





UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

**“Estandarización del Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)  
para la detección de la proteína granular del eosinófilo EDN en muestras  
de suero humanas”**

TESIS PRESENTADA POR  
**José Del Carmen Maravi Jaime**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
**Licenciado en BIOLOGÍA**

**Lima -Perú**

**2017**



Al misterioso regalo, la vida, y su apego al tiempo.

A mi padre, Rodrigo Maravi Petri, a mi madre, Zonia Jaime Campos, y a mi tía, Rosario Maravi Petri, a mis hermanos Rodrigo, Zonia, Benigna y Felisa, como testimonio de mi gratitud infinita a su sacrificio, cariño y ejemplo cotidiano.

A mis tíos Rosa Camborda Maravi y Víctor Hugo Freyre, y sus hijas Lucía y Carolina, a mi tía Carmen Camborda Maravi y su hija Paola, por acompañarme en estos cortos años universitarios, brindándome el calor de un segundo hogar.

A las incandescentes mentes del Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis, en especial a la Dra. Cristina Guerra Giráldez, magnífica persona, indiscutible pensadora y científica, cuya pasión se contagia incluso en la mente más intrincada.

Al Dr. Ted Nash y el Dr. Siddhartha Mahanty, a mis críticos amigos: Miguel Ángel Orrego (BSc.), Carla Cangalaya (MSc.), Jaeson Santos Calla (Dr.), Renzo (LSc.), Juan (LSc.), Pamela (BSc.), Laura (LSc.), Luigui (BSc.), Gabo (BSc.), Beatriz (BSc.), Ayme (BSc.), Edith (MSc.), Jessy (LSc.), Carolina, David y Enrique. Por cada una de sus valiosas contribuciones, y sus enseñanzas más allá de lo académico.

La puerta está abierta, de usted depende entrar y comprometerse. Con atención y respeto para usted.

TESIS APROBADA SIN MODIFICACIONES EL 11 DE MAYO DE 2017, EN LA  
CIUDAD DE LIMA, PRESIDENDO SU EVALUACIÓN LAS JURADAS:

- Dra. Manuela Verástegui Pimentel, **PRESIDENTA.**

- Dra. Katherine Torres Fajardo, **VOCAL.**

- MSc. Teresa Barreto Gaviria, **SECRETARIA.**

BAJO LA ASESORIA DE LA Dra. Cristina Guerra Giraldez.

# ÍNDICE GENERAL

## ABSTRACT

## RESUMEN

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
I.1.	TAENIA SOLIUM .....	1
I.2.	CISTICERCOSIS .....	2
I.3.	NEUROCISTICERCOSIS (NCC).....	2
I.3.1.	<i>Calcificación de los quistes en NCC</i> .....	2
I.4.	EPIDEMIOLOGÍA.....	3
I.5.	DIAGNÓSTICO DE NCC.....	3
I.6.	DEFENSA Y TRATAMIENTO CONTRA LA ENFERMEDAD .....	3
I.6.1.	<i>Eosinófilos</i> .....	4
I.6.1.1.	Eosinofilia .....	4
I.6.1.2.	Liberación de componentes del eosinófilo.....	5
I.6.1.3.	Eosinófilos como células secretoras .....	5
I.6.1.4.	Proteínas catiónicas del eosinófilo .....	6
I.6.2.	<i>Tratamiento de la NCC</i> .....	7
I.7.	JUSTIFICACIÓN.....	8
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>9</b>
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
III.1.	OBJETIVO GENERAL: .....	9
III.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	9
<b>IV.</b>	<b>DISEÑO Y METODOLOGÍA DE ESTUDIO.....</b>	<b>10</b>
IV.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	10
IV.2.	MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	10
IV.2.1.	<i>Conteo relativo de eosinófilos</i> .....	11
IV.2.1.1.	Tinción de hematoxilina-eosina (H&E) .....	11
IV.3.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	12
IV.4.	ELISA.....	12
IV.4.1.	<i>Estandarización del ELISA</i> .....	12
IV.4.2.	<i>ELISA con muestras de pacientes con NCC</i> .....	13
IV.5.	CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE LA PROTEÍNA PURIFICADA EDN .....	13
IV.6.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	13
IV.6.1.	<i>Variables</i> .....	13
IV.6.2.	<i>Análisis estadístico</i> .....	13
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
V.1.	ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EDN SUERO HUMANO.....	15
V.1.1.	<i>Estandarización de bloqueo: determinación de la importancia y condiciones del bloqueo (% leche)</i> .....	16
V.1.2.	<i>Titulación de la proteína purificada EDN como estándar (control) de detección en el ELISA</i> .....	16
V.1.3.	<i>Estandarización de las condiciones de las muestras de suero para el ensayo de ELISA</i> ...	18
V.1.4.	<i>ELISA para la detección de la proteína granular del eosinófilo EDN en muestras de suero de pacientes con NCC</i> .....	20
V.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	23

V.2.1.	<i>Normalidad de los datos</i> .....	23
V.2.2.	<i>Diferencias en la concentración de EDN</i> .....	24
V.2.2.1.	Diferencias en la concentración de la proteína EDN en el grupo de muestras de pacientes con NCC 25	
V.2.3.	<i>Diferencias en el número de eosinófilos en muestras eosinofílicas y no eosinofílicas</i> .....	26
V.2.4.	<i>Correlación entre el número de quistes y la concentración de proteína EDN</i> .....	27
V.2.5.	<i>Correlación entre el conteo de eosinófilos (#Eos) y la concentración de EDN ([EDN]) en las muestras con y sin eosinofilia (Eos+ y Eos-)</i> .....	28
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>VIII.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>
<b>X.</b>	<b>ANEXOS: TABLAS</b> .....	<b>A</b>

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA PARA EDN.....	10
FIGURA 2. EVALUACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA ESTANDARIZAR EL ENSAYO DE ELISA PARA EDN. ....	15
FIGURA 3. ESTANDARIZACIÓN DEL PASO DE BLOQUEO EN EL ELISA. ....	16
FIGURA 4. INTERPOLACIÓN SIGMOIDAL DE 4 PARÁMETROS PARA EDN [50 NG/μL-0.00005 NG/μL]. ....	17
FIGURA 5. INTERPOLACIÓN SIGMOIDAL DE 4 PARÁMETROS PARA EDN [0.005 NG/μL-1.25 NG/μL]. ....	17
FIGURA 6. ESTANDARIZACIÓN DE LA DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ENSAYO DE ELISA.....	19
FIGURA 7. TITULACIÓN DE LA PROTEÍNA ESTÁNDAR EDN EN DILUCIÓN 1:40. ....	20
FIGURA 8. RESULTADOS DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA EDN EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON NCC. ....	21
FIGURA 9. ESTANDARIZACIÓN DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA GRANULAR DEL EOSINÓFILO EDN EN MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON NCC. ....	22
FIGURA 10. TITULACIÓN DE LA PROTEÍNA ESTÁNDAR EDN EN DILUCIÓN 1:40, ELISA PARA LA PROTEÍNA EDN EN PACIENTES CON NCC.....	23
FIGURA 11. DIFERENCIAS EN LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA EDN ([EDN]).....	25
FIGURA 12. DIFERENCIA EN EL NÚMERO DE EOSINÓFILOS ENTRE EL GRUPO DE MUESTRAS EOSINOFÍLICAS (EOS+) Y NO EOSINOFÍLICAS (EOS-). ....	26
FIGURA 13. CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE CONCENTRACIÓN DE EDN Y EL NÚMERO DE QUISTES EN LAS MUESTRAS DE SUERO DE PACIENTES CON NCC. ....	27
FIGURA 14. CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LA [EDN] Y #EOS EN MUESTRAS DE EOSINOFILIA (EOS+) Y NO EOSINOFILIA (EOS-). ....	28



## INDICE DE TABLAS

TABLA 1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SHAPIRO-WILK PARA DETERMINAR NORMALIDAD DE LOS DATOS. ....	24
TABLA 2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS Y MANN-WHITNEY PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS ENTRE GRUPOS EN LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EDN. ....	24
TABLA 3. RESULTADO DE LA PRUEBA T DE UNA MUESTRA.....	25
TABLA 4. RESULTADOS DE LA PRUEBA U DE MANN-WHITNEY PARA DETERMINAR DIFERENCIAS ESTADÍSTICAS EN EL CONTEO RELATIVO DE EOSINÓFILOS (#Eos) ENTRE MUESTRAS CON Y SIN EOSINOFILIA (Eos+) Y (Eos-). ....	26
TABLA 5. CORRELACIÓN DE SPEARMAN UTILIZANDO LAS VARIABLES DE CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA EDN EN LAS MUESTRAS DE PACIENTES CON NCC Y LA CARGA QUÍSTICA TOTAL DE CADA MUESTRA.....	27
TABLA 6. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE CORRELACIÓN DE APLICADA AL CONTEO DE EOSINÓFILOS (#EDN) Y CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA EDN ([EDN]).....	28
TABLA 7. RANGO NORMAL DE LEUCOCITOS EN HUMANOS.....	ANEXOS
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS EN LA ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA.....	ANEXOS
TABLA 9. CONTEO RELATIVO DE LEUCOCITOS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE .....	ANEXOS
TABLA 10. VALORES DE ABSORBANCIA CORREGIDOS PARA LOS PUNTOS DE LA TITULACIÓN DE LA PROTEÍNA ESTÁNDAR PURIFICADA EDN.....	ANEXOS
TABLA 11. CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA EDN A PARTIR DE LA ECUACIÓN OBTENIDA DE LA TITULACIÓN DE LA PROTEÍNA PURIFICADA EDN.....	ANEXOS



## **ABSTRACT**

*Taenia solium* is a flatworm that causes human taeniasis and cysticercosis in humans and pigs. Neurocysticercosis (NCC) develops when the larvae (cysts) infect the central nervous system. Anthelmintic treatment of NCC leads cysts to degeneration and death, which often associates with a strong inflammatory response by the host and symptoms. Symptoms of NCC include severe seizures and intracranial hypertension. NCC treatment consists of a combination of anthelmintic and anti-inflammatory agents. The anti-inflammatories used are corticosteroids, mainly dexamethasone, which inhibits the activation of eosinophils (via IL-5, TNF- $\alpha$ ).

In porcine NCC, eosinophil infiltrates have been observed around the cysts. Eosinophils are leukocytes that act liberating the contents of their granules, which include cytotoxic proteins (Eosinophil Derived Neurotoxin -EDN, Major Basic Protein -MBP, Eosinophil Cationic Protein -ECP, and Eosinophil Peroxidase -EPX) and many cytokines. In tissues, MBP and EPX mainly produce induration and erythema with moderate cellular infiltration, whereas EDN and ECP are capable of altering tissue integrity and causing inflammation, and they can produce neurotoxicity.

In addition, EDN and ECP have RNase activity. EDN was selected for this study due to its neurotoxic properties and particularities that facilitate their detection in ELISA assays: lower basicity and less number of arginines and cysteines in their amino acid sequence. The concentrations of antibodies and sample conditions for an ELISA assay were optimized, and the assay was used to assess the eosinophilic granule protein EDN in 10 serum samples from patients with different manifestations of NCC.

Here, we discuss the possible inhibition, by the administration of glucocorticoid dexamethasone as an anti-inflammatory treatment, of the EDN levels of patients with parenchymal vesicular NCC that were like the levels in serum samples from healthy individuals. Additionally, the behavior of EDN in racemose NCC and NCC after formation of cystic calcifications, which were found to present high levels of EDN. Finally, the potential to follow the evolution of EDN, whose release depends directly on the conditions of treatment, is commented regarding the management of NCC and its contribution in the study of the part of the treatment not directed to eliminate the parasite.

**Keywords:** Eosinophil-Derived Neurotoxin, neurocysticercosis, ELISA.

## **RESUMEN**

*Taenia solium* es un platelminto causante de teniasis humana y cisticercosis en humanos y cerdos. La neurocisticercosis (NCC) se desarrolla cuando las larvas (quistes) infectan el sistema nervioso central. El tratamiento antihelmíntico de NCC lleva a los quistes a su degeneración y muerte, lo que frecuentemente está asociado a una fuerte respuesta inflamatoria en el hospedero y la presentación de síntomas. La sintomatología de la NCC incluye cuadros graves de ataques epilépticos e hipertensión intracraneal. El tratamiento de NCC consiste de una combinación de antihelmíntico y antiinflamatorio. Los antiinflamatorios utilizados son corticoesteroides, principalmente dexametasona, que inhibe la activación de los eosinófilos (vía IL-5, TNF- $\alpha$ ).

En NCC porcina se han observado infiltrados de eosinófilos alrededor de los quistes. Los eosinófilos son leucocitos que actúan liberando el contenido de sus gránulos, principalmente proteínas citotóxicas (Neurotoxina Derivada del eosinófilo - EDN, Proteína Principal del Eosinófilo -MBP, Proteína Catiónica del eosinófilo -ECP y Peroxidasa del Eosinófilo -EPX) y una gran cantidad de citoquinas. En tejidos, MBP y EPX producen principalmente induración y eritemas con infiltración celular moderada, mientras que EDN y ECP son capaces de alterar la integridad de los tejidos y causar inflamación, además de su neurotoxicidad.

Adicionalmente, EDN y ECP poseen actividad RNasa. EDN fue seleccionada para este estudio debido a sus propiedades neurotóxicas y a que sus particularidades facilitan su detección en ensayos de ELISA: menor basicidad y menor número de argininas y cisteínas. Las concentraciones de anticuerpos y las condiciones de las muestras para un ensayo de ELISA fueron optimizadas, y este ensayo se utilizó para detectar y cuantificar la proteína granular del eosinófilo EDN en 10 muestras de suero de pacientes con diferentes manifestaciones de NCC.

Se discute la posible inhibición, por la administración del glucocorticoide dexametasona como tratamiento antiinflamatorio, de los niveles de EDN de pacientes con NCC vesicular parenquimal que fueron similares a los niveles en muestras de suero de individuos sanos, además del comportamiento de EDN en la NCC racemosa y tras la formación de calcificaciones quísticas, que tienen niveles elevados de EDN. Finalmente, se comenta el potencial de monitorear la evolución de EDN, cuya liberación depende directamente de las condiciones del tratamiento, en el manejo de la NCC, y de su aporte en el estudio de la parte del tratamiento no dirigido a eliminar al parásito.

*Palabras clave:* Neurotoxina Derivada del Eosinófilo, neurocisticercosis, ELISA.



## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. *Taenia solium*

*Taenia solium* es un parásito hermafrodita, un gusano plano segmentado perteneciente a la clase de los cestodos, del filo de los platelmintos, animales invertebrados acelomados. El hospedero intermediario de *Taenia solium* es el cerdo; el humano es el hospedero definitivo. *T. solium* puede causar dos infecciones diferentes en los humanos: teniasis y cisticercosis. La teniasis es la infección con el estadio adulto del parásito, la tenia se aloja, exclusivamente, en el intestino delgado del humano. En la cisticercosis se da la infección de tejidos por las larvas o cisticercos en cerdos y/o humanos<sup>1</sup>.

La anatomía de *Taenia solium* adulta comprende la cabeza (escólex), el cuello y el cuerpo o estróbilo. La cabeza tiene las dimensiones de una cabeza de alfiler, allí se ubica el rostelo retráctil con un anillo doble de ganchos que permiten su anclaje en la pared intestinal, sumándose el apoyo de cuatro ventosas. El cuello es elongado y estrecho ensanchándose en el inicio del cuerpo. El cuerpo está conformado de proglótidas inmaduras y proglótidas maduras que se ubican más lejos del cuello. Las proglótidas maduras se encuentran grávidas, ocupadas por un útero repleto de huevos. Los huevos se excretan en las heces del hospedero ya sea dentro de las proglótidas grávidas desprendidas o de forma libre<sup>2</sup>.

El estadio infectante de *T. solium* es la larva; la primera etapa larval de los cestodos se denomina oncósfera, y se llama cisticerco a la forma que se enquistada en los tejidos. Cuando se ingieren los huevos microscópicos de *T. solium*, las oncósferas eclosionan y se activan en el intestino, penetran la pared intestinal y a través del sistema sanguíneo alcanzan órganos (principalmente cerebro, músculo estriado, músculo subcutáneo, y ojos), donde se desarrollan como cisticercos<sup>3</sup>. Los humanos se infectan al consumir la carne de cerdo que contiene cisticercos viables, y además adquieren cisticercosis cuando actúan como hospederos intermediarios al ingerir accidentalmente los huevos de *T. solium*, presentes en bebidas o alimentos contaminados con heces<sup>2</sup>.

