pero sin infectar como control negativo para poder realizar comparaciones válidas.

Como podemos ver en el gráfico 1, el dominio tripsina de TsAg5 presenta actividad tipo tripsina. Para calcular a cuantas unidades de tripsina bovina equivalía esta actividad, se realizaron ensayos previos para que la cantidad de tripsina bovina incluida en el ensayo mostrara una actividad similar a la del dominio tripsina recombinante. Se utilizó como control positivo una reacción de 85 ul que constó de 1 ul de tripsina bovina, 5 ul de sustrato fluorogénico y 79 ul de buffer fosfato pH 7.3, y se calculó que en esta reacción habían 0.00625 unidades USP de tripsina bovina, lo que nos indicó que en los 4 ul que se usaron para medir la actividad enzimática del dominio tripsina había una actividad enzimática que se asemejaba a 0.00625 unidades USP aproximadamente de tripsina bovina. Por el contrario, las células de insecto Sf9 no infectadas, las células de insecto Sf9 infectadas con un bÁcrido sin inserto y el blanco, no mostraron tener actividad enzimática.

Además, se realizaron ensayos de inhibición enzimática, donde se utilizó un inhibidor de actividad serina-proteasa, Pefabloc. En el gráfico 2 podemos observar que la actividad enzimática se ve inhibida por Pefabloc y que esta inhibición es dependiente de la

concentración del inhibidor. Por último, se inhibe por completo si se hierve la proteína a 100 grados por 3 minutos. Además, se incluyeron en estos ensayos, la inhibición enzimática de la tripsina bovina la cual se pudo observar que ocurría por completo a partir de una concentración de 4 mM de Pefabloc. Cabe resaltar que se realizaron 2 ensayos de este tipo puesto que no se contaba con más proteína para realizar más ensayos.

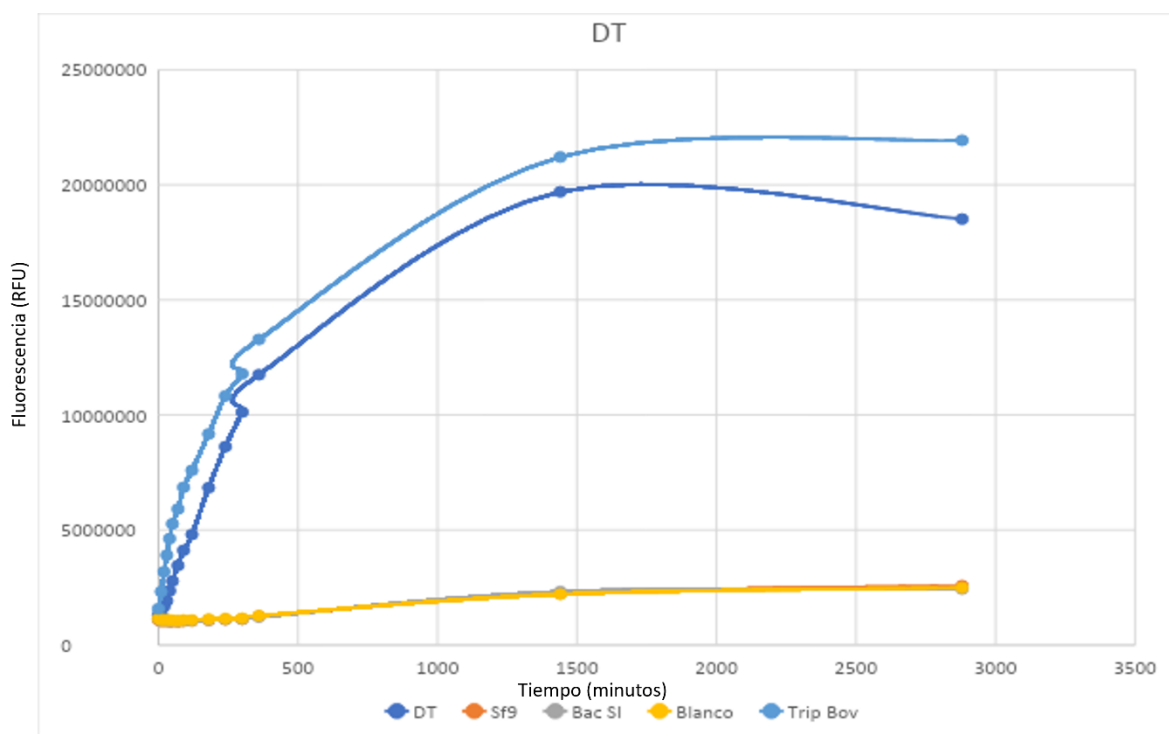


Gráfico 1. Actividad enzimática tipo tripsina del dominio tripsina de TsAg5. Se puede observar que el dominio tripsina de TsAg5 y el control positivo (Tripsina bovina) muestran actividad enzimática significativa, mientras que no hay actividad enzimática en los controles negativos (células de insecto Sf9 no infectadas, células Sf9 infectadas con bákrido sin inserto y el blanco de buffer solo). Se realizaron los experimentos utilizando cultivos celulares, tanto sanos como infectados con bákridos clonados con el dominio tripsina. DT:

Dominio tripsina. Sf9: células de insecto Sf9. Bac SI: células de insecto Sf9 infectadas con b́acmido sin inserto. Blanco: Agua. Trip Bov: Tripsina bovina.