El cisticerco es una vesícula blanquecina que contiene el escólex invaginado a partir del cual puede desarrollarse el estadio adulto de la tenia<sup>2,4</sup>. Se consideran cuatro fases, de viabilidad decreciente, para el cisticerco: la fase vesicular, la fase coloidal, fase granular nodular y la fase calcificada. En fase vesicular el cisticerco es viable, presenta una pared delgada y contiene fluido claro; en la fase coloidal el quiste pierde viabilidad, está rodeado por una cápsula conectiva y el fluido se enturbia; en la fase nodular la pared se engrosa y se adhiere totalmente a la cápsula y el escólex se torna granular; en la fase calcificada el quiste se reduce y endurece<sup>3,5</sup>.

El cisticerco de *T. solium* tiene dos formas, antiguamente conocidas como *Cysticercus cellulosae* (quiste vesicular, la forma más común) y *Cysticercus racemosus* (quiste racemoso). Los cisticercos localizados en la superficie cortical del cerebro (parénquima cerebral y/o dentro de los surcos corticales entre dos circunvoluciones cerebrales) presentan escólex y son de la forma vesicular. Los cisticercos de la forma racemosa carecen de escólex y se alojan en las cisternas basales (fisura de Silvio, cisterna del ángulo pontocerebeloso, cisterna perimesencefálica, cisterna prepontina y la cisterna de la región optoquiasmática<sup>6</sup>) del espacio

subaracnoideo. Esta forma presenta un crecimiento hiperproliferativo, en parte porque no es limitado por el parénquima cerebral.

## **I.2. Cisticercosis**

La cisticercosis (CC) resulta del enquistamiento de las larvas de *T. solium* en diferentes órganos del hospedero: tejido subcutáneo, músculo estriado, ojos, tejido visceral o cualquier otro órgano separado del sistema nervioso central (SNC)<sup>7</sup>. La CC puede pasar inadvertida, sin consecuencias más allá del efecto local por la propia masa del quiste (compresión del espacio subyacente al quiste). Este efecto puede causar dolores o inflamación pasajeros, como es frecuente en la cisticercosis subcutánea<sup>8</sup>. Los quistes en el corazón se encuentran en pacientes con una infección diseminada y son asintomáticos en la mayoría de casos<sup>9</sup>.

## **I.3. Neurocisticercosis (NCC)**

Cuando las larvas de *T. solium* se instalan en el SNC, se desarrolla la neurocisticercosis (NCC). La NCC es la infección por helmintos más frecuente del sistema nervioso central, es una enfermedad pleomórfica cuya sintomatología depende de la localización, número y estado de los quistes (viabilidad)<sup>10</sup>, y la respuesta inmune del hospedero. Las larvas se pueden alojar en el espacio subaracnoideo (forma meníngea), en los ventrículos cerebrales (forma ventricular) y en el parénquima (forma parenquimatosa) del encéfalo y médula espinal. La NCC parenquimal es la forma más común y los quistes pueden ser uno solo, unos pocos (hasta diez) o decenas e incluso algunos cientos cuando hay infección recurrente. La forma ventricular y meníngea suelen tener quistes de forma y dimensión más grandes, pudiendo agruparse como NCC extraparenquimal o subaracnoidea.

La NCC subaracnoidea se conocía como *Cysticercus racemosus* y es la forma más complicada de NCC. Los quistes racemosos se consideran formas malignas de NCC que resultan en una alta letalidad y que usualmente involucra la invasión de las cisternas basales, el cisticerco adquiere dimensiones de suficiente magnitud para obstaculizar la circulación de líquido cefalorraquídeo (LCR) por el espacio subaracnoideo, los ventrículos cerebrales y el canal ependimario, desencadenando la acumulación de LCR en los ventrículos cerebrales (hidrocefalia)<sup>11</sup>. Estos quistes no suelen presentar edema perilesional (formación de una hinchazón debido al cúmulo de líquidos en la periferia de la lesión quística) que es más común en quistes calcificados<sup>12</sup>.

### **I.3.1. Calcificación de los quistes en NCC**

La calcificación de los quistes se da cuando este pierde viabilidad, ya sea por causa del tratamiento o por su curso natural. Las calcificaciones en el SNC son designadas como NCC inactiva, sin embargo, una proporción de individuos con quistes calcificados desarrolla cuadros de epilepsia, de los cuales cerca del 50% se asocian a edemas perilesionales posiblemente formados como consecuencia de inflamación local<sup>13</sup>.

No se conoce por qué en algunos espacios pericísticos se forman estas lesiones y en otros no, una causa probable es la supresión brusca del tratamiento contra la NCC que años después repercute en lesiones calcificadas con un proceso inflamatorio grave<sup>14</sup>.

#### **I.4. Epidemiología**

Las enfermedades producidas por *T. solium* constituyen un serio problema de salud pública en la mayoría de países en vías de desarrollo, principalmente por las carencias en el saneamiento de desagües y malas prácticas de higiene que facilitan la infección de otras personas a través de la contaminación fecal del suelo o la inadecuada manipulación de alimentos. Además existe la posibilidad de autoinfección, ya sea por regurgitación de proglótidos del estómago o la autoinfección ano – mano – boca<sup>15</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud se estima que cerca de 50 – 100 millones de personas en el mundo tienen cisticercosis, la cual causa cerca de 50 000 muertes cada año y es además responsable de más del 50% de los casos de epilepsia en los países en vías de desarrollo<sup>16 17</sup>. En América Latina, al menos 5 millones de personas padecen de epilepsia, y en cerca de 3 millones no es atendida, gran porcentaje de esta causada por NCC<sup>18</sup>. En 1999, se estimó en 400 000 el número de casos de NCC sintomática en América Latina y 31 000 en Perú. Para el año 2005, estudios en el departamento de Tumbes llegaron a la conclusión de que la NCC contribuye en un 30% de los síndromes epilépticos en esta región<sup>19</sup>.

La cisticercosis es una de las pocas enfermedades erradicables, considerando que tiene un solo hospedero definitivo y que el cerdo es un animal netamente doméstico, lo que facilita el control del hospedero intermediario, además de la alta efectividad de los tratamientos para los estadios adulto e infectante (cisticerco) del parásito<sup>20</sup>.

#### **I.5. Diagnóstico de NCC**

Las modernas técnicas de neuroimágenes (Tomografía Axial Computarizada y Resonancia Magnética) han contribuido significativamente al diagnóstico clínico de la NCC. También existen diferentes pruebas inmunológicas confirmatorias pero no se usan aisladamente porque no discriminan la cisticercosis de la teniasis, además de que en lesiones calcificadas o lesiones cerebrales de quiste único pueden dar un resultado negativo<sup>21 22</sup>.

#### **I.6. Defensa y tratamiento contra la enfermedad**

El sistema inmunológico defiende al organismo de cuerpos extraños siempre que sean reconocidos como tales. La defensa se organiza a través de una compleja interacción entre diferentes tipos celulares, tejidos y órganos. La inmunidad en el ser humano puede clasificarse en dos niveles: la inmunidad innata o no específica, y la inmunidad adquirida o específica. La inmunidad adquirida o específica permite una respuesta dirigida hacia un patógeno. La defensa del organismo en este nivel es organizada a partir de los linfocitos (T o B) que son activados en respuesta a antígenos reconocidos como extraños<sup>23</sup>.

El sistema linfático y el sistema sanguíneo son los medios de transporte más efectivo para las células encargadas de la defensa. Las células de la sangre se diferencian en dos grupos: los eritrocitos o glóbulos rojos, y los glóbulos blancos o leucocitos. Estas son las células ejecutoras de la respuesta inmunológica, con funciones fagocíticas, degradadoras o de reconocimiento, que son esenciales en la defensa del organismo. Existen cinco tipos de



leucocitos, provenientes de dos linajes: células mieloides (neutrófilo, eosinófilo, basófilo y monocito) y células linfoides (linfocitos: linfocito T, linfocito B y células *natural killer*). Cada tipo tiene una forma y función distintiva<sup>24</sup>.

### **I.6.1. Eosinófilos**

La presencia anormalmente alta de eosinófilos o eosinofilia es un indicador de infecciones parasitarias<sup>25-26</sup>. En cerdos con NCC se ha observado que los quistes cerebrales están rodeados por infiltrados abundantes en eosinófilos, siendo posible que sean la primera línea de ataque contra los quistes<sup>27</sup>.

Los eosinófilos son células leucocíticas mieloblásticas derivadas de la médula ósea: son células con núcleo bilobulado que contienen gránulos citoplasmáticos, de los cuales pueden liberarse proteínas citotóxicas, preformadas y/o sintetizadas de novo: proteína principal básica (MBP – *Major Basic Protein*), neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN- *Eosinophil-Derived Neurotoxin*), proteína catiónica del eosinófilo (*Eosinophil Cationic Protein*) y peroxidasa del eosinófilo (EPX)<sup>28</sup>, además de una variedad de citoquinas, mediadores lipídicos y factores de crecimiento. Todas estas moléculas son capaces de iniciar rápidas y sostenidas respuestas de inflamación local y remodelación<sup>29-30</sup>.

El porcentaje de eosinófilos representa aproximadamente el 5% del total de leucocitos presentes en sangre, sin embargo puede encontrarse un número elevado de estos en tejidos específicos como la médula ósea y el tracto gastrointestinal, incluso pueden encontrarse en el timo y agrupados de grasa<sup>31</sup>. El número normal de eosinófilos en los tejidos varía dramáticamente, incluso dentro de un mismo sistema. En el tracto gastrointestinal normal, por ejemplo, puede encontrarse un incremento en el número de eosinófilos del estómago al colon, pero una ausencia normal de eosinófilos en el esófago.

#### **I.6.1.1. Eosinofilia**

La eosinofilia es el término utilizado para referirse al incremento del número de eosinófilos en la sangre periférica y/o en tejidos. La eosinofilia en tejidos resulta de un elevado reclutamiento de eosinófilos desde el sistema sanguíneo. Una vez en el tejido, los eosinófilos activados tienen la capacidad de ocasionar daño y disfunción tisular<sup>32</sup>.

La eosinofilia puede resultar de un desorden propio del organismo en el contexto de enfermedades hematológicas y desórdenes proliferativos, un aumento de células progenitoras (células con tendencia a diferenciarse hacia un tipo específico de célula) que se diferencian a eosinófilos en la médula ósea y en sangre, lo que se conoce como eosinofilia primaria<sup>33</sup>.

La eosinofilia secundaria es la más común y ocurre en respuesta a infecciones parasitarias (sobre todo helmintiasis: estrogiloidiasis, teniasis, cisticercosis, ascariasis, por ejemplo), alergias, reacciones adversas a medicamentos. Cuando se desconocen las causas de eosinofilia, se usa el término de eosinofilia idiopática<sup>33-34-35-36-37</sup>.

En eosinofilia el número de eosinófilos en sangre puede ser normal, pero en los órganos puede registrarse un elevado número debido al incremento del reclutamiento de eosinófilos desde el sistema sanguíneo, como sucede en pacientes con esofagitis eosinofílica y

neumonía eosinofílica. El escenario opuesto – eosinofilia en sangre sin evidencia de eosinofilia en tejido – también es reconocido<sup>38-39</sup>.

La eosinofilia a nivel periférico puede clasificarse como leve, moderada y grave. La eosinofilia periférica leve corresponde a un conteo absoluto de eosinófilos de 450 – 1 500 eosinófilos por microlitro de sangre (eos/ $\mu$ l); la eosinofilia moderada implica un rango de 1500 – 5 000 eos/ $\mu$ l; y se considera eosinofilia periférica grave a más de 5 000 eos/ $\mu$ l. El término de hipereosinofilia se refiere a más de 1 500 eos/ $\mu$ l. El número de eosinófilos aumenta porque se incrementa su producción en la médula ósea<sup>33</sup>.

El mecanismo reconocido por el cual los eosinófilos destruyen parásitos consta de una fase de reconocimiento por factores quimiotácticos producidos por otras células inflamatorias participantes y moléculas propias del parásito, una segunda fase de adhesión, mediada por anticuerpos IgG y proteínas del complemento, y una tercera etapa de destrucción parasitaria, con liberación de proteínas granulares y radicales oxígeno sobre la superficie del parásito<sup>40-41</sup>.

### **I.6.1.2. Liberación de componentes del eosinófilo**

La secreción de proteínas ocurre a través de la vía del retículo endoplásmico, donde son sintetizadas, y aparato de Golgi y red trans-Golgi, desde donde se dirigen a la membrana plasmática; el proceso utiliza vesículas de transporte<sup>42</sup>. En células del sistema inmune, como los eosinófilos, basófilos, neutrófilos y mastocitos, se encuentra activa una vía de vesículas de secreción adicional. Esta vía se caracteriza por el transporte vesicular a la superficie celular de pequeños “paquetes” de materiales concentrados en gránulos secretorios citoplasmáticos<sup>43-44</sup>. La secreción del contenido del gránulo secretorio se denomina “piecemeal degranulation” (PMD, degranulación hecha poco a poco)<sup>45-46-30</sup>.

PMD ha sido documentada en diferentes células inflamatorias, y en una variedad de modelos experimentales y enfermedades, habiéndose descrito inicialmente en los basófilos<sup>44-47</sup>. En los eosinófilos humanos, PMD es el proceso secretorio más frecuente en inflamación y alergias. En contraste con la clásica exocitosis granular, que incluye la fusión del gránulo con la membrana plasmática y la liberación del contenido total del gránulo, la degranulación hecha poco a poco hace posible la liberación regulada de proteínas y citoquinas específicas almacenadas en los gránulos durante respuestas eosinófilas<sup>45-46</sup>.

### **I.6.1.3. Eosinófilos como células secretorias**

Los eosinófilos tienen un amplio rango de funciones, típicamente están asociados con la defensa del hospedero frente a helmintos parásitos y con enfermedades inflamatorias y alérgicas como el asma. Además de ello, los eosinófilos son células esenciales para la remodelación de tejidos, reparación e inmunomodulación, además de que al parecer los eosinófilos modulan la fase aguda y la respuesta inflamatoria innata, así como la inmunidad adquirida asociada a las respuestas inmunes Th1 y Th2<sup>48-49-50</sup>.

La actividad inflamatoria de los eosinófilos es llevada a cabo por mecanismos de degranulación. Adicionalmente a PMD, otros dos mecanismos pueden actuar en la secreción de contenido granular de los eosinófilos: la exocitosis clásica, donde los gránulos liberan su contenido total tras fusionarse con la membrana plasmática, pudiendo darse la fusión entre

membranas granulares antes de la liberación extracelular; y un mecanismo de citólisis, que consiste en la deposición extracelular de gránulos intactos tras la lisis del eosinófilo<sup>51-52</sup>.

Durante el proceso inflamatorio, la exocitosis granular es raramente vista, la citólisis y PMD son los procesos reportados con mayor frecuencia en enfermedades humanas. Aunque la exocitosis de los gránulos es muy esporádica, es común observarla cuando los eosinófilos se encuentran en la superficie de parásitos helmintos multicelulares de gran tamaño<sup>46</sup>. La degranulación del contenido de los eosinófilos se ha observado en muchas enfermedades, entre ellas se encuentran la rinitis alérgica, colitis ulcerativa, la enfermedad de Chron, shigelosis, cólera, esofagitis esinofílica, strongiloidiasis, asma y poliposis nasal<sup>53-54-55-47</sup>.

Los eosinófilos contienen en sus gránulos más de una docena de citoquinas involucradas en la respuesta Th1, Th2 e inmunorregulación, además de cuatro proteínas catiónicas de importancia, clásicos efectores del eosinófilo en respuestas agudas: MBP (*Major Basic Protein*)<sup>56</sup>, EDN (*Eosinophil Derived Neurotoxin*)<sup>57</sup>, ECP (*Eosinophil Cationic Protein*)<sup>58</sup> y EPX (*Eosinophil Peroxidase*)<sup>33-50-57</sup>.

La respuesta secretoria de los eosinófilos humanos libera numerosas citoquinas con roles muy variados; las más importantes incluyen a TGF- $\alpha$  (Factor de Crecimiento Transformante alpha), TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral alpha), INF- $\gamma$  (Interferon gamma), Interleucinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18), y eotaxina <sup>26</sup>.

A diferencia de otras células del sistema inmune, como la mayoría de linfocitos, que deben sintetizar proteínas antes de secretarlas, las proteínas catiónicas y las citoquinas se encuentran preformadas y almacenadas en los gránulos secretorios de los eosinófilos. La secreción de las citoquinas eosinófilas preformadas es un evento rápido, se ha observado que para cada estímulo determinado se da una secreción diferencial de citoquinas<sup>52</sup>.

En muestras de suero de pacientes con NCC parenquimal, se ha encontrado que IL-4, IL-13 e IL-5 son las citoquinas destacadas de la batería de citoquinas involucradas en la respuesta Th2, mientras que en pacientes con NCC sub-aracnoidea predomina IL-5 e IL-10 <sup>59</sup>. IL-4, IL-10 e IL-13 son citoquinas producidas por los linfocitos T, basófilos, mastocitos y eosinófilos en actividad, con roles antiinflamatorios al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6; TNF- $\alpha$  tiene un rol similar, de menor relevancia, a IL-5 en la activación del eosinófilo y la expresión de las proteínas catiónicas del eosinófilo, ambos inhibidos por el glucocorticoide dexametasona, cuya actividad se describe en otro apartado<sup>60 61</sup>.

#### **1.6.1.4. Proteínas catiónicas del eosinófilo**

MBP (*Major Basic Protein*)<sup>56</sup>, EDN (*Eosinophil Derived Neurotoxin*)<sup>57</sup>, ECP (*Eosinophil Cationic Protein*)<sup>58</sup> y EPX (*Eosinophil Peroxidase*)<sup>33-50-57</sup> son las cuatro proteínas catiónicas principales de los gránulos del eosinófilo.

El núcleo del gránulo del eosinófilo está compuesto principalmente por la proteína MBP, mientras que la matriz del gránulo contiene las demás proteínas catiónicas (ECP, EPX y EDN)<sup>62 57</sup>. MBP tiene una masa molecular de 13.8 kDa, es la proteína más abundante, se expresa como dos homólogos MBP-1 y MBP-2, y está constituida por 117 aminoácidos responsables de su naturaleza extremadamente básica (17 argininas y 9 residuos de cisteína)<sup>63</sup>.

EPX es la proteína más abundante de la matriz del gránulo del eosinófilo, compuesta de dos subunidades, una cadena pesada de 50-57 kDa y una cadena ligera de 11-15 kDa. EPX cataliza la oxidación de halogenuros y pseudohalogenuros volviéndolos especies oxidantes potentes con la finalidad de neutralizar las especies reactivas de oxígeno generadas durante la activación del eosinófilo<sup>41 50 63</sup>.

La proteína ECP pertenece a la superfamilia A de las ribonucleasas. Su masa molecular se encuentra entre 16 kDa y 21.4 kDa debido a su glicosilación diferencial<sup>63</sup>. ECP es tan básica como MBP, y presenta dos isoformas, ECP-1 y ECP-2. La secuencia de aminoácidos presenta una homología de 66% con EDN, que también pertenece a la familia A de las ribonucleasas, y es 100 veces más potente que ECP<sup>41 63</sup>. EDN es una proteína de 18.6 kDa menos básica que ECP y MBP, debido a la menor cantidad de argininas en su secuencia de aminoácidos<sup>57</sup>.

### **I.6.2. Tratamiento de la NCC**

En NCC se combina el tratamiento antihelmíntico (praziquantel, albendazol) con antiinflamatorios (corticoesteroides, dexametasona), además de antiepilépticos<sup>64</sup>. El praziquantel es uno de los antihelmínticos más utilizados para el tratamiento en humanos de infecciones por trematodos. Este antihelmíntico provoca el rápido ingreso de iones de calcio a las células del parásito, paralizando los músculos, generando daño en el tegumento y exponiendo al parásito a las células inmunológicas del hospedero<sup>65 64</sup>.

Otro antihelmíntico principal, el albendazol, degenera de forma selectiva los microtúbulos del citoplasma del parásito, lo que conduce a menor producción de ATP y el agotamiento de la energía<sup>65</sup>. Ambos mecanismos son muy diferentes, y se acompañan de esteroides para controlar la respuesta inflamatoria que se desencadena al iniciarse la destrucción del quiste.

Cuando el quiste inicia el proceso de degeneración, ya sea de forma natural o por causa del tratamiento, pierde la capacidad inmunoreguladora que enmascara su presencia, permitiendo la actividad de los eosinófilos y demás mecanismos que desencadenan una respuesta inflamatoria exacerbada<sup>10</sup>.

Los esteroides inhiben la expresión de diferentes genes asociados a la inflamación, así como la Interleucina 5 (IL-5) y eotaxina, que intervienen en el reclutamiento, degranulación, supervivencia y mantenimiento de eosinófilos<sup>66-67</sup>. La dexametasona es un glucocorticoide que inhibe a IL-5 y por lo tanto interfiere en la degranulación, reclutamiento y supervivencia del eosinófilo; esta inhibición responde directamente a la concentración de dexametaxona<sup>68</sup>.

El reclutamiento, la activación y degranulación del eosinófilo es un mecanismo de defensa, en principio, como parte de la respuesta inmune innata, además de la presentación antigénica como parte de la respuesta inmune adaptativa<sup>23-69-29</sup>. Las proteínas catiónicas liberadas de los gránulos del eosinófilo no solo son capaces de generar daño al quiste, también pueden generar daño al tejido circundante, agravando la respuesta inflamatoria<sup>62-70</sup>.

La actividad inhibitoria de los esteroides frente a los eosinófilos es un punto de referencia clave que reclama mayor atención en el tratamiento. Se sugiere detectar los niveles de EDN como una herramienta de monitoreo de la evolución del tratamiento de esta

enfermedad pleomórfica, esencialmente en la inhibición de la inflamación, principal responsable de la mortalidad de esta enfermedad.

### **I.7. Justificación**

Existen reportes de la presencia de eosinófilos asociados a NCC, más no se ha establecido el rol que ejercen en esta enfermedad, cómo es su actividad, cuánto influyen en el desarrollo de la enfermedad y cómo podrían aprovecharse sus características<sup>27 13</sup>. Se decidió trabajar en torno a EDN debido a sus propiedades neurotóxicas comprobadas en el fenómeno de Gordon, que consiste en la degeneración de las células de Purkinje del cerebelo causada específicamente por EDN y ECP (ambas ribonucleasas, con homología de 67%) expresándose ataxia, rigidez muscular, parálisis y temblores que pueden conducir a la muerte; y su citotoxicidad frente a bacterias, virus y helmintos<sup>71-72</sup>.

EDN presenta particularidades respecto a MBP, ECP y EPX que facilitan su estudio: EDN es menos básica, y su capacidad de formar puentes disulfuros es reducida, esto debido a la menor proporción de residuos de argininas y cisteínas en su secuencia de aminoácidos. Las proteínas muy básicas forman complejos con facilidad (por ejemplo, las histonas); cuando las proteínas forman complejos, partes de su secuencia pueden ocultarse y no ser reconocidas por anticuerpos como los que se utilizan en los ensayos de ELISA. El grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína es muy reactivo, forma fácilmente enlaces disulfuro difíciles de romper, requieren de un paso de reducción para ello, lo que puede obviarse en el caso de EDN<sup>41-63</sup>.

El monitoreo de las concentraciones de EDN puede ser útil como un indicador de inflamación e infección, y de la evolución de la respuesta inflamatoria. Por ejemplo, en un estudio de LCR en ovejas infectadas con *Taenia multiceps* (coenurosis), la sola presencia de eosinófilos permitió determinar la presencia o ausencia de inflamación debida al parásito<sup>73</sup>.

En terapias anti IL-5, silenciamiento de receptores de IL-5 y el tratamiento con corticoesteroides como estrategias para combatir la actividad de los eosinófilos se han medido las proteínas catiónicas del eosinófilo e IL-5 principalmente para monitorear su inhibición<sup>74 75 76</sup>. También se les utiliza como marcadores, por ejemplo: se cuantifican los niveles de EDN y ECP en suero como guía del manejo de la terapia con esteroides en pacientes con asma; o el uso de las proteínas granulares del eosinófilo como herramienta de medición para schistosomiasis intestinal en muestras de heces humanas antes y después de tratamiento con Praziquantel<sup>77 78 79</sup>. Estos modelos son factibles para NCC, y contribuirían enormemente en lograr tratamientos mejor personalizados y el seguimiento de la enfermedad.

## II. HIPÓTESIS

La prueba de ELISA estandarizada para detectar la proteína granular del eosinófilo EDN permite discernir entre personas con eosinofilia y sin eosinofilia.

## III. OBJETIVOS

### III.1. Objetivo general:

- Estandarizar el ensayo de ELISA para detectar la proteína granular del eosinófilo EDN (*Eosinophil Derived Neurotoxin*) en muestras de sueros de voluntarios sanos y en muestras de suero de personas con eosinofilia y su aplicabilidad en pacientes con NCC tratados.

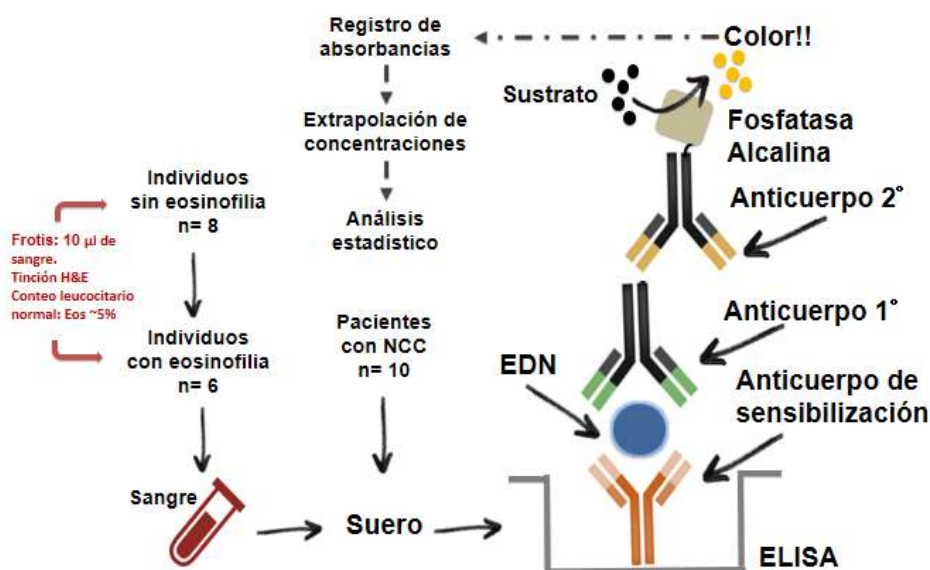
### III.2. Objetivos específicos:

- Optimizar la titulación del anticuerpo de captura para la detección de EDN mediante ELISA.
- Extrapolar los valores de densidad óptica de EDN a valores de concentración a partir de la titulación de la proteína estándar purificada EDN.
- Detectar mediante ELISA la proteína eosinófila EDN en muestras de suero de voluntarios humanos sanos (no eosinofílicos) y suero de pacientes con eosinofilia probada.
- Evaluar la relación entre las concentraciones de la proteína EDN y el número de eosinofilos.
- Determinar si la prueba de ELISA estandarizada permite detectar EDN en suero de pacientes con NCC tratados

#### IV. DISEÑO Y METODOLOGÍA DE ESTUDIO

##### IV.1. Diseño experimental

El diseño experimental se resume en la **Figura 1**. Se inició con la identificación de los grupos de evaluación. Los individuos sanos y los individuos con eosinofilia se identificaron mediante un frotis de sangre, y los sueros fueron utilizados para estandarizar el ensayo de ELISA. El ELISA estandarizado fue del tipo *Sandwich* indirecto dirigido a la Neutotoxina Derivada del Eosinófilo (EDN). La metodología se describe se describe con mayor detalle en las siguientes secciones.



**Figura 1.** Diseño experimental para la estandarización de la prueba de ELISA para EDN

##### IV.2. Muestras biológicas

Las muestras biológicas se obtuvieron como sangre y otras como suero. Las muestras **de sangre** son de pacientes humanos con eosinofilia sin tratamiento, obtenidas a través de la colaboración con el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) (n=6) y el Hospital Nacional Cayetano Heredia (n=2), y de voluntarios sanos sin infecciones en curso ni bajo efecto de medicamentos (n=10); de estas muestras se seleccionaron 6 en base a un conteo de leucocitos normal. Las muestras **de suero** son de pacientes humanos con NCC en tratamiento (n=10), obtenidas a través de la colaboración con el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas “Santo Toribio de Mogrovejo” (INCN).

Cada muestra de sangre se acompañó de conteo relativo de leucocitos, para determinar la condición de eosinofilia o no eosinofilia (**Ver ANEXO 1: Rango normal de leucocitos en humanos**), excepto en las dos muestras de sangre donadas por el Hospital Nacional Cayetano Heredia y las 10 muestras de suero de pacientes con NCC. El suero de las muestras de sangre se obtuvo por centrifugación a 3000 RPM por 20 minutos a 4°C.

La estandarización de la prueba de ELISA se realizó con muestras de suero de individuos sanos e individuos con eosinofilia. Los sueros de pacientes con NCC tratados, se utilizaron para determinar si la prueba de ELISA estandarizada nos permite detectar la proteína EDN en el suero de estos pacientes (**Ver Anexo 2: Características de las muestras utilizadas en la estandarización del ELISA para muestras de pacientes con NCC**).

La determinación del tamaño muestral ideal para demostrar la existencia o no de diferencias en la concentración de EDN en pacientes con NCC con tratamiento y sin tratamiento se realizó utilizando la fórmula para el cálculo de tamaño muestral desconociendo el tamaño de la población:

$$n = \left( \frac{Z_{\alpha}^2 S^2}{E^2} \right),$$

donde Z es el nivel de confianza; el valor en la tabla normal para Z de acuerdo al nivel de confianza de 0.95 (1- $\alpha$ ) es de 1.96; S es la desviación estándar de la población, considerando S=0.5; E es el porcentaje de error o incertidumbre a tolerar, siendo E=20%<sup>80</sup>.

Reemplazando:

$$n = (1.96^2 * 0.5^2) / 0.2^2 = 24$$

Considerando la probabilidad de un error de tipo I (falsos positivos) con significancia  $\alpha = 0.05$ , 24 muestras (19 muestras y 5 más, suponiendo un 20% de pérdidas por efectos de experimentación u otros) tendrían 80% de poder para detectar una diferencia de 0.8 de desviación estándar en los niveles de EDN antes y después del tratamiento (un tamaño de efecto grande)<sup>81</sup>. Sin embargo, 10 muestras de pacientes con NCC no alcanzan el tamaño muestral mínimo (n=24), y haría falta un grupo de personas identificadas como infectadas con NCC pero aún sin tratamiento al cuál no se tuvo acceso para hacer la comparación, esto debido a las fuertes restricciones propias del INCN. Por lo tanto, las determinaciones en el grupo de pacientes con NCC serán consideradas un piloto.

Todas las muestras cuentan con un consentimiento informado para su colección y para su empleo en investigación, y fueron recibidas en el Laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis (LIPE) donde se almacenaron a -80°C.

#### **IV.2.1. Cuento relativo de eosinófilos**

El conteo relativo de eosinófilos se realizó mediante frotises de sangre en lámina periférica y la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) para discriminar el tipo de leucocito. Brevemente, en el frotis se identificaron 100 leucocitos en un aumento de 100X, posteriormente se discriminó el tipo de leucocito (monocito, basófilo, neutrófilo, eosinófilo y/o linfocito) (**Ver ANEXO 3: Cuento relativo de leucocitos de las muestras de sangre**). La tinción de H&E se utilizó para distinguir la forma de los núcleos y la presencia de gránulos.

##### **IV.2.1.1. Tinción de hematoxilina-eosina (H&E)**

Brevemente, una vez seco el frotis, se fijó con etanol al 100 %. Posteriormente se procedió con la tinción del frotis con Hematoxilina por 8-10 minutos, se eliminó el exceso de



hematoxilina y se dejó secar. Tras ello se realizó la tinción con eosina por 4-5 minutos. Se eliminó el exceso de eosina y se dejó secar. Finalmente, se cubrió con una lámina cubre-objeto la sección de interés para el conteo (zona intermedia del frotis).

### IV.3. Consideraciones éticas

Las muestras utilizadas cuentan con autorización previa del proyecto “Establecimiento de un banco de muestras biológicas para evaluación de pruebas diagnósticas” con código SIDISI 01034, para su uso en investigaciones futuras. Los procedimientos de este proyecto cumplen con la aprobación del Comité de Ética de Humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Constancia de autorización ética No. 488-24-16, SIDISI 67401).