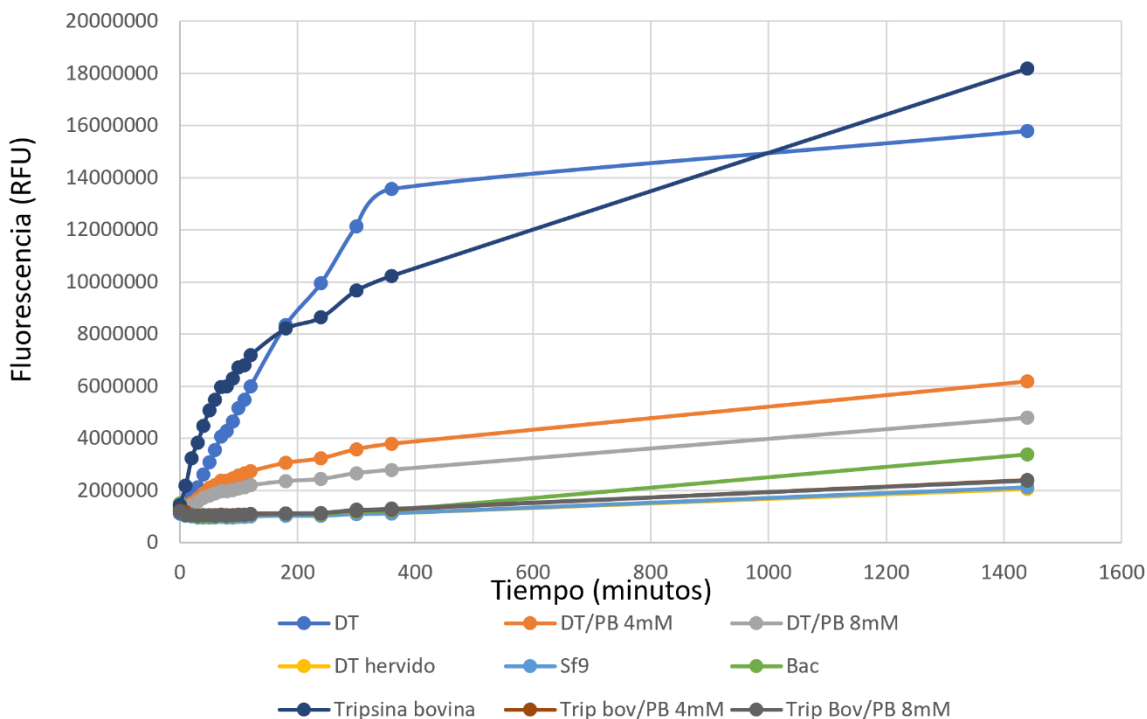


Gráfico 2. Actividad enzimática tipo tripsina del dominio tripsina de TsAg5 con uso de inhibidores de actividad tripsina. Se puede observar la disminución de actividad cuando se le adiciona un inhibidor de proteasas (4 mM Pefabloc), además, al adicionar más inhibidor (8 mM) se ve una mayor disminución de actividad; y por último, con la proteína hervida no hay actividad alguna. También se compara con la inhibición de la actividad enzimática de la tripsina bovina, donde 4 mM de Pefabloc es suficiente para inhibir por completo la actividad. Se muestra el resultado de 2 experimentos. DT: Dominio Tripsina, DT + 4 mM PB: Dominio tripsina con 4 mM de Pefabloc, DT 8 mM PB: Dominio tripsina con 8 mM de Pefabloc, DT hervido: Dominio tripsina llevado a 100°C por 3 minutos. Sf9: células de insectos Sf9 sanas. Bac: células de insectos Sf9 infectadas con un b́acmido sin inserto. Trip bov/PB 4 mM:

tripsina bovina con 4 mM de Pefabloc. Trip bov/PB 8 mM: tripsina bovina con 8 mM de Pefabloc.