### IV.4. ELISA

#### IV.4.1. Estandarización del ELISA

El tipo de ELISA que se realizó para la detección de la proteína EDN es el *sándwich* indirecto (**Figura 1**). Se utilizaron placas Immulon 4 HB (de sensibilidad extra alta a proteínas) de 96 pocillos con fondo plano. Cada pocillo fue sensibilizado con la adecuada concentración (se ensayaron las concentraciones de 2.5, 1.25 y 0.625 ng/μl) del anticuerpo monoclonal de captura específico para EDN (anticuerpo monoclonal hecho en ratón, clona 6D1.5/A5, no comercial, donación del *National Institutes of Health* -NIH) diluido en *coating buffer* (0.050 M *buffer* Carbonato-Bicarbonato de Sodio, pH 9.6), se dejó incubando la placa toda la noche (16 h) a 4°C.

Tras la sensibilización de la placa con el anticuerpo de captura, se realizó el bloqueo de los pocillos con leche descremada (*Instant Nonfat Dry Milk Nestle Carnation*; se probaron las concentraciones de 5% y 7%) en PBS 1X + Tween 20 0.05% por dos horas a 37°C. Las muestras se colocaron por duplicado en una dilución 1:40, dilución que fue estandarizada después de probar varias diluciones (como diluyente se utilizó PBS 1X + Tween 20 0.05% + 1% leche) y se procedió a incubar la placa con las muestras toda la noche a 4°C.

El anticuerpo policlonal de detección anti EDN de conejo (NOVUSBIO, cat N° H00006036-A01) se incubó en la placa de ELISA a 37°C por 3 horas en una dilución recomendada de fábrica de 1:5 000. El conjugado – Fosfatasa alcalina (AP) de cabra anti IgG Fc de conejo (AP-Goat anti-rabbit IgG Fc, 1mg/ml; ABCAM, cat N° ab97197) – se incubó en la placa de ELISA por 1.5 horas a 37°C en una dilución pre-establecida de 1:5 000 (recomendado por el fabricante). Luego de cada paso las placas se lavaron cuatro veces con PBS 1X + Tween 20 0.05%. Se adicionó 100 μl del sustrato tetrametilbencidina (1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution; KPL) para iniciar la reacción colorimétrica. Luego de 10-20 minutos se detuvo la reacción con 50 μl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2M. Finalmente se registraron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA de 96 pocillos (VersaMax ELISA Microplate Reader).

Los ensayos para encontrar las concentraciones adecuadas para el anticuerpo monoclonal de sensibilización o de captura (mAb EDN) se realizaron en las muestras de suero de humanos sanos y muestras de suero eosinofílicas, además se usó la proteína purificada EDN como estándar (0.05 mg/ml; ABCAM, cat N° ab159356)). Así mismo se utilizaron las mismas

muestras para determinar la dilución óptima de las muestras para la captura de la proteína por ELISA y el límite de detección de la prueba.

#### **IV.4.2. ELISA con muestras de pacientes con NCC**

Una vez estandarizado el ensayo de ELISA, se evaluaron los niveles de la proteína del eosinófilo EDN en muestras de suero de voluntarios sanos, pacientes con NCC y pacientes con eosinofilia, además de titular la proteína EDN purificada. Cada muestra fue colocada siempre por duplicado en cada experimento.

#### **IV.5. Construcción de la curva estándar de la proteína purificada EDN**

Se calculó la media de las absorbancias de cada una de las concentraciones utilizadas de la proteína purificada EDN y se construyó una curva de absorbancia en el eje Y vs el logaritmo de la concentración en el eje X. Se extrapola la ecuación derivada del ajuste de la titulación de la proteína purificada EDN y se calculó a partir de ésta las concentraciones de la proteína EDN en los grupos de muestras (Sanos (Eos-), eosinofílicos (Eos+) y pacientes con NCC (NCC)).

El ajuste utilizado para la extrapolación de la ecuación de concentración, fue un modelo de regresión no lineal (interpolación sigmoideal de 4 parámetros – *sigmoidal four-parameter interpolation*) con un intervalo de confianza de 95% usando el programa Prism® (Graphpad, San Diego, CA) versión 6. Este ajuste se utiliza en la titulación de curvas de concentración en ELISA para datos simétricos que no siguen una distribución lineal<sup>82</sup>.

#### **IV.6. Análisis de resultados**

##### **IV.6.1. Variables**

Variable dependiente:

- Concentración (ng/μl) de la proteína EDN (**[EDN]**): obtenida a partir de los valores de absorbancia. Esta es de naturaleza cuantitativa y medible en una escala continua.

Las variables independientes son:

- Número de eosinófilos (**#Eos**): variable cuantitativa medida por el conteo de eosinófilos en lámina periférica.
- En pacientes con NCC: Número de quistes en el cerebro (**#Cyst**): variable cuantitativa continua.

##### **IV.6.2. Análisis estadístico**

Para evaluar si las concentraciones de la proteína EDN en los individuos con tratamiento contra NCC difirió de la de los individuos sanos y/o de los individuos con eosinofilia, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de U de Mann-Whitney, evaluando previamente la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Para evaluar si la diferencia en el número de eosinófilos en las muestras eosinofílicas y las muestras no eosinofílicas fue estadísticamente significativa, se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney.

Para evaluar la correlación entre el número de eosinófilos (#Eos) y la concentración de la proteína EDN ([EDN]) se utilizó el análisis de correlación de Spearman.

En el grupo de muestras de pacientes con NCC, para evaluar la correlación entre el número de quistes y la concentración de la proteína EDN se utilizó el análisis de correlación de Spearman.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Prism® (Graphpad, San Diego, CA) versión 6. Se trabajó con un nivel de significancia del 95%, donde valores de p menores a 0.05 se consideran estadísticamente significativos en los análisis.

## V. RESULTADOS

### V.1. Estandarización del ensayo de ELISA para la detección de la proteína EDN suero humano.

El ensayo de ELISA realizado para evaluar la condición de los reactivos utilizados en la estandarización se resume en la **Figura 2**, en cada columna se fue excluyendo alguno de los reactivos: el anticuerpo monoclonal de captura anti EDN (**CAP**), la leche descremada para los bloqueos (**BLO**, PBS 1X+ 0.05% Tween 20 + leche 5%), el anticuerpo policlonal anti EDN hecho en conejo (anticuerpo de detección, **DET**), el anticuerpo anti IgG Fc de conejo conjugado con la enzima Fosfatasa Alcalina de cabra (AP-Goat anti-rabbit IgG Fc, **CON**), el sustrato para iniciar la reacción colorimétrica (TMB, **SUS**). El estándar fue proteína purificada (EDN, 1ng/μl) y la reacción colorimétrica se detuvo con ácido sulfúrico 2M.

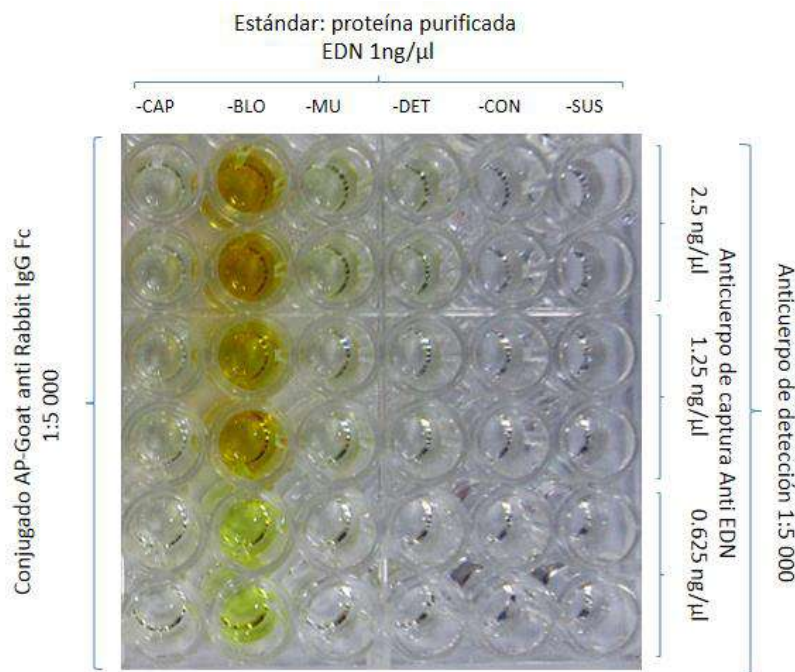


Figura 2. Evaluación de los reactivos utilizados para estandarizar el ensayo de ELISA para EDN.

-CAP: Columna sin el anticuerpo monoclonal de captura anti EDN. -BLO: Columna sin bloqueo. -MU: Columna sin estándar. -DET: Columna sin anticuerpo primario o anticuerpo de detección. -CON: Columna sin anticuerpo secundario o conjugado. -SUS: sin sustrato tetrametilbencidina. Se utilizó 0.625, 1.25 y 2.5 ng/μl de concentración de anticuerpo de captura anti EDN, anticuerpo de detección en dilución 1:5 000 y conjugado: Anticuerpo Fosfatasa alcalina de cabra anti IgG Fc de conejo (AP-Goat anti-rabbit IgG Fc) en dilución 1:5 000. Como muestra se utilizó la proteína purificada EDN 1ng/μl.

Se observa (**Figura 2**) que los anticuerpos anti-EDN utilizados son específicos para su correspondiente antígeno o anticuerpo, hecho que se puede ver por la falta de reactividad en las columnas sin anticuerpo de captura (-CAP), sin anticuerpo de detección (-DET) y sin conjugado (-CON). Además, tampoco hubo reconocimiento en ausencia de muestra (columna -MU).

Se vio que el ruido de fondo aumentaba con la concentración del anticuerpo de captura; esto se aprecia con mayor claridad en la columna sin muestra (-MU). Por ello se consideró adecuado utilizar la concentración intermedia del anticuerpo (1.25 ng/μl), para reducir el ruido de fondo y a la vez mantener una alta sensibilidad de reconocimiento de EDN.

### V.1.1. Estandarización de bloqueo: determinación de la importancia y condiciones del bloqueo (% leche)

Se buscó determinar el porcentaje adecuado de leche para los bloqueos, y no se observó diferencia entre leche al 5% y leche al 7%. La importancia del bloqueo se puede notar comparando las absorbancias de la muestra de suero eosinofílica P2, con bloqueo y sin bloqueo (**Figura 3**): en ausencia de bloqueo la absorbancia es aproximadamente 1.25 veces la absorbancia con bloqueo. Se decidió utilizar un bloqueo con leche al 7% para la estandarización del ELISA.

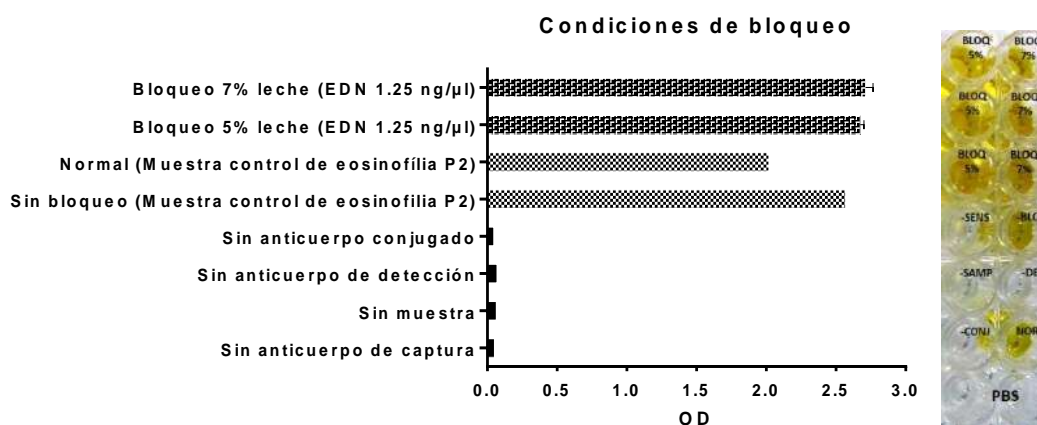


Figura 3. Estandarización del paso de bloqueo en el ELISA.

*BLOQ 5%: Bloqueo de pocillos con 1X PBS + 0.05% Tween 20 + 5% leche. BLOQ 7%: Bloqueo de pocillos con 1X PBS + 0.05% Tween 20 + 7%leche. -CAP: Columna sin el anticuerpo monoclonal de captura anti EDN. -BLO: Columna sin bloqueo. -SAMP: Columna sin estándar, sin muestra. -DET: Columna sin anticuerpo primario o anticuerpo de detección. -CON: Columna sin anticuerpo secundario o conjugado. NORM: Muestra eosinofílica P2. Se utilizó 1.25 ng/μl de anticuerpo de captura anti EDN por pocillo, anticuerpo de detección (anticuerpo policlonal hecho en conejo anti EDN) en dilución 1:5 000 y conjugado (Anticuerpo Fosfatasa alcalina de cabra anti IgG Fc de conejo (AP-Goat anti-rabbit IgG Fc)) en dilución 1:5 000.*

### V.1.2. Titulación de la proteína purificada EDN como estándar (control) de detección en el ELISA

El ajuste utilizado para titular la proteína purificada EDN a partir de una concentración stock de 1mg/ml fue un modelo de regresión no lineal (interpolación sigmoideal de 4 parámetros) con un intervalo de confianza de 95%, ajuste utilizado típicamente en la titulación de curvas de concentración en ELISA para datos simétricos, que no siguen una distribución lineal<sup>82</sup>.

En la **Figura 4** se aprecia la interpolación realizada en un rango de concentraciones a partir de 50 ng/μl, disminuyendo en la décima parte por punto hasta un límite inferior de 0.00005 ng/μl. Los valores de absorbancia para los tres puntos más cercanos a cero no muestran ser diferentes en gran medida, por lo que se retiraron, así como el punto más alto (50 ng/μl) debido a la linealidad que se aprecia en la parte superior del gráfico.

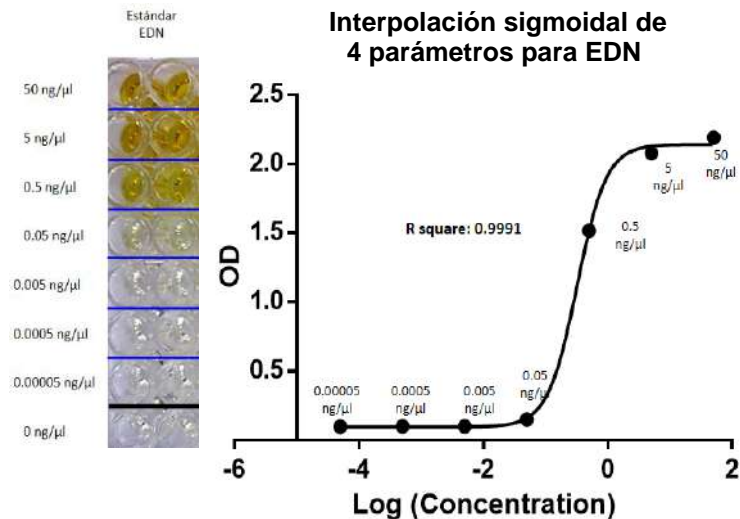


Figura 4. Interpolación sigmoideal de 4 parámetros para EDN [50 ng/μl-0.00005 ng/μl].

Posteriormente, se realizó la interpolación sigmoideal de 4 parámetros para titular la proteína purificada EDN, considerando un rango de concentraciones entre 0.005 y 1.25 ng/μl (**Figura 5**). Se logró cubrir en este rango la mayor parte de los puntos de la curva, con los que fue posible continuar con la estandarización de las condiciones de las muestras de suero para el ensayo de ELISA.

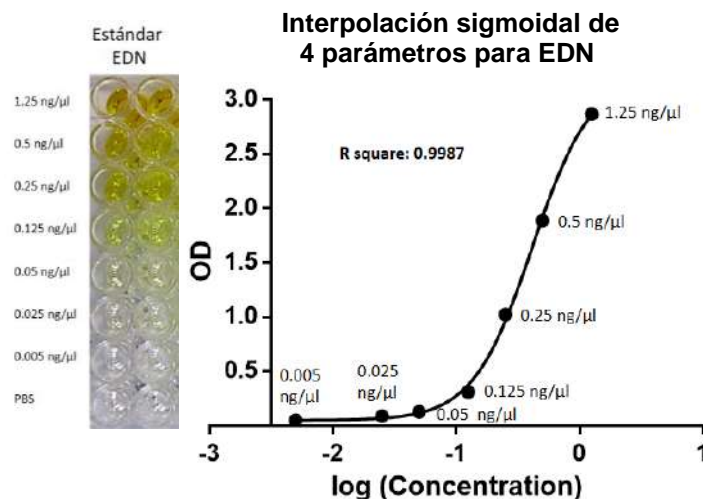


Figura 5. Interpolación sigmoideal de 4 parámetros para EDN [0.005 ng/μl-1.25 ng/μl].

### V.1.3. Estandarización de las condiciones de las muestras de suero para el ensayo de ELISA

Para estandarizar las condiciones de las muestras para el ELISA, se utilizaron sueros de pacientes con eosinofilia confirmada mediante conteos relativos de leucocitos en lámina periférica (que consiste en extender una o dos gotas de sangre periférica en una lámina portaobjetos) y tinción H&E, y sueros de voluntarios sanos sin eosinofilia confirmados con el mismo método (**Anexo 3: Conteo relativo de leucocitos de las muestras de sangre**). Los sueros se probaron en cuatro diluciones (1:5, 1:10, 1:20 y 1:40) para determinar el límite de detección y diferenciación de las muestras de suero eosinofílicas y no eosinofílicas. Como diluyente se utilizó PBS 1X + Tween 20 0.05% + 1% leche.

Las muestras de suero utilizadas fueron: TBC, de un paciente con tuberculosis con eosinofilia secundaria generada por reacción adversa a medicamentos, (lamentablemente no se pudo contrastar esta condición al no obtener los datos del conteo de leucocitos del paciente); J2, de un paciente infectado con Herpes virus con sospecha de leucocitosis, lo que no pudo confirmarse al no obtener los datos del conteo de leucocitos del paciente; P1, P2, P3 y P4, que son muestras eosinofílicas confirmadas con su respectivo conteo de leucocitos, y N1, N2, N3 y N4, que son muestras no eosinofílicas con su respectivo conteo de leucocitos (**Ver Anexo 2 y Anexo 3**).

Se incluyó además la titulación de la proteína estándar EDN (**Figura 6: Barras negras, y Figura 7**). En la **Figura 6** cada gráfico muestra una dilución de suero diferente (1:5, 1:10, 1:20 o 1:40). Las barras negras corresponden a las lecturas para la proteína estándar EDN, las barras azules a las lecturas de las muestras eosinofílicas (Eos+), y las barras rojas a las de las muestras no eosinofílicas (Eos-).

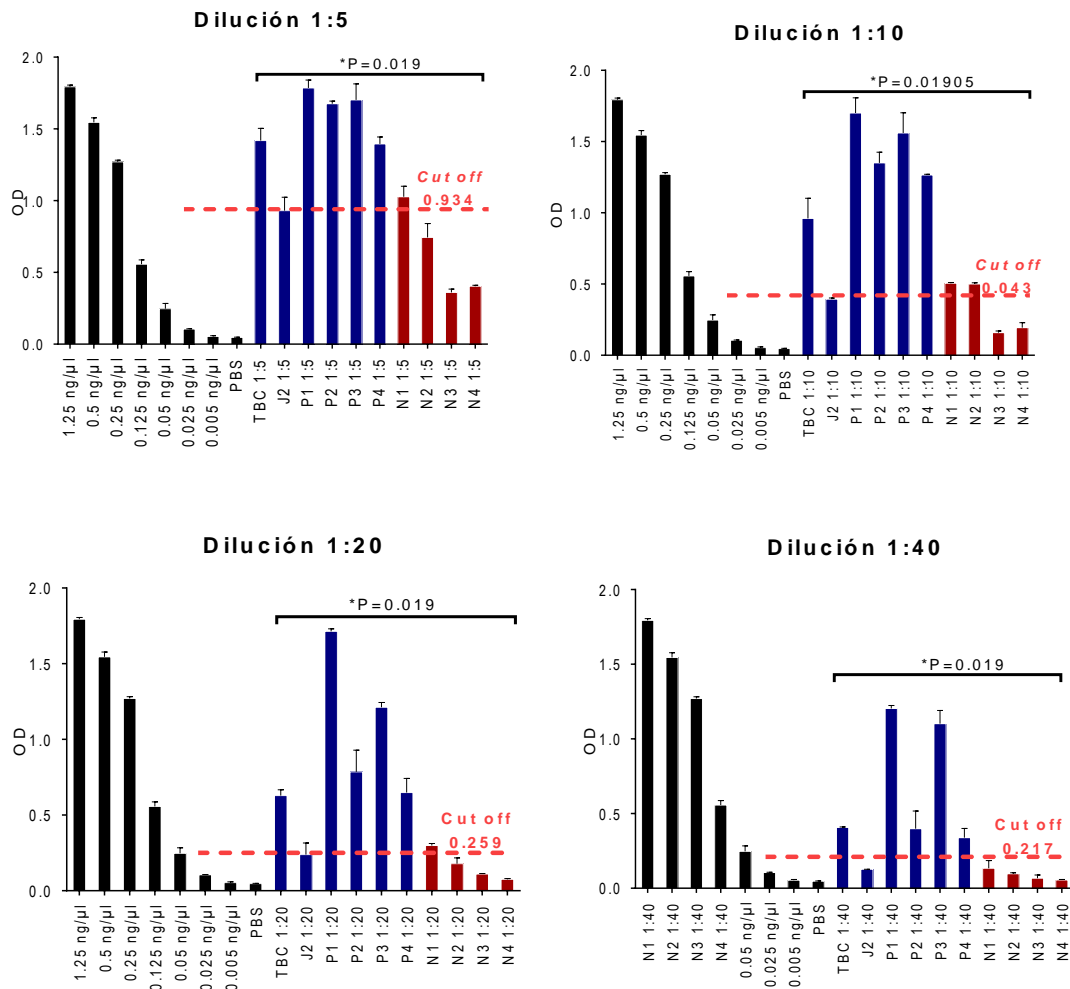


Figura 6. Estandarización de la dilución de las muestras de suero para el ensayo de ELISA. Las barras negras representan la proteína estándar EDN, las barras azules a las muestras eosinofílicas (Eos+) y las barras rojas las muestras no eosinofílicas (Eos-).

Las muestras eosinofílicas (Eos+, barras azules) perfilan mayores valores de absorbancia que las muestras no eosinofílicas (Eos-, barras rojas) en la captura de la proteína EDN (**Figura 6**). Es en la dilución de 1:40 donde es posible diferenciar claramente entre muestras eosinofílicas y no eosinofílicas, estableciendo un límite de diferenciación en el punto correspondiente a la concentración de 0.05 ng/μl aproximadamente (*cut off*= 0.217). Mayores diluciones de la muestra posiblemente pongan en riesgo la detección óptima de la proteína EDN, dado que se observa que el límite inferior de detección (PBS) de la prueba en la dilución 1:40 es cercano a los valores de OD de las muestras no eosinofílicas.

En las pruebas de diagnóstico es frecuente realizar el cálculo de un punto de corte (*cut off*) que establece un límite para discernir qué resultados se consideran positivos y cuáles negativos. A pesar de que la estandarización realizada no es dirigida al diagnóstico, se realizó el cálculo de este valor siguiendo la siguiente fórmula:

$$Cut\ off = X + 3SD,$$



donde X es la media de las absorbancias obtenidas de los controles negativos y SD es la desviación estándar<sup>83</sup>.

El valor obtenido para la dilución 1:5 fue:

$$Cut\ off = 0.6340875 + 3(0.099975) = 0.9340125$$

El valor obtenido para la dilución 1:10 fue:

$$Cut\ off = 0.3400125 + 3(0.029875) = 0.4296375$$

El valor obtenido para la dilución 1:20 fue:

$$Cut\ off = 0.1658875 + 3(0.030925) = 0.2586625$$

El valor obtenido para la dilución 1:40 fue:

$$Cut\ off = 0.169 + 3(0.0159924) = 0.2169772$$

De estos resultados, se observa en la Figura 6, dilución 1:40, considerando el valor graficado del cut-off (0.217), que J2 (OD=0.1272) se comporta más como una muestra no eosinofílica que como una muestra eosinofílica, además de no contar con información complementaria para esta muestra (el conteo de leucocitos). Por estas razones, J2 se excluyó de las pruebas del ELISA para la detección de la proteína EDN. En la Figura 7, se puede apreciar la titulación de la proteína estándar EDN en una dilución 1:40, se observa que los puntos corresponden adecuadamente a la curva de interpolación sigmoideal de 4 parámetros.

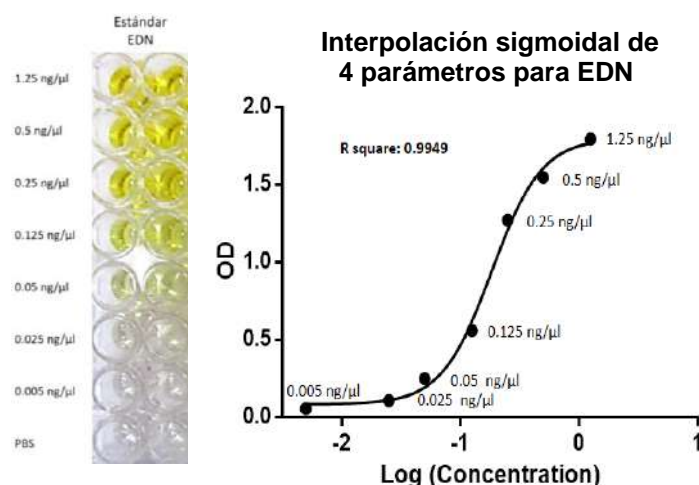


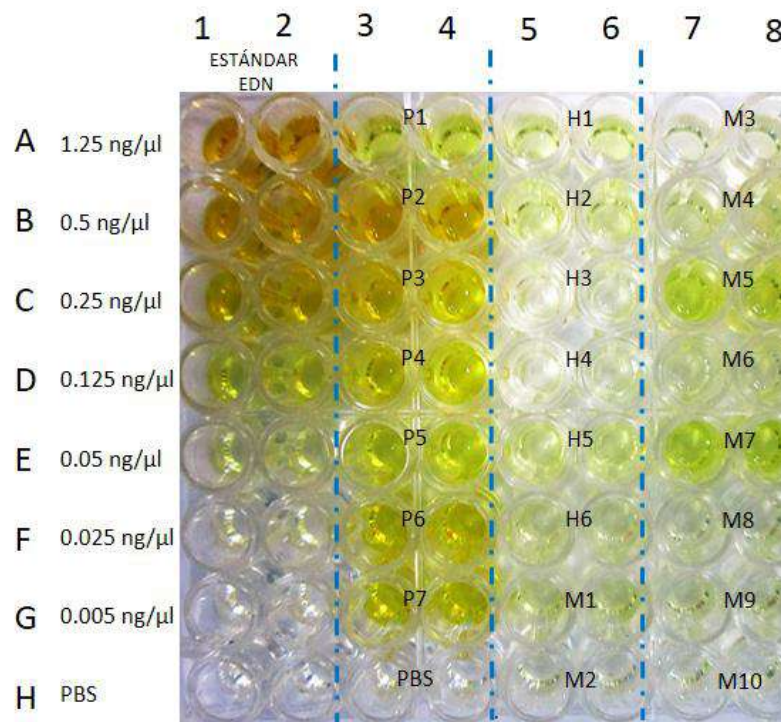
Figura 7. Titulación de la proteína estándar EDN en dilución 1:40.

#### V.1.4. ELISA para la detección de la proteína granular del eosinófilo EDN en muestras de suero de pacientes con NCC

Las muestras de suero de pacientes con NCC no cuentan con la información del conteo leucocitario, así como la muestra de código TBC. La muestra de suero J2 se excluyó por no presentar un respaldo consistente de ser una muestra eosinofílica. En total se incluyeron 7 muestras de suero con eosinofilia (TBC, P1, P2, P3, P4, P5, P6), 6 muestras de suero no

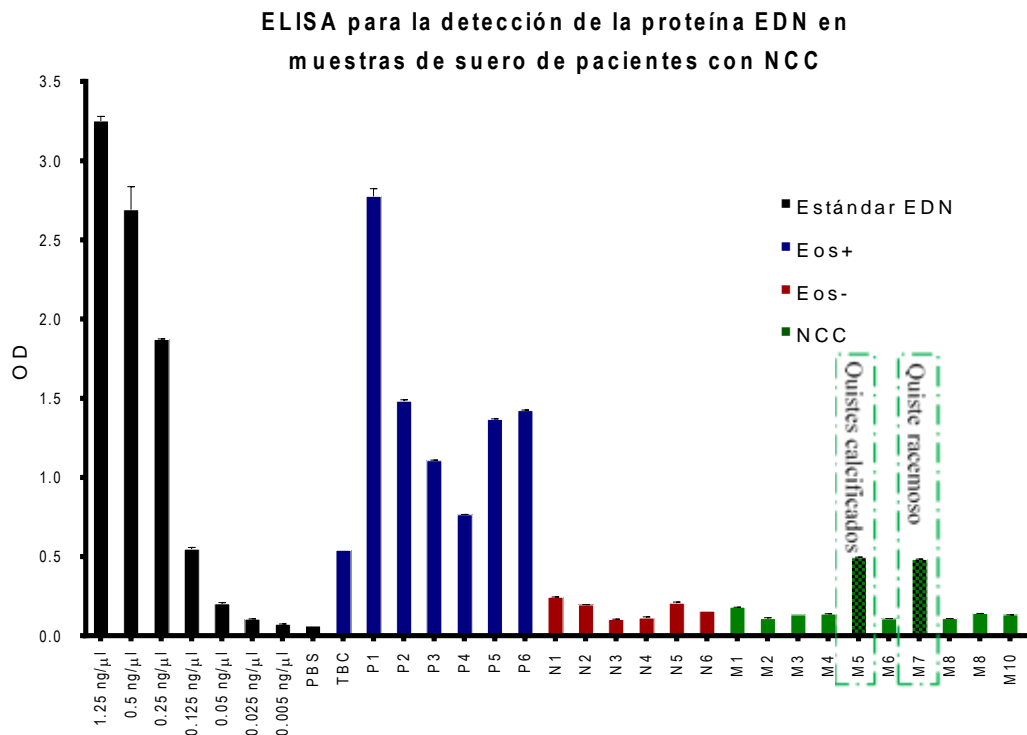
eosinofílicas (N1, N2, N3, N4, N5 y N10) y 10 muestras de suero de pacientes infectados con NCC, con tratamiento (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 y M10) (**Figura 8**). Para más detalles de las muestras, revisar el **Anexo 2: Características de las muestras utilizadas en la estandarización del ELISA para muestras de pacientes con NCC**.

Se utilizaron las condiciones ya estandarizadas, se utilizó 1.25 ng/μl de concentración de anticuerpo monoclonal de captura anti EDN por pocillo, un bloqueo de 7% de leche, el anticuerpo de detección en dilución 1:5 000, el anticuerpo conjugado: Anticuerpo Fosfatasa alcalina de cabra anti IgG Fc de conejo (AP-Goat anti-rabbit IgG Fc) en dilución 1:5 000 y por último la dilución de las muestras de suero en 1:40, de igual forma en la proteína estándar purificada EDN en un rango de concentraciones de [0.005 ng/μl a 1.25 ng/μl] (**Figura 8**).



*Figura 8. Resultados de ELISA para la detección de la proteína EDN en muestras de suero de pacientes con NCC.*

En la **Figura 9**, puede observarse el resultado obtenido, las barras negras corresponden a la proteína estándar EDN (curva de concentraciones en **Figura 10**), las barras azules a las muestras eosinófilicas (Eos+), las barras rojas a las muestras no eosinófilicas (Eos-) y las barras verdes a las muestras de pacientes con NCC con tratamiento. Las muestras de suero con NCC con tratamiento (NCC) muestran a primera vista valores de absorbancia similares a las muestras de suero sin eosinofilia, excepto por las muestras M5 y M7 que corresponden a formas diferentes de la enfermedad, la presencia de quistes calcificados y NCC racemosa, respectivamente.



*Figura 9. Estandarización de ELISA para la detección de la proteína granular del eosinófilo EDN en muestras de suero de pacientes con NCC.*

La ecuación del modelo de interpolación sigmoideal de cuatro parámetros para la titulación de la proteína estándar purificada EDN se define como:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}, \text{ donde } a \text{ es el valor mínimo que puede ser obtenido,}$$

*b* es la pendiente de la curva,

*c* es el punto de inflexión y

*d* es el máximo valor que puede obtenerse.