VII DISCUSIÓN

En el presente estudio se expresó la proteína tipo tripsina TsAg5 de *Taenia solium* con actividad proteolítica utilizando un sistema eucariote de células de insectos Sf9. Así mismo, se realizaron inmunoensayos para comprobar la capacidad de esta proteína como antígeno de diagnóstico de cisticercosis porcina.

7.1 Expresión de TsAg5 en células de insecto Sf9

La expresión de la proteína TsAg5 fue exitosa, lo cual pudimos comprobar por western immunoblot utilizando anticuerpos anti-TsAg5 hiperinmunizados de conejo. Sin embargo, pudimos observar que el tamaño de esta varió de 55 KDa a 40KDa a medida que pasaba el tiempo y se observaron muchas otras bandas más pequeñas, lo que nos confirma que la degradación de las proteínas recombinantes va más allá del dominio tripsina. Esto podría explicarse si es que la proteína estuviera autodegradándose, como lo encontrado por Gupta y colaboradores (2010), quienes describen que la actividad serino proteasa de la proteína β A3-cristalina causa su autodegradación; o como lo reportado por Kannemeier y colaboradores (2001) sobre la serin proteasa activada por factor VII (FASP), que puede autoactivarse y autodegradarse. También es posible que la degradación proteolítica de proteínas recombinantes ocurra debido a la actividad de proteasas de las células de insectos Sf9 infectadas y no infectadas, como lo describen Schmid y Bischoff (1998), o que sean proteasas del propio baculovirus las responsables de la degradación, como mostraron Gotoh y colaboradores (2011) en células de insecto S9 infectadas.

Teniendo en cuenta esto, se utilizaron controles negativos donde se midió la actividad tipo tripsina de células de insectos Sf9 no infectadas y de células de insecto Sf9 infectadas por un báculo sin inserto, lo cual solo descarta la presencia de serin proteasas con actividad enzimática tipo tripsina en las células de insecto y en el baculovirus, pero podrían estar presentes en el cultivo otras proteasas que degraden las proteínas expresadas de manera recombinante, lo cual debería comprobarse midiendo actividad enzimática de diversas proteasas.

Otro factor en el que pensamos fue que estuvimos expresando ambas proteínas (la completa y el dominio tripsina) al mismo tiempo, si bien en cultivos celulares distintos, con el riesgo de que los baculovirus con dominio tripsina migraran a los cultivos que expresaban la TsAg5 completa y viceversa. Para descartar esta posibilidad, se decidió expresar solo TsAg5 completa, pero el tamaño de proteína siguió variando de 55 a 40 KDa. Debido a que seguía ocurriendo esa variación en el tamaño, se decidió realizar los experimentos solo utilizando el dominio tripsina.

7.2 Purificación de TsAg5

La purificación de la proteína no pudo realizarse a pesar de que se clonó para que se expresara con una secuencia de 6 histidinas en el extremo amino terminal. Tuvimos problemas en la cromatografía de afinidad debido a que la proteína no se adhería a la columna His Trap, y si lo hacía, era con muy baja afinidad. Ello podría haberse debido a la degradación parcial o total de la secuencia de histidinas, lo cual se comprobó realizando un western inmunoblot con anticuerpos anti-histidinas, en el que se observó bandas muy tenues (datos no mostrados).

Otra cosa que pudo haber ocurrido es que la proteína se haya plegado de manera de esconder la secuencia de histidinas. Para comprobarlo se hizo la corrida cromatográfica utilizando un buffer en el que se incluyó urea 8 M para desnaturalizar a la proteína. Los resultados mostraron que esta se adhería a la columna His trap, pero con muy baja afinidad, puesto que la recuperación se logró con una concentración de imidazol de solo 20 mM. Adicionalmente, realizamos una purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico para obtener una mayor pureza de la proteína, pero la poca cantidad producida nos impidió realizar más ensayos.

7.3 Expresión de TsAg5 con actividad proteolítica

Se realizaron estudios en los que se midió la actividad enzimática de la proteína expresada y se pudo observar que esta proteína tenía actividad enzimática tipo tripsina, puesto que cortó un sustrato fluorogénico específico y liberó el residuo fluorescente que pudo medirse a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Sumado a esto, se realizaron experimentos de inhibición enzimática para comprobar que la fluorescencia liberada que estábamos midiendo era causada por el corte del sustrato fluorogénico por una proteína con actividad tripsina y no por otros factores. Para esto, utilizamos un inhibidor de serina proteasas como Pefabloc, en distintas concentraciones, y hervimos la proteína a 100 grados por 3 minutos. Pudimos observar que cuando agregábamos el inhibidor a una concentración de 4 mM ocurría una baja en la actividad enzimática, la cual se acentuaba aún más en presencia de más inhibidor (8 mM). Por último, al hervir la proteína se observó la actividad enzimática se suprimió por completo, lo que comprueba que la fluorescencia era producida por el corte del sustrato fluorogénico por una enzima. También se comprobó que la actividad enzimática de tripsina bovina era inhibida por completo si

utilizábamos 4 mM de Pefabloc, esto nos indica que se necesita una concentración menor de inhibidor de serin proteasa para inhibir la actividad de la tripsina bovina, pero debería comprobarse probando concentraciones más bajas para saber qué concentración se necesita para obtener niveles de inhibición comparables a los obtenidos con la proteína recombinante.

Previamente, Rueda y colaboradores (2011) expresaron a TsAg5 en un sistema de expresión procariote (*E. coli*), en el que describen que hallaron actividad proteolítica en la porción soluble de la purificación del dominio tripsina, por lo que asumimos que dicha proteína se encontraba correctamente plegada. A pesar de esto, encuentran una actividad enzimática marginal de serin proteasa (2.28×10^{-4} unidades USP). Por el contrario, los resultados obtenidos en la medición de actividad enzimática en dominio tripsina recombinante expresado en células de insectos, presentan una actividad enzimática comparable a 0.00625 unidades USP de tripsina bovina. Esto puede deberse a las modificaciones postraduccionales que provee este sistema, entre las más importantes las N-glicosilaciones, las cuales, además de proveer a las proteínas de inmunogenicidad, ayudan en su correcto plegamiento y por lo tanto en su funcionalidad (Jayaprakash *et al*,2017). En tal sentido, Wang y colaboradores (2018) demuestran que las N-glicosilaciones ayudan en el plegado de una serina proteasa asistida por una calnexina. Además, Martin y colaboradores (2021) describen que TMPRSS13, un miembro de la familia de serin proteasas transmembrana tipo II, tiene 2 sitios de N-glicosilacion en su sitio catalítico, los cuales son muy importantes para que ocurra la autoactivación de la proteína y su actividad catalítica.

A pesar de considerarlo pertinente para nuestro estudio, no se pudieron hacer comparaciones entre la actividad enzimática del dominio tripsina expresados en *E. coli* y el expresado en células de insecto Sf9, puesto que solo se contaba con escasa proteína expresada en el vector

procariótico y esta había sido purificada a partir de la fracción insoluble con urea, por lo que carecía de actividad tipo tripsina. Asimismo, merece resaltarse la diferencia de tamaño entre el dominio tipo tripsina de TsAg5 expresado en *E. coli* (32 KDa) y el mismo dominio expresado en células de insecto Sf9 (40 KDa), lo que podría deberse a las modificaciones post traduccionales provistas por el sistema de expresión eucariote.

7.4 TsAg5 como antígeno de inmunodiagnóstico

Se realizaron inmunoensayos tipo Western immunoblot, utilizando la proteína parcialmente purificada. Se intentaron hacer ensayos de ELISA, pero no se obtuvieron buenos resultados con varios sueros debido a que no se observó una buena discriminación entre sueros positivos y negativos (datos no mostrados). Para el caso de Western immunoblot, se estandarizaron las condiciones adecuadas para ser realizado en sueros de cerdos con cisticercosis. Se encontró que una concentración de 1 en 50 de sueros de cerdos era necesaria para ser detectada por la proteína tipo tripsina de *Taenia solium*.

Se realizaron Western immunoblots con 20 sueros de cerdos en ciego, de los cuales 10 eran sueros con cisticercosis porcina provenientes de campo y 10 eran sueros de cerdos sanos de granjas tecnificadas. Pudimos observar que la proteína reaccionaba tanto con sueros positivos como negativos de cerdos con cisticercosis, por lo que esta proteína no sería adecuada como antígeno de inmunodiagnóstico de cisticercosis porcino debido a su baja especificidad. Sin embargo, hay que considerar que estos ensayos se realizaron utilizando un bajo número de sueros de cerdos.

Existen varios factores que podrían explicar la baja especificidad que encontramos. Diversos estudios en EgAg5 (la proteína tipo tripsina presente en *Echinococcus granulosus*)

encontraron que la inmunogenicidad de esta proteína está asociada a las N-glicosilaciones presentes en el dominio tipo tripsina (Lorenzo *et al*, 2005; Paschinger *et al*, 2012). Sin embargo, estas N-glicosilaciones presentan fracciones de fosforilcolina, las cuales han sido descritas como causantes de reacciones cruzadas (Sheperd y McManus, 1987). La expresión de TsAg5 con N-glicosilaciones adecuadas que tal vez posean fracciones de fosforilcolinas, pueden bajar la especificidad y por lo tanto observaríamos una proporción mayor de falsos positivos al utilizar la proteína como antígeno de diagnóstico.