Reemplazando:

$$y = 3.248 + \frac{0.08301 - 3.248}{1 + \left(\frac{x}{0.2367}\right)^{2.415}}$$

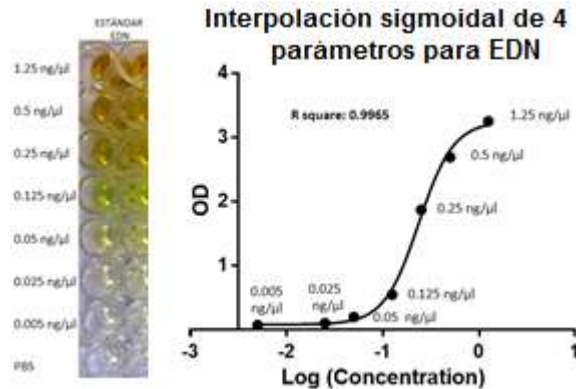


Figura 10. Titulación de la proteína estándar EDN en dilución 1:40, ELISA para la proteína EDN en pacientes con NCC

Los valores de la ecuación se obtuvieron con el programa Prism® 6 (Graphpad, San Diego, CA). A partir de la ecuación se calculó la concentración de la proteína EDN de cada una de las muestras considerando la corrección de las absorbancias (ruido de fondo). Se utilizó además el programa online *My assays*<sup>84</sup>, para verificar el cálculo de las concentraciones obtenidas (**Anexo 4: Valores de absorbancia corregidos para los puntos de la titulación de la proteína estándar purificada EDN; y Anexo 5: Cálculo de la concentración de la proteína EDN a partir de la ecuación obtenida de la titulación de la proteína purificada EDN**).

## V.2. Análisis estadístico

Los análisis aplicados buscan indicar: primero, si las concentraciones de EDN en suero de pacientes con NCC son estadísticamente diferentes a las muestras Eos+ y Eos-, y si esta diferencia existe entre Eos+ y Eos-; segundo, si en el grupo de muestras con NCC existe correlación entre el número de quistes y la concentración de la proteína EDN; tercero, si la concentración de EDN en muestras unitarias (NCC con quistes calcificados y NCC racemosa) difiere estadísticamente en la concentración de la proteína EDN en muestras de NCC vesicular parenquimal; cuarto, si el número de eosinófilos y la concentración de EDN correlacionan en Eos+ y Eos-.

### V.2.1. Normalidad de los datos

Mediante la prueba de Shapiro-Wilk (**Tabla 1**) se determinó que las concentraciones de EDN calculadas las muestras no tienen distribución normal, excepto en el caso de las muestras no eosinofílicas (Eos-). Por ello se aplicaron pruebas para datos sin distribución normal.

De igual forma, se evaluó la normalidad de los datos obtenidos tras el conteo relativo de eosinófilos en las muestras con eosinofilia (Eos+) y sin eosinofilia (Eos-) (**Tabla 1**). Dentro de cada grupo los datos mostraron una distribución normal; sin embargo, al considerar la totalidad de los datos la distribución no fue normal, y por ello se utilizaron pruebas no paramétricas para los análisis posteriores.

*Tabla 1. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para determinar normalidad de los datos.*

Variable ([EDN])	z	Prob > z	Variable (#Eos)	z	Prob > z
Eos+	2.358	0.00918	Eos+	0.246	0.40291
Eos-	0.109	<b>0.45678</b>	Eos-	0.599	0.27467
NCC	2.836	0.00228	NCC	-	-
Eos+, Eos-, NCC	4.229	0.00001	Eos+, Eos-	2.038	<b>0.02080</b>

### V.2.2. Diferencias en la concentración de EDN

Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar si hubo diferencias significativas en el conjunto de los grupos de muestras. Se obtuvo un valor de Chi-cuadrado de 14.093 con dos grados de libertad, lo que significa un valor del estadístico  $p < 0.001$  ( $p = 0.0009$ ). Este valor permite afirmar que hay diferencias significativas entre al menos dos de los grupos (**Tabla 2**).

*Tabla 2. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para determinar diferencias estadísticas entre grupos en la concentración de proteína EDN.*

Grupos	Prueba	z	Prob >  z
Eos+ Eos-	Mann-Whitney $H_0 = [Eos+] = [Eos-]$	3.000	0.0027
Eos+ NCC	Mann-Whitney $H_0 = [Eos+] = [NCC]$	3.416	0.0006
Eos- NCC	Mann-Whitney $H_0 = [Eos-] = [NCC]$	0.434	<b>0.6644</b>
Eos+ Eos- NCC	Kruskal-Wallis $H_0 = [Eos+] = [Eos-] = [NCC]$	$\chi^2 = 14.093$ d.f=2	$p = 0.0009$

Posteriormente se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para determinar entre qué grupos se presentaban diferencias significativas en las medidas de concentración de la proteína EDN. Los valores de concentración de EDN en las muestras no eosinofílicas (Eos-) y los valores de concentración obtenidos para las muestras de suero de pacientes con NCC (NCC) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Las demás comparaciones sí hallaron diferencias estadísticamente significativas (**Figura 11, Tabla 2**). No se excluyó ningún dato en los análisis.

### Diferencias en la concentración de EDN

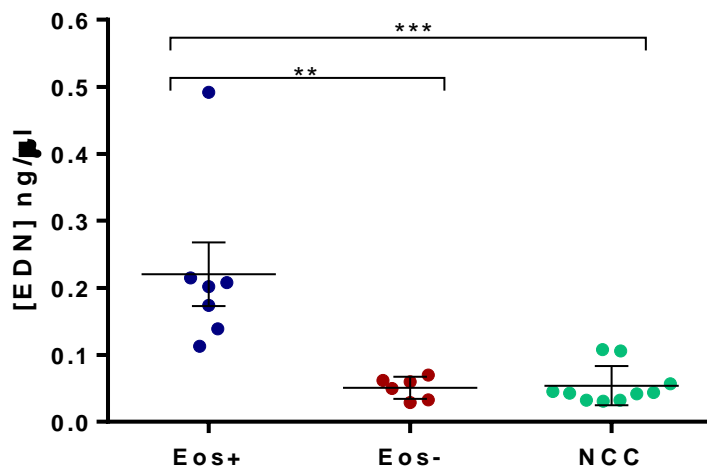


Figura 11. Diferencias en la concentración de la proteína EDN ([EDN]).

#### V.2.2.1. Diferencias en la concentración de la proteína EDN en el grupo de muestras de pacientes con NCC

Se evaluó si había diferencias en el grupo de muestras con NCC debido a que la muestra M5 y M7 son formas distintas de la NCC vesicular parenquimal, la más frecuente. M5 es una muestra proveniente de un paciente con quistes calcificados y M7 de un paciente con NCC racemosa. Se utilizó la prueba t de Student para una muestra para estimar la media del grupo de pacientes con NCC vesicular y compararla con el valor de las muestras M5 y M7. Se obtuvo que M5 y M7 tienen concentraciones de EDN significativamente diferentes a las muestras de NCC con quistes vesiculares,  $p=0.0003$  (Tabla 3).

Tabla 3. Resultado de la prueba t de una muestra.

Grupo	Prueba t de una muestra	Valor comparativo (ng/μl)	Media de grupo (ng/μl)	Valor de P
NCC M5 Y M7	$H_0 = \text{NCC} = \text{M5, M7}$	0.107	0.053	0.0003

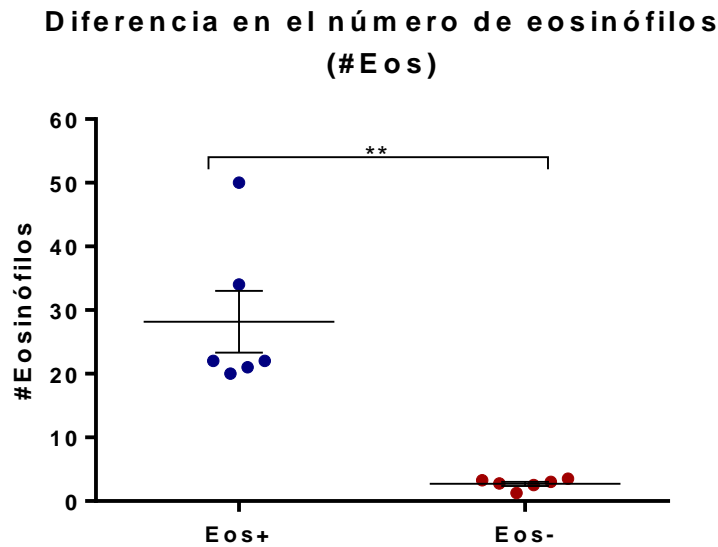
### V.2.3. Diferencias en el número de eosinófilos en muestras eosinofílicas y no eosinofílicas

El resultado de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para determinar si la diferencia en el número de eosinófilos entre las muestras eosinofílicas y no eosinofílicas fue estadísticamente significativa se muestra en la **Tabla 4, Figura 12**.

*Tabla 4. Resultados de la prueba U de Mann-Whitney para determinar diferencias estadísticas en el conteo relativo de eosinófilos (#Eos) entre muestras con y sin eosinofilia (Eos+) y (Eos-).*

Grupo	Mann-Whitney	z	Prob >  z
Eos+ Eos-	$H_0 = \%Eos+ = \%Eos-$	2.887	<b>0.0039</b>

El número de eosinófilos es estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ) entre muestras eosinofílicas y no eosinofílicas, confirmando un resultado que sigue la definición de eosinofilia, un incremento del número de eosinófilos.



*Figura 12. Diferencia en el número de eosinófilos entre el grupo de muestras eosinofílicas (Eos+) y no eosinofílicas (Eos-).*

#### V.2.4. Correlación entre el número de quistes y la concentración de proteína EDN

Se aplicó el análisis de correlación de Spearman para examinar la correlación entre la concentración de EDN y el número de quistes registrado para cada muestra de pacientes con NCC, excluyendo a M5 y M7, para dilucidar si existe interdependencia entre estas variables. Se observó una asociación positiva entre estas variables, definiendo que la concentración de EDN y el número de quistes son variables correlacionadas y no independientes (**rho= 0.8095, p<0.05, Tabla 5**).

Tabla 5. Correlación de Spearman utilizando las variables de concentración de la proteína EDN en las muestras de pacientes con NCC y la carga quística total de cada muestra.

	Rho	P value
Considerando M5 Y M7	-0.0729	0.8413
Excluyendo M5 y M7	0.8095	<b>0.0149</b>

Como se ha indicado, se excluyeron las muestras M5 y M7 del análisis debido a que tienen características particulares (por ser de formas de NCC distintas de la forma parenquimal vesicular). Solo excluyendo estas muestras se obtiene un valor de p<0.05, esto debido a que el número de quistes en estas muestras es considerado como una unidad (un quiste) y tienen una concentración de EDN mayor que las muestras con NCC vesicular con múltiples quistes. En la **Figura 13**, se observa la correlación entre estas variables excluyendo M5 y M7.

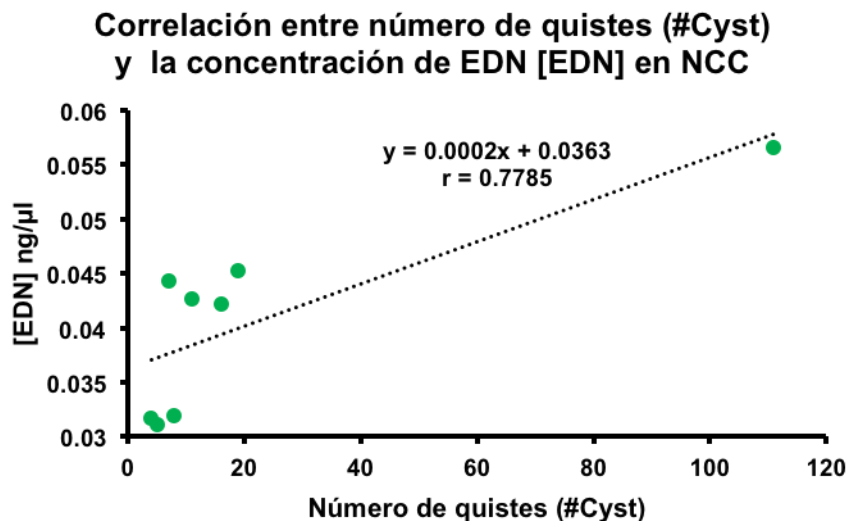


Figura 13. Correlación entre las variables de concentración de EDN y el número de quistes en las muestras de suero de pacientes con NCC.



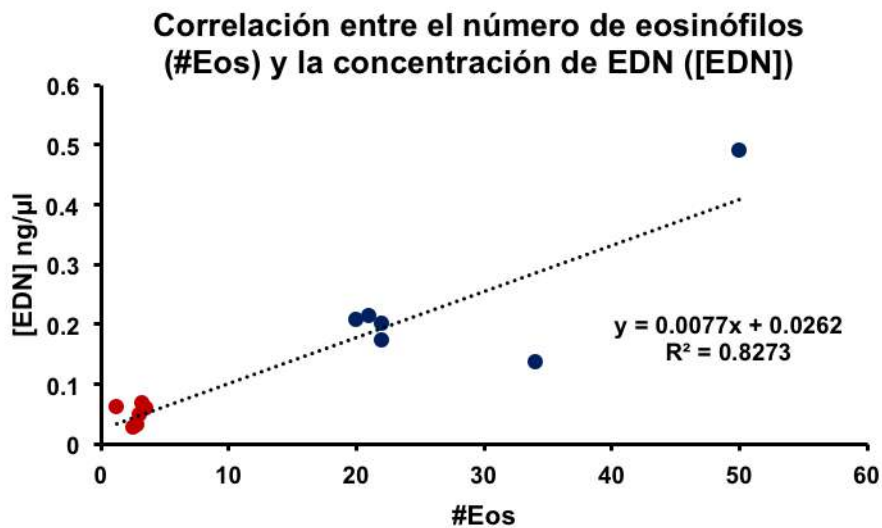
**V.2.5. Correlación entre el conteo de eosinófilos (#Eos) y la concentración de EDN ([EDN]) en las muestras con y sin eosinofilia (Eos+ y Eos-)**

Al realizar el análisis de correlación de Spearman (**Tabla 6**), las variables muestran una correlación positiva y significativa ( $\rho=0.7881$ ,  $p < 0.05$ ); es decir hay más EDN cuando hay más eosinófilos. Sin embargo, la cantidad de eosinófilos no es necesariamente dependiente de la concentración de EDN.

*Tabla 6. Resultados de la prueba de correlación de aplicada al conteo de eosinófilos (#EDN) y concentración de la proteína EDN ([EDN]).*

Correlación de Spearman	Rho	Prob >  t
#Eos [EDN]	0.7881	0.0023

En la **Figura 14** puede observarse cómo la concentración de la proteína EDN aumenta a medida que el número de eosinófilos es mayor.



*Figura 14. Correlación de Spearman entre la [EDN] y #Eos en muestras de eosinofilia (Eos+) y no eosinofilia (Eos-). Los puntos azules corresponden al grupo de muestras Eos+ y los puntos rojos a Eos-.*

## VI. DISCUSIÓN

En esta investigación el objetivo principal fue reconocer – y cuantificar – la proteína Neurotoxina Derivada del Eosinófilo (*Eosinophil Derived Neurotoxin* - EDN) en sueros de pacientes con NCC debido a la posible intervención del eosinófilo en la relación hospedero parásito en esta enfermedad. Para ello se optimizó una prueba ELISA sándwich indirecto, incluyendo como estándar concentraciones conocidas de la proteína EDN purificada.

Con la prueba optimizada, se compararon las concentraciones de la proteína EDN en muestras con y sin eosinofilia (N=7 y n= 6, respectivamente). El resultado muestra que las concentraciones de EDN fueron mayores en el grupo de muestras con eosinofilia (Eos+) respecto al grupo sin eosinofilia (Eos-) (**Figura 11, p=0.0027**). Este resultado permite establecer una relación entre la concentración de proteína EDN con el número de eosinófilos presentes en el sistema sanguíneo periférico (**Figura 14**), de modo que cuanto mayor número de eosinófilos haya, la concentración de EDN será mayor<sup>85</sup>.

Las concentraciones de EDN en 8 de las 10 muestras de pacientes con NCC en tratamiento no fueron diferentes a las del grupo de personas sanas y sin eosinofilia. El grupo de pacientes con NCC es un grupo con un tratamiento combinado de antihelmíntico (praziquantel) y glucocorticoides (dexametasona), sin embargo, no se tuvo acceso a las características del tratamiento, ni se conoce el tiempo transcurrido desde que este inició, el número de eosinófilos periféricos o las concentraciones de EDN antes de la toma de muestra. El tratamiento antihelmíntico podría ser el responsable de los niveles normales de EDN, sin embargo, no se conocen las concentraciones de esta proteína antes del tratamiento, o en un momento anterior o posterior a la toma de muestra, con la que pueda compararse y establecer que realmente se está inhibiendo.