Otra variable que podría explicar la baja especificidad que encontramos, puede ser la presencia de sueros de cerdos con reactividad positiva temporal como la describe Jayashi y colaboradores (2014). Ellos describen una condición en que los cerdos son negativos a las pruebas serológicas, luego cambian a positivo y vuelven a cambiar a negativo y esto lo explica aduciendo que posiblemente hay presencia de anticuerpos maternos. Además, ellos manifiestan haber tenido una comunicación personal con Armando Gonzáles (miembro del grupo de cisticercosis del Perú, UNMSM) en la que él menciona que puede existir una probabilidad, aunque baja, de que las moscas y escarabajos traigan los huevos y estos sean ingeridos por los cerdos, lo que podría causar la infección de estos, con una carga parasitaria baja en una granja.

Luego, cabe la posibilidad que existan reacciones cruzadas entre distintas especies de *Taenia spp.* Gomez Puerta y colaboradores (2019) sostienen que la alta sensibilidad y baja especificidad de las pruebas inmunogénicas como ELISA para diagnosticar cisticercosis porcina se debe a las reacciones cruzadas entre proteínas de *Taenia solium* y *Taenia saginata*. Del mismo modo, Muro y colaboradores (2017) reportaron una reactividad cruzada en pruebas de diagnóstico realizadas en cerdos infectados con *T. solium* y *T. hydatigena*, lo que

podría explicar la presencia de falsos positivos en lugares endémicos para estos parásitos. Sin embargo, nosotros no probamos TsAg5 con sueros de animales infectados con otros parásitos.

Además, existe la probabilidad de que las glicosilaciones, entre otras modificaciones postraduccionales provistas por el sistema de expresión, sean inadecuadas y estén causando estas reacciones cruzadas. Hancock y colaboradores (2008) encontraron reactividad falso-positiva en glicoproteínas expresadas en células de insectos High Five. Los autores encontraron que estas células expresaban glicoproteínas con un núcleo α (1,3) fucosa, modificación que se encuentra en las glicoproteínas de muchos gusanos parásitos expresadas en este sistema, lo que estaba causando inmunogenicidad. Sin embargo, esto podría no ocurrir en el caso de glicoproteínas expresadas en células de insecto Sf9 debido a que análisis realizados en N-glicanos expresados en células de insectos Sf9 revelaron la presencia de uniones α (1,6) fucosa y no encontraron actividad α (1,3) fucosiltransferasa (Voss 1993). Esto podría comprobarse usando la proteína TsAg5 deglicosilada para saber si los falsos positivos son causados por las glicosilaciones.

Por último, hay que considerar la calidad de la proteína recombinante que obtuvimos, la cual no pudo ser purificada, lo cual podría aumentar la detección de proteínas no específicas en los sueros de cerdos (Ghosh *et al*, 2014).

7.5 Importancia del diagnóstico de cisticercosis porcina para el control de neurocisticercosis humana

Existe una gran importancia en la mejora del diagnóstico de cisticercosis porcina, y esto se debe a que un adecuado control de esta enfermedad se vería reflejado en un control de la

neurocisticercosis humana. Diversos investigadores mencionan que el monitoreo de cisticercosis porcina es el método usado más frecuentemente para la evaluación de actividades del control de *T. solium*, y esto se debe a ciertas características, como que es más fácil y económico hacer pruebas en cerdos que en humanos debido a cuestiones éticas. También, a que el cerdo tiene una vida más corta, lo que provee de una medida sensible al tiempo (Lightowers *et al*, 2016; García *et al*, 2018)

Aunque en este trabajo no se pudo obtener resultados favorables en la utilización de la proteína TsAg5 como antígeno de inmunodiagnóstico, se obtuvieron resultados alentadores en cuanto a la expresión de la proteína con actividad enzimática. Hubo diversos problemas con los que nos encontramos al realizar este trabajo de investigación, como la dificultad en la purificación posiblemente causada por la pérdida de la secuencia de histidinas, además de su posible degradación a medida que se producía. Todos estos problemas no se tuvieron en cuenta debido a que la expresión en *E. coli* había ocurrido exitosamente sin este tipo de inconvenientes. Por ello recomendamos tener en cuenta estos detalles cuando se cambie de un sistema de expresión procariote a uno eucariote.

VIII. CONCLUSIONES

- El dominio tripsina de la proteína TsAg5 expresado en el sistema de expresión eucariote células de insecto -baculovirus tiene actividad proteolítica tipo tripsina.
- El sistema de expresión eucariote células de insecto-baculovirus resulta útil para la expresión del dominio tripsina de TsAg5 con las modificaciones post traduccionales que permiten su correcto plegamiento y función.