Los niveles bajos de las proteínas de los gránulos del eosinófilo se atribuyen a la actividad inhibitoria del glucocorticoide dexametasona y otros glucocorticoides (por ejemplo, budesonida, fluticasona) que inhiben IL-5, interleucina central en la degranulación, el reclutamiento, mantenimiento y supervivencia del eosinófilo<sup>48 68 86 87</sup>. La concentración baja de la proteína EDN en las muestras de pacientes con NCC vesicular parenquimal con tratamiento, refleja justamente la actividad que se espera de la dexametasona.

Los resultados obtenidos para las dos muestras de NCC diferentes a la NCC vesicular parenquimal dan lugar a algunas interpretaciones. Las muestras son M5, de un paciente con NCC con quistes calcificados y M7, con NCC racemosa (**Figura 8**). El nivel de la proteína EDN en estas dos muestras fue significativamente mayor que en las muestras de pacientes con NCC con quistes vesiculares (**Sección Resultados: Prueba T para una muestra**).

Los quistes calcificados frecuentemente se asocian a edemas perilesionales, posiblemente formados como consecuencia de inflamación local. Es probable que en algún punto de la formación de estas lesiones se facilite el ingreso de los eosinófilos al espacio pericístico de las calcificaciones, procediendo al proceso de degranulación. La observación de infiltrados eosinofílicos en diversos estudios alrededor de lesiones calcificadas sostiene esta

interpretación<sup>13</sup>. Sin embargo, no se descarta que la concentración elevada de la proteína EDN en M5 se deba a alguna infección secundaria.

La muestra M7 es una forma de NCC con cisticercos racemoso subaracnoideo. No hay mucha bibliografía que evidencie la observación de eosinófilos respecto a estos quistes, pero sí se ha detectado que en pacientes con esta forma de NCC los niveles de IL-5 en suero son altos, más altos incluso que los encontrados en pacientes con NCC parenquimal, resaltando IL-5 porque correlaciona positivamente con la concentración de la proteína granular EDN, al menos en enfermedades relacionadas a mucosas<sup>48 59 88</sup>.

El acceso restringido de moléculas al espacio subaracnoideo y su entorno acuoso (LCR) podrían favorecer los niveles elevados de EDN. La dexametasona tiene un efecto que depende directamente de su concentración<sup>68</sup>; aunque es capaz de penetrar en el SNC, la concentración podría ser subóptima debido a que al disolverse en el espacio subaracnoideo no se mantienen concentraciones efectivas, tal vez sí suficientes para un efecto antiinflamatorio pero no para inhibir la liberación del contenido de los gránulos del eosinófilo. Detectar EDN en suero en este tipo de muestras (M5 y M7) sería posible debido a que el LCR del espacio subaracnoideo se filtra directamente a la circulación sanguínea a través de granulaciones aracnoideas (invaginaciones diverticulares)<sup>89 90</sup>.

En este trabajo se desconoce el conteo de eosinófilos periféricos en el grupo de pacientes con NCC, lo cual es una limitación importante. Sin embargo, la presencia de un número elevado de eosinófilos a nivel periférico no es un indicador directo de la liberación del contenido granular del eosinófilo, además de brindar poca información del panorama en los órganos (un número elevado de eosinófilos periféricos puede no significar una elevada concentración de las proteínas catiónicas del eosinófilo, más aún en NCC que se desarrolla en torno al SNC)<sup>88 91 92</sup>. Por el contrario, la detección de las proteínas del eosinófilo permite recopilar información más confiable dado que su liberación implica la activación de alguna respuesta inmunológica que también puede monitorearse en suero, por ejemplo mediante la cuantificación de interleucinas<sup>59 88</sup>.

Existen ejemplos donde el número de eosinófilos correlaciona muy bien con la concentración en suero de las proteínas de sus gránulos, como en la enfermedad de Graves (una enfermedad autoinmune, donde el organismo produce anticuerpos que atacan y dañan la tiroides), donde los niveles de EDN en suero correlacionan con el número de eosinófilos y los niveles de anticuerpos receptores de tirotrópina, proponiendo los niveles EDN como un marcador mucho más informativo<sup>85</sup>. En NCC no se ha establecido esta correlación, y las observaciones realizadas no concretan que sea común observar eosinofilia periférica, aunque sí se observa la presencia de eosinófilos, cuyo rol está poco estudiado, alrededor de quistes<sup>91</sup>.

La concentración de la proteína EDN podría depender del número de quistes cerebrales en los pacientes con NCC (**Figura 13**) y el efecto indirecto de la dexametasona que inhibe la liberación de EDN. Es conocido que la respuesta inmune en NCC varía de acuerdo al número de quistes, su viabilidad, su ubicación, la composición de vasos sanguíneos, y la heterogeneidad del medio circundante para cada uno<sup>10</sup>. A mayor número de quistes presentes en diferentes ubicaciones, es mayor la posibilidad de que estos modifiquen, ya sea por el

tratamiento administrado o por sus propias características, la respuesta de su entorno, donde se encontrarían los eosinófilos, inactivos antes de la degeneración del quiste.

En un punto aparte, respecto a las muestras de pacientes con eosinofilia, los niveles de la proteína EDN eran significativamente mayores a los niveles en individuos sanos y de pacientes con NCC. Estas muestras corresponden a pacientes con algún tipo de neoplasia (Detalles en **Anexos: Tabla 8**). Dependiendo del tipo de cáncer los eosinófilos tienen roles diferentes<sup>93</sup>. En cáncer ovárico EDN conduce a malos resultados; para células de sarcoma de Kaposi y de carcinoma colorrectal, EDN tiene efectos citotóxicos e inductores de apoptosis.

Para determinar si la concentración de EDN difiere según las formas de NCC (incluso en cisticercosis), sería necesario contar con más muestras de cada tipo de NCC y con mayor información de cada una.

Puesto que es frecuente localizar los eosinófilos en NCC, la caracterización de su respuesta (liberación del contenido granular) es importante para comprender la patogénesis de esta enfermedad durante la degeneración de los quistes (debido al tratamiento o de forma natural) y postular una herramienta para el monitoreo de esta enfermedad en sus diferentes formas que sea útil para prevenir el riesgo de provocar síntomas exacerbados durante el tratamiento.

Hay pocos estudios publicados sobre eosinófilos en la respuesta inmune local en NCC humana, este estudio es una introducción a los posibles beneficios de considerar la actividad del eosinófilo, es un aporte con importancia para los estudios en NCC con miras a mejores estrategias en el manejo del tratamiento de esta patología, complementa además estudios sobre el origen de la inmunopatología inducida por la interacción del hospedero con el parásito y la parte del tratamiento no dirigido a eliminar al parásito.

## **VII. CONCLUSIONES**

La prueba de ELISA estandarizada reconoce a la proteína EDN permitiendo discernir entre individuos eosinofílicos y no eosinofílicos, además de reconocer EDN en sueros de pacientes con NCC.

La concentración de EDN en los sueros de pacientes con NCC en tratamiento no fue significativamente diferente del grupo de sueros de individuos sanos, a excepción de las muestras provenientes del paciente con quiste racemoso y quistes calcificados que presentaron concentraciones dos veces mayores a la concentración de individuos sanos.

## VIII. RECOMENDACIONES

Se sugiere extender este trabajo como un estudio longitudinal (varias muestras de un mismo individuo en diferentes tiempos), considerar tiempos tempranos y tardíos en el tratamiento que permitan observar la evolución del comportamiento de la proteína EDN.

Es necesario incrementar el número de muestras de pacientes con NCC, considerando su forma vesicular, la presencia de los quistes calcificados en el cerebro y la forma racemosa.

Es imprescindible contar con los datos de conteo de leucocitos, específicamente el número de eosinófilos en el sistema sanguíneo periférico.

Se propone ampliar el estudio incluyendo a las proteínas MBP, ECP y EPX, para tener un perfil más completo del comportamiento de las proteínas catiónicas más importantes del eosinófilo en NCC. Adicionalmente, medir IL-5 como una evidencia directa de la actividad de la dexametasona, ya que esta interleucina se encuentra elevada en suero en NCC humana<sup>88</sup>.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García, H. H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A. W., Gilman, R. H. & Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet (London, England)* **362**, 547–56 (2003).
2. Smyth, J. D. *Introduction to Animal Parasitology*. (Cambridge University Press, 1994).
3. Venkat, B., Aggarwal, N., Makhaik, S. & Sood, R. A comprehensive review of imaging findings in human cysticercosis. *Jpn. J. Radiol.* **34**, 241–257 (2016).
4. Sotelo, J. & Del Brutto, O. H. Review of neurocysticercosis. *Neurosurg. Focus* **12**, e1 (2002).
5. Carpio, A. Neurocysticercosis : an update. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 751–762 (2002).
6. Harnsberger, H. R. *et al.* Diagnostic and Surgical Imaging Anatomy: Brain, Head and Neck, Spine. (2007). Available at: <http://w-radiologia.es/cisternas-del-cerebro.php>.
7. Rath, S. *et al.* Orbital cysticercosis: clinical manifestations, diagnosis, management, and outcome. *Ophthalmology* **117**, 600–605.e1 (2010).
8. Gonzales, I., Rivera, J. T. & Garcia, H. H. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunol.* **38**, 136–146 (2016).
9. Vaidya, A., Singhal, S., Dhall, S., Manohar, A. & Mahajan, H. *Asymptomatic disseminated cysticercosis*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **7**, 1761–1763 (JCDR Research & Publications Private Limited, 2013).
10. Cangalaya, C. *et al.* Inflammation caused by praziquantel treatment depends on the location of the *Taenia solium* cysticercus in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0004207 (2015).
11. Proaño, V. *et al.* Medical treatment for neurocysticercosis characterized by giant subaracnoid cysts. *N. Engl. J. Med.* **345**, 879–885 (2001).

12. Sanchez-Larsen, A., Monteagudo, M., Lozano-Setien, E. & Garcia-Garcia, J. Neurocysticercosis racemosa subaracnoidea gigante y ventricular: a propósito de un caso. *Rev. Argent. Microbiol.* **47**, 201–205 (2015).
13. Nash, T. E., Bustos, J. A. & Garcia, H. H. Disease centered around calcified *Taenia solium* granuloma. *Trends Parasitol.* **20**, 1–9 (2016).
14. Pretell, E. J., Gonzáles, I., Medina, J., Díaz, A. & García, H. H. Calcificaciones cerebrales y edema perilesional. *Acta Médica Peru.* **24**, 31–33 (2007).
15. Rottbeck, R. *et al.* High prevalence of cysticercosis in people with epilepsy in Southern Rwanda. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2558 (2013).
16. Bouteille, B. Epidemiology of cysticercosis and neurocysticercis. *Med. Sante Trop.* **24**, 367–374 (2014).
17. World Health Organization. Neglected tropical diseases. *WHO* (2013). Available at: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). (Accessed: 5th May 2017)
18. Declaration of Santiago on Epilepsy in Latin America. *Epilepsia* **43**, 42–42 (2002).
19. Garcia, H. H. *et al.* Epidemiology and control of cysticercosis in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* **27**, 592–597 (2010).
20. Pawlowski, Z. S. Potential eradication of taeniasis/cysticercosis. *Parasitol. Today* **9**, 463–464 (1992).
21. Del Brutto, O. H. Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited. *Pathog. Glob. Health* **106**, 299–304 (2012).
22. Del Brutto, O. H. Neurocysticercosis : actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología* **20**, 412–418 (2005).
23. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. in *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* 303–305 (2012). doi:10.1007/978-1-62703-589-7\_1
24. Thöml, H., Diem, H. & Haferlach, T. *Color atlas of hematology: practical microscopic and clinical diagnosis*. (Thieme, 2004).
25. Mehta, P. & Furuta, G. T. Eosinophils in gastrointestinal disorders: eosinophilic gastrointestinal diseases, celiac disease, inflammatory bowel diseases, and parasitic infections. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **35**, 413–37 (2015).
26. Graeff-Teixeira, C., Da Silva Aramburu, A. C. & Yoshimura, K. Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 322–348 (2009).
27. Marzal, M. *et al.* Evans blue staining reveals vascular leakage associated with focal areas of host-parasite interaction in brains of pigs infected with *Taenia solium*. *PLoS One* **9**, (2014).
28. Abu-Ghazaleh, R. I. *et al.* Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. *J. Leukoc. Biol.* **52**, 611–618 (1992).
29. Spencer, L. A., Bonjour, K., Melo, R. C. N. & Weller, P. F. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).
30. Shamri, R., Xenakis, J. J. & Spencer, L. A. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* **343**, 57–83 (2011).

31. Fulkerson, P. C. & Rothenberg, M. E. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 117–129 (2013).
32. Griffin, E. *et al.* Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**, 548–557 (1991).
33. Tefferi, A., Patnaik, M. M. & Pardanani, A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic. *Br. J. Haematol.* **133**, 468–492 (2006).
34. Simon, H. U. *et al.* Refining the definition of hypereosinophilic syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 45–49 (2010).
35. Roufosse, F. & Weller, P. F. Practical approach to the patient with hypereosinophilia. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 39–44 (2010).
36. Klion, A. D. How I treat hypereosinophilic syndromes. *Blood* **114**, 3736–3741 (2009).
37. Alhmod, T., Hanson, J. A. & Parasher, G. Eosinophilic gastroenteritis: an underdiagnosed condition. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 2585–2592 (2016).
38. Mulder, D. J. & Justinich, C. J. Understanding eosinophilic esophagitis: the cellular and molecular mechanisms of an emerging disease. *Mucosal Immunol.* **4**, 139–147 (2011).
39. Ming Yu, C. *et al.* Topical Steroid Therapy for the Treatment of Eosinophilic Esophagitis (EoE): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **6**, e82 (2015).
40. Santini, F. & Crosta, C. El eosinófilo. 1–4 (2000).
41. Acharya K, R. & Ackerman, S. J. Eosinophil granule proteins: form and function. *J. Biol. Chem.* **289**, 17406–17415 (2014).
42. Watson, P. & Stephens, D. J. ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1744**, 304–315 (2005).
43. Dvorak, A. M. & Weller, P. F. Ultrastructural analysis of human eosinophils. *Chem. Immunol.* **76**, 1–28 (2000).
44. Dvorak, A. M., MacGlashan, D. W., Morgan, E. S. & Lichtenstein, L. M. Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils. *Blood* **88**, 4090–4101 (1996).
45. Melo, R. C. N. & Weller, P. F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol* **48**, 1–6 (2010).
46. Neves, J. S. & Weller, P. F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunology. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 694–699 (2009).
47. Dvorak, A. M., Monahan, R. A., Osage, J. E. & Dickersin, G. R. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Hum. Pathol.* **11**, 606–19 (1980).
48. Kita, H. *et al.* Mechanism of topical glucocorticoid treatment of hay fever: IL-5, and eosinophil activation during natural allergen exposure are suppressed, but IL-4, IL-6, and IgE antibody production are unaffected. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, 521–529 (2000).

49. Adamko, D. J., Odemuyiwa, S. O., Vethanayagam, D. & Moqbel, R. The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **60**, 13–22 (2005).
50. Trivedi, S. G. & Lloyd, C. M. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1269–1289 (2007).
51. Erjefalt, J. S. & Persson, C. G. A. New aspects of degranulation and fates of airway mucosal eosinophils. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 2074–2085 (2000).
52. Moqbel, R. & Coughlin, J. J. Differential secretion of cytokines. *Sci. STKE* **2006**, pe26 (2006).
53. Armengot, M., Garín, L. & Carda, C. Eosinophil degranulation patterns in nasal polyposis: An ultrastructural study. *Am. J. Rhinol. Allergy* **23**, 466–470 (2009).
54. Erjefält, J. S. *et al.* Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. *Thorax* **56**, 341–344 (2001).
55. Raqib, R. *et al.* Persistence of mucosal mast cells and eosinophils in Shigella-infected children. *Infect. Immun.* **71**, 2684–2692 (2003).
56. Gleich, G. J., Loegering, D. A. & Maldonado, J. E. Identification of a Major Basic Protein in guinea pig eosinophil granules. *J. Exp. Med.* **137**, 1459–1471 (1973).
57. Egesten, A., Alumets, J., Von Mecklenburg, C., Palmegren, M. & Olsson, I. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J. Histochem. Cytochem.* **34**, 1399–1403 (1986).
58. Gullberg, U., Widegren, B., Arnason, U., Egesten, A. & Olsson, I. The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1239–1242 (1986).
59. Tuero, I. *et al.* A comparative study of peripheral immune responses to *Taenia solium* in individuals with parenchymal and subarachnoid neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0004143 (2015).
60. Hilvering, B., Xue, L. & Pavord, I. D. Evidence for the efficacy and safety of anti-interleukin-5 treatment in the management of refractory eosinophilic asthma. *Thorax* **9**, 135–145 (2015).
61. Lopez, J. A., Newburger, P. E. & Condino-Neto, A. The effect of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  on the eosinophilic differentiation and NADPH Oxidase activation of human HL-60 clone 15 cells. *J. Interf. Cytokine Res.* **23**, 737–744 (2003).
62. Ravin, K. A. & Loy, M. The eosinophil in infection. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **8525**, (2015).
63. Hogan, S. P. *et al.* *Eosinophils: biological properties and role in health and disease.* *Clinical & Experimental Allergy* **38**, (2008).
64. Garcia, H. H. *et al.* Cysticidal efficacy of combined treatment with Praziquantel and Albendazole for parenchymal brain cysticercosis. *Clin. Infect. Dis.* 1–32 (2016).
65. M Cupit, P. & Cunningham, C. What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Futur. Med. Chem.* **7**, 701–705 (2015).
66. Huang, L. & Appleton, J. A. Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes.