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar una estandarización de la expresión de TsAg5 en el sistema de expresión células de insecto-baculovirus para evitar su degradación durante el proceso.
- Probar otros métodos de purificación de proteína en TsAg5, de esta manera podríamos probar la capacidad diagnóstica de TsAg5 con una prueba más rápida de realizar y sencilla como ELISA.
- Realizar ensayos en una mayor cantidad de sueros de cerdos, esto nos dará una mejor idea de la capacidad diagnóstica de TsAg5 y probar la utilidad diagnóstica de TsAg5 para detectar Neurocisticercosis.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Airene KJ, Hu YC, Kost TA, Smith RH, Kotin RM, Ono C, Matsuura Y, Wang S, Yia-Herttuala S. Baculovirus: An insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Molecular Therapy*. 2013 Apr; 21(4): 739-749.
2. Arana Y. Verástegui M. Tuero I. Grandjean L. Garcia HH. Gilman RH. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* oncosphere proteins and their role in the antigenicity. *Parasitol Res.* 2013; 112: 3569-3578.
3. Arroyo G. Epidemiología serológica de cisticercosis porcina en el Perú. *Sirivs*. 2010; 1-15.
4. Bac-to-Bac® baculovirus expression system. Invitrogen Life technologies. 2004
5. Behura SK y Severson DW. Codon usage bias: causative factors, quantification methods and genome-wide patterns: with emphasis on insect genomes. *Biol Rev*. 2013; 88: 49-61.
6. Bern, C., Garcia, H. H., Evans, C., Gonzalez, A. E., Verastegui, M., Tsang, V. C. W. & Gilman, R. H. (1999). Magnitude of the Disease Burden from Neurocysticercosis in a Developing Country. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1203-1209.
7. Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, Garcia-Varela M, Sciutto E, Larralde C, Laclette JP. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014 Feb; 23: 150-160.
8. Bouteille B. Épidémiologie de la cysticercose et de la neurocysticercose. *Médecine et Santé Tropicales*. 2014; 24: 367-374.

9. Capron A, Yarzabal L, Vernes A, Fruit J. Le diagnostic immunologique de L'échinococcose humaine (bilan personnel à propos de 400 observations). *Pathol Biol* 1970;18:357-365.
10. Carpentier DC, Griffiths CM, King LA. The baculovirus P10 protein of *Autographa californica* nucleopolihedrovirus forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies. *Virology*. 2008 Feb; 371(2):278-291.
11. Eisenhaber B, Eisenhaber F. Prediction of posttranslational modifications of proteins from their amino acid sequence. *Data mining techniques for the life sciences* (pp. 365-380). New York, NY: Humana Press.
12. Contreras-Gómez A, Sánchez-Mirón, Garcia-Camacho F, Molina-Grima E. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol Prog*. 2014; 30(1):1-18.
13. Del Brutto OH. Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited. *Pathogens and Global Health*. 2012; 106(5): 299-304.
14. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *The Neurohospitalist*. 2014; 4(4):205-212.
15. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009; 27: 297-306.
16. Drugmand JC, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances*. 2012; 30: 1140-1157.
17. Ernst JF. Codon usage and gene expression. *Tibtech*. 1988; 6:196-199.
18. Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact, and control measures in the Americas. *Acta Tropica*. 2003; 87: 43-51.
19. Flisser A. Where are the tapeworms? *Parasitology International*. 2006; 55:117-220
20. Flisser A. Cisticercosis: enfermedad desatendida. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011; 68(2): 138-145.

21. García HH, Gilman RH, González AE, Verástegui M, Rodríguez S, Gavidia C, Tsang VCW, Falcón N, Lescano AG, Moulton LH, Bernal T, Tovar M. Hyperendemic Human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68(3): 268-275.
22. García HH, González AE, Rodríguez S, Gonzalez G, Llanos-Zavalaja F, Tsang VCW, Gilman RH. Epidemiología y control de las cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2010; 27(4):592-597.
23. García HH, Rodríguez S, Friedland JS. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. *Parasite Immunology.* 2014 Jun; 36:388-396.
24. García HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol* 2014 Dec; 13: 1202-15.
25. García HH, Gonzalez AE, O'Neal SE, Gilman RH. Apuntes y recomendaciones para el establecimiento de programas de control de la Teniasis/Cisticercosis por *Taenia solium* en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2018; 35(1): 132-138.
26. García HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clinical Microbiology Reviews.* 2020; 33(3): 85-19
27. Gomez-Puerta L, Vargas-Calla A, Castillo Y, Lopez-Urbina MT, Dorny P, Garcia HH, Gonzales AE, O'Neal SE. Evaluation of cross reactivity to *Taenia Hydatigena* and *Echinococcus granulosus* in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for the diagnosis of porcine cysticercosis. *Parasites & Vectors.* 2019; 12(1): 57.
28. González AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Chaver A, Castro M, Montenegro T, Verástegui M, Miranda E, Bazalar H. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43(2): 194-199.

29. González AE, Gilman RH, García HH, McDonald J, Kacena K, Tsang VCW, Pilcher JB, Suarez F, Gavidia C, Miranda E. Use of sentinel pigs to monitor environmental *Taenia solium* contamination. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51(6): 847-850.
30. Gotoh T, Miyasaki Y, Sato W, Kikuchi KI, Bentley WE. Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected Sf9 insect cell cultures supplemented with carboxy and cysteine protease inhibitors. *J Biosci Bioeng.* 2001;92(3):248-55
31. Gupta R, Chen J, Srivatasva OP. A serine-type protease activity of human lens β A3-crystallin is responsible for its autodegradation. *Molecular vision.* 2010. 16:2242-2252.
32. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology.* 2004 Jul; 22(7): 346-353.
33. Jarvis DL. (1997). *Baculovirus Expression Vectors. The Baculoviruses* (pp.389-431). New York, NY: Springer Science + Business Media.
34. Jayaprakash NG, Surolia A. Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. *Biochemical Journal.* 2017; 474: 2333-2347.
35. Jayashi CM, Gonzales AE, Castillo Neyra R, Rodriguez S, Garcia HH, Lightowlers MW. Validity of the Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for naturally acquired porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology.* 2014; 42-49.
36. Jiang Y, Deng F, Wang H, Hu Z. An extensive analysis on the global codon usage pattern of baculoviruses. *Arch Virol.* 2008 Nov; 153: 2273-2282.
37. Kannemeier, C., Feussner, A., Stöhr, H. A., Weisse, J., Preissner, K. T. & Römisch, J. (2001). Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease. *European Journal of Biochemistry*, 268(13), 3789-3796.

38. Levin DB y Whittome B. Codon usage in nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 2313-2325.
39. Li Y, Xu H, Chen J, Gan W, Wu WH, Wu WP, Hu X. Gene Cloning, expression, and localization of antigen 5 In the life cycle of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*. 2012; 11: 2315-2323.
40. Lightowlers MW, Garcia HH, Gauci CG, Donadeu M, Abela-Ridder B. Monitoring the outcomes of interventions against *Taenia solium*: options and suggestion. *Parasite Immunology*. 2016; 38: 158–169
41. Lightowlers MW. Diagnosis in porcine cisticercosis at necropsy: when enough is enough? *Trends in Parasitology*. 2020, 36 (7):575-578.
42. Lorenzo C, Salinas G, Brugnini A, Wernstedt C, Hellman U, Gonzales-Sapienza G. *Echinococcus granulosus* antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family. *Biochem J*. 2003; 369: 191-198.
43. Lorenzo C, Last JA, Gonzalez-Sapienza G. The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* antigen 5 is determined by its post-translational modifications. *Parasitology*. 2005 May; 131: 669-677.
44. Martin CE, Murray AS, Sala-Hamrick KE, Mackinder JR, Harrison EC, Lundgren JG, Varela FA. Posttranslational modifications of serine protease Tmprcc13 regulate zymogen activation, proteolytic activity, and cell surface localization. *Journal of Biological Chemistry*. 2021 Oct; 297(4):101227
45. Mena Alvarez C (2002) Incidencia de la cisticercosis porcina en el distrito de Matapalo Departamento de Tumbes. Tesis para optar por el título profesional de Médico Veterinario. UNMSM

46. Mewara A, Goyal K, Sehgal R. Neurocysticercosis: A disease of neglect. *Tropical Parasitology*. 2013 Jul; 3(2): 106-113.
47. Moore AC, Lutwick LI, Schantz PM, Pilcher JB, Wilson M, Hightower AW, Chapnick EK, Abter EI, Grossman JR, Fried JA. Seroprevalence of Cysticercosis in an Orthodox Jewish community. *Am J Trop Hyg*. 1995; 53(5): 439-442.
48. Muro C, Gomez-Puerta LA, Flecker RH, Gamboa R, Vilchez Barreto P, Dorny P, Tsang VCW, Gilman RH, Gonzales AE, Garcia HH, O'Neal S. Porcine cysticercosis: Possible cross reactivity of *Taenia hydatigena* to GP50 antigen in the Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot Assay. *Am J Trop Med Hyg*. 2017; 97(6): 1830-1832.
49. Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, Knapp J, Nkouawa A, Sako Y, Ito A. State-of-the-art *Echinococcus* and *Taenia*: Phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010 Feb; 10: 444-452.
50. Nakao M, Lavikainen A, Iwaki T, Haukisalmi V, Konyaev S, Oku Y, Okamoto M, Ito A. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *International Journal for Parasitology*. 2013 Feb; 43:427-437.
51. Noh J, Rodriguez S, Mui Lee Y, Handali S, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VCW, Garcia HH, Wilkins PP. Recombinant protein and synthetic peptide immunoblot test for diagnosis of neurocysticercosis. 2014 May; 52(5):1429-1434.
52. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. (1992). *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. New York, NY: W.H. Freeman and company.
53. O'Reilly. (1997). *Use of baculovirus expression vectors. Recombinant gene expression protocols* (pp. 235-246). New York, New Jersey: Humana Press Inc.

54. Paschinger K, Gonzalez-Sapienza GG, Wilson IBH. Mass spectrometric analysis of the immunodominant glycan epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5. *International Journal for Parasitology*. 2012; 42: 279-285.
55. Placencia M, Shorvon SD, Paredes V, Bimos C, Sander JWAS, Suarez J. Cascante SM. Epileptic seizures in an andean región of Ecuador. *Brain*. 1992; 115: 771-782.
56. Pozzuoli R, Musiani P, Arru E, Patrono C, Piantelli M. *Echinococcus granulosus*: Evaluation of purified antigens immunoreactivity. *Experimental Parasitology*. 1974; 35: 52-60.
57. Rojas Rivera R. Prevalencia de cisticercosis en porcinos de la provincia de Tambopata, Perú. *Rev Med Vet*. 2021;(42): 77-82
58. Rueda A, Sifuentes C, Gilman RH, Gutiérrez AH, Piña R, Chile N, Carrasco S, Larson S, Mayta H, Verástegui M, Rodríguez S, Gutiérrez-Correa M, García HH, Sheen P, Zimic M. TsAg5, a *Taenia solium* cysticercus protein with a marginal trypsin-like activity in the diagnosis of human neurocysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2011 Dec; 180: 115-119.
59. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Sprin Harbor, NY.
60. Sánchez H. Factores de riesgo y perfil epidemiológico de la cisticercosis porcina/teniasis humana en el distrito de Zapatero-2019. Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e innovación de ciencia abierta. Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto Perú.
61. Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Cjuno RA, García HH, Martinez SM. Diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis en el Perú. *Rev Med Exp Salud Pública*. 2010; 27(4): 586-591.
62. Sarria-Estrada S, Frasccheri-Verzelli L, Siurana-Montilva S, Auger-Acosta C, Rovira-Cañellas A. Neurocisticercosis: Hallazgos radiológicos. *Radiología*. 2013; 55(2):130-141.

63. Sarti E, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gómez-Dantes H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis in a Mexican village. *Am J Trop Med Parasitol.* 1988; 39: 194-198.
64. Senanayake N y Román GC. Epidemiology of epilepsy in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization.* 1993; 71: 247-258.
65. Sheperd J. McManus D. Specific and cross-reactive cyst fluid. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1987; 25: 143-154.
66. Schmid, G. & Bischoff, A. (1998). Proteolytic Activities in the Baculovirus-Insect Cell Expression System. *New Developments and New Applications in Animal Cell Technology*, 303-306.
67. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An Enzyme Immunoelctrotransfer Blot Assay and Glycoprotein Antigens for Diagnosing Human Cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of Infectious Diseases.* 1989 Agosto; 159: 50-59.
68. Üstün-Aytekin Ö, Gürhan İD, Ohura K, Imai T, Öngen G. Monitoring of the effects of transfection with baculovirus on Sf9 cell line and expression of human dipeptidyl peptidase IV. *Cytotechnology.* 2013 May 29;66(1):159–68.
69. Van Oers MM. Oportunities and challenges for the baculovirus expression system. *Journal of Invertebrate Pathology.* 2011; 107: 5-13.
70. Voss T, Ergulen E, Ahorn H, Kubelka V, Sugiyama K, Maurer-Foger I, Glossl J. Expression of Human interferon omega 1 in Sf9 cells. No evidence for complex-type-N-linked glycosylation or sialylation. *Eur J Biochem.* 1993. 217(3): 913-9.
71. Wang H, Li S, Wang J, Chen S, Sun XL, Wu Q. N-glycosylation in the protease domain of trypsin-like serine proteases mediates calnexin-assisted protein folding. *eLife.* 2018; 7:e35672.
72. Watanabe RA. Estudio de la cisticercosis porcina en el Perú. *Sirivs.* 2013 Dic; 1-13

73. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VC. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 1991 Nov; 164(5): 1007-1009.
74. Zimic MJ, Infantes J, López C, Velásquez J, Farfán M, Pajuelo M, Sheen P, Verástegui M, González A, García HH, Gilman RH. Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *J Parasitol.* 2007; 93(4): 727-734.