- Trends Parasitol.* **32**, 798–807 (2016).
67. Barnes, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clin. Sci.* **94**, 557–572 (1998).
  68. Meng, Q. *et al.* Effects of rapamycin, cyclosporin A, and dexamethasone on interleukin 5-induced eosinophil degranulation and prolonged survival. *Allergy* **52**, 1095–1101 (1997).
  69. Rothenberg, M. E. & Hogan, S. P. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 147–174 (2006).
  70. Swaminathan, G. J. *et al.* Crystal structure of the eosinophil major basic protein at 1.8 Å : An atypical lectin with a paradigm shift in specificity. *J. Biol. Chem.* **276**, 26197–26203 (2001).
  71. Hamann, K. J. *et al.* In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J. Immunol.* **144**, 3166–3173 (1990).
  72. Rosenberg, H. F. Eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **9**, 135–140 (2008).
  73. Zobba, R. *et al.* Cisternal cerebrospinal fluid analysis in 24 sheep with chronic coenurosis. *Vet. Ital.* **50**, 57–63 (2014).
  74. Bystrom, J., Amin, K. & Bishop-Bailey, D. Analysing the eosinophil cationic protein, a clue to the function of the eosinophil granulocyte. *Respir. Res.* **12**, 10 (2011).
  75. Travers, J. & Rothenberg, M. E. Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol.* **8**, 464–75 (2015).
  76. Sanderson, C. J. The biological role of interleukin 5. *Int. J. Cell Cloning* **8**, 147–154 (1990).
  77. Wever, A. M. J., Wever-Hess, J. & Hermans, J. The use of serum eosinophil cationic protein (ECP) in the management of steroid therapy in chronic asthma. *Clin. Exp. Allergy* **27**, 519–529 (1997).
  78. Chang-Keun, K. Eosinophil-derived neurotoxin: a novel biomarker for diagnosis and monitoring of asthma. *Korean J. Pediatr.* **56**, 8–12 (2013).
  79. Reimert, C. M., Tukahebwa, E. M., Kabatereine, N. B., Dunne, D. W. & Vennervald, B. J. Assessment of *Schistosoma mansoni* induced intestinal inflammation by means of eosinophil cationic protein, eosinophil protein X and myeloperoxidase before and after treatment with praziquantel. *Acta Trop.* **105**, 253–259 (2008).
  80. Cantoli Rabolini, N. M. Técnicas de muestreo y determinación del tamaño de la muestra en investigación cuantitativa. *Rev. Argentina Humanidades y Ciencias Soc.* **7**, (2009).
  81. Philla, K. Q. *et al.* Swallowed glucocorticoid therapy for eosinophilic esophagitis in children does not suppress adrenal function. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **28**, 1101–1106 (2015).
  82. Drummond, J. E. How to choose and optimize ELISA reagents and procedures - MyAssays. Available at: <https://www.myassays.com/how-to-choose-and-optimize-elisa-reagents-and-procedures.html>. (Accessed: 24th February 2017)
  83. Lardeux, F., Torrico, G. & Aliaga, C. Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian

- dogs in the absence of controls. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1–4 (2016). doi:10.1590/0074-02760160119
84. Drummond, J. E. Four parameter logistic curve - data analysis at MyAssays. *MyAssays* Available at: <https://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>. (Accessed: 6th May 2017)
  85. Hidaka, Y. *et al.* Increased serum concentration of eosinophil-derived neurotoxin in patients with Graves' disease. *Thyroid* **13**, 129–132 (2003).
  86. Marie, C., Pitton, C., Fitting, C. & Cavaillon, J.-M. Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) of interleukin-8 production by LPS and/or TNF- $\alpha$  activated human polymorphonuclear cells. *Mediators Inflamm.* **5**, 334–340 (1996).
  87. Masuyama, K. *et al.* Nasal eosinophilia and IL-5 mRNA expression in seasonal allergic rhinitis induced by natural allergen exposure: effect of topical corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* **102**, 610–617 (1998).
  88. Evans, C. A. W. *et al.* Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect. Immun.* **66**, 4522–4525 (1998).
  89. Miyajima, M. & Arai, H. Evaluation of the production and absorption of cerebrospinal fluid. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **55**, 647–56 (2015).
  90. Leach, J. L., Meyer, K., Jones, B. V & Tomsick, T. A. Large arachnoid granulations involving the dorsal superior sagittal sinus: findings on MR imaging and MR venography. *Am. J. Neuroradiol.* **29**, 1335–1339 (2008).
  91. Ware, J. M. & Nash, T. E. The lack of association of eosinophilia and neurocysticercosis at clinical presentation: a retrospective analysis of cases seen at the National Institutes of Health, 1985-2015. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 1432–1434 (2016).
  92. Park, Y. M. & Bochner, B. S. Eosinophil survival and apoptosis in health and disease. *Allergy, Asthma Immunol. Res.* **2**, 87–101 (2010).
  93. Davis, B. P. & Rothenberg, M. E. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 1–8 (2014).



**X. ANEXOS: Tablas**

*Tabla 7. Rango normal de leucocitos en humanos.*

<b>LEUCOCITO</b>	<b>RANGO</b>
<b>Neutr3f3lo</b>	50 – 70 %
<b>Linfocito</b>	20 – 40 %
<b>Monocito</b>	2 – 8 %
<b>Eosin3f3lo</b>	1 – 4 %
<b>Bas3f3lo</b>	0 – 1 %

Tabla 8. Características de las muestras utilizadas en la estandarización del ELISA

CÓDIGO	SEXO	EDAD	CONDICIÓN	DETALLES	TRATAMIENTO
TBC	MALE	ADULT	TUBERCULOSIS	Eosinofilia secundaria por reacción a medicamentos	Cóctel contra TBC
J2	MALE	ADULT	HERPES VIRUS	Leucocitosis	Sin Tratamiento
JRRD (P1)	FEMALE	ADULT	TUMOR CUELLO UTERINO	Eosinofílico	Sin tratamiento
PVER (P2)	FEMALE	ADULT	TUMOR DE COLON	Eosinofílico	Sin tratamiento
SCHB (P3)	FEMALE	ADULT	LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA	Eosinofílico	Sin tratamiento
MRL (P4)	FEMALE	ADULT	LEUCEMIA MIELOIDE	Eosinofílico	Sin tratamiento
TFW (P5)	MALE	ADULT	SIN DX	Eosinofílico	Sin tratamiento
ZQJ (P6)	MALE	ADULT	SIN DX	Eosinofílico	Sin tratamiento
LHA (N1)	MALE	ADULT	SANO	No Eosinofílico	Sin tratamiento
GSQ (N2)	MALE	ADULT	SANO	No Eosinofílico	Sin tratamiento
ENR (N3)	MALE	ADULT	SANO	No Eosinofílico	Sin tratamiento
RGL (N4)	MALE	ADULT	SANO	No Eosinofílico	Sin tratamiento
LKS (N5)	FEMALE	ADULT	SANO	No Eosinofílico	Sin tratamiento
JMJ (N6)	MALE	ADULT	SANO	No Eosinofílico	Sin tratamiento
H21176622 (M1)	-	ADULT	NCC 111 quistes	-	Se desconoce
H21175895 (M2)	-	ADULT	NCC 4 quistes	-	Se desconoce
H21176280 (M3)	-	ADULT	NCC 11 quistes	-	Se desconoce
H21176795 (M4)	-	ADULT	NCC 7 quistes	-	Se desconoce
H21176711 (M5)	-	ADULT	NCC	Quistes calcificados	Se desconoce
H21176794 (M6)	-	ADULT	NCC 5 quistes	-	Se desconoce
H21176720 (M7)	-	ADULT	NCC	Quiste racemoso	Se desconoce
H21176842 (M8)	-	ADULT	NCC 8 quistes	-	Se desconoce
H21176620 (M9)	-	ADULT	NCC 19 quistes	-	Se desconoce
H21176414 (M10)	-	ADULT	NCC 16 quistes	-	Se desconoce

Tabla 9. *Conteo relativo de leucocitos de las muestras de sangre*

Muestras no eosinofílicas (Eos-)						
% Leucocito	LHA (N1)	GSQ (N2)	ENR (N3)	RGL (N4)	LKS (N5)	JMJ (N6)
Neutrófilos	47.25	62.25	48.75	63.6	51.75	56
Linfocitos	44.25	24	37.75	26.2	36	33.5
Monocitos	7.25	9.25	9.75	7.4	9	8.5
<b>Eosinófilos</b>	<b>1.25</b>	<b>3.5</b>	<b>2.5</b>	<b>2.8</b>	<b>3.25</b>	<b>3</b>
Basófilos	0	0.75	1.25	0	0	0
Muestras eosinofílicas (Eos+)						
% Leucocito	JRRD (P1)	PVER (P2)	SCHB (P3)	MRL (P4)	TFW (P5)	ZQJ (P6)
Neutrófilos	38	28	30	57	48	43
Linfocitos	11	38	40	5	24	28
Monocitos	1	13	6	4	6	9
<b>Eosinófilos</b>	<b>50</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>34</b>	<b>22</b>	<b>20</b>
Basófilos	0	0	2	0	0	0

Tabla 10. *Valores de absorbancia corregidos para los puntos de la titulación de la proteína estándar purificada EDN.*

Estándares	Concentración (ng/μl)	Pocillos	Absorbancias (corregidas)	SEM
Estándar 1	1.25	A1	3.16	0.0295
		A2	3.22	
Estándar 2	0.5	B1	2.77	0.145
		B2	2.48	
Estándar 3	0.25	C1	1.81	0.0039
		C2	1.8	
Estándar 4	0.125	D1	0.494	0.0114
		D2	0.471	
Estándar 5	0.05	E1	0.145	0.00685
		E2	0.131	
Estándar 6	0.025	F1	0.0431	0.00145
		F2	0.0402	
Estándar 7	0.005	G1	0.0105	0.0013
		G2	0.0079	

Tabla 11. Cálculo de la concentración de la proteína EDN a partir de la ecuación obtenida de la titulación de la proteína purificada EDN.

Muestra	Pocillos	Absorbancia	Absorbancia (corregida)	Concentración (ng// $\mu$ l)	Promedio	%CV	SD	SEM																																																																																																																																																																																																																											
TBC	A3	0.544	0.475	0.1138	0.1132	0.69	0.000781	0.000552																																																																																																																																																																																																																											
	A4	0.535		0.1127					P1	B3	2.87	2.71	0.5402	0.4924	13.7	0.0676	0.0478	B4	2.68	0.4446	P2	C3	1.56	1.42	0.2235	0.2149	5.66	0.0122	0.00861	C4	1.41	0.2063	P3	D3	1.07	1.04	0.1707	0.1743	2.95	0.00515	0.00364	D4	1.14	0.1779	P4	E3	0.779	0.7	0.1401	0.1385	1.6	0.00222	0.00157	E4	0.75	0.1369	P5	F3	1.4	1.3	0.2053	0.202	2.28	0.0046	0.00325	F4	1.34	0.1988	P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233	G4	1.4	0.2059	N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462
P1	B3	2.87	2.71	0.5402	0.4924	13.7	0.0676	0.0478																																																																																																																																																																																																																											
	B4	2.68		0.4446					P2	C3	1.56	1.42	0.2235	0.2149	5.66	0.0122	0.00861	C4	1.41	0.2063	P3	D3	1.07	1.04	0.1707	0.1743	2.95	0.00515	0.00364	D4	1.14	0.1779	P4	E3	0.779	0.7	0.1401	0.1385	1.6	0.00222	0.00157	E4	0.75	0.1369	P5	F3	1.4	1.3	0.2053	0.202	2.28	0.0046	0.00325	F4	1.34	0.1988	P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233	G4	1.4	0.2059	N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258						
P2	C3	1.56	1.42	0.2235	0.2149	5.66	0.0122	0.00861																																																																																																																																																																																																																											
	C4	1.41		0.2063					P3	D3	1.07	1.04	0.1707	0.1743	2.95	0.00515	0.00364	D4	1.14	0.1779	P4	E3	0.779	0.7	0.1401	0.1385	1.6	0.00222	0.00157	E4	0.75	0.1369	P5	F3	1.4	1.3	0.2053	0.202	2.28	0.0046	0.00325	F4	1.34	0.1988	P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233	G4	1.4	0.2059	N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																		
P3	D3	1.07	1.04	0.1707	0.1743	2.95	0.00515	0.00364																																																																																																																																																																																																																											
	D4	1.14		0.1779					P4	E3	0.779	0.7	0.1401	0.1385	1.6	0.00222	0.00157	E4	0.75	0.1369	P5	F3	1.4	1.3	0.2053	0.202	2.28	0.0046	0.00325	F4	1.34	0.1988	P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233	G4	1.4	0.2059	N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																														
P4	E3	0.779	0.7	0.1401	0.1385	1.6	0.00222	0.00157																																																																																																																																																																																																																											
	E4	0.75		0.1369					P5	F3	1.4	1.3	0.2053	0.202	2.28	0.0046	0.00325	F4	1.34	0.1988	P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233	G4	1.4	0.2059	N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																										
P5	F3	1.4	1.3	0.2053	0.202	2.28	0.0046	0.00325																																																																																																																																																																																																																											
	F4	1.34		0.1988					P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233	G4	1.4	0.2059	N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																						
P6	G3	1.44	1.36	0.2106	0.2082	1.58	0.0033	0.00233																																																																																																																																																																																																																											
	G4	1.4		0.2059					N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028	A6	0.258	0.073	N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																		
N1	A5	0.229	0.179	0.06741	0.0702	5.64	0.00396	0.0028																																																																																																																																																																																																																											
	A6	0.258		0.073					N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155	B6	0.202	0.06173	N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																														
N2	B5	0.188	0.131	0.05864	0.06019	3.63	0.00219	0.00155																																																																																																																																																																																																																											
	B6	0.202		0.06173					N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153	C6	0.106	0.03093	N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																										
N3	C5	0.101	0.0393	0.02788	0.0294	7.34	0.00216	0.00153																																																																																																																																																																																																																											
	C6	0.106		0.03093					N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735	D6	0.126	0.04003	N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																						
N4	D5	0.0973	0.0473	0.02533	0.03268	31.8	0.0104	0.00735																																																																																																																																																																																																																											
	D6	0.126		0.04003					N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649	E6	0.235	0.06866	N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																		
N5	E5	0.176	0.141	0.05569	0.06217	14.8	0.00917	0.00649																																																																																																																																																																																																																											
	E6	0.235		0.06866					N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586	F6	0.155	0.04997	M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																														
N6	F5	0.155	0.0909	0.04985	0.04991	0.166	0.0000829	0.0000586																																																																																																																																																																																																																											
	F6	0.155		0.04997					M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138	G6	0.186	0.05797	M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																										
M1	G5	0.175	0.116	0.0552	0.05658	3.46	0.00196	0.00138																																																																																																																																																																																																																											
	G6	0.186		0.05797					M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555	H6	0.0984	0.02612	M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																						
M2	H5	0.119	0.0444	0.03723	0.03168	24.8	0.00785	0.00555																																																																																																																																																																																																																											
	H6	0.0984		0.02612					M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144	A8	0.132	0.04252	M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																																		
M3	A7	0.133	0.0685	0.04281	0.04267	0.478	0.000204	0.000144																																																																																																																																																																																																																											
	A8	0.132		0.04252					M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023	B8	0.131	0.04197	M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																																														
M4	B7	0.144	0.0733	0.04657	0.04427	7.34	0.00325	0.0023																																																																																																																																																																																																																											
	B8	0.131		0.04197					M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394	C8	0.462	0.1036	M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																																																										
M5	C7	0.525	0.429	0.1114	0.1075	5.18	0.00557	0.00394																																																																																																																																																																																																																											
	C8	0.462		0.1036					M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204	D8	0.11	0.03322	M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																																																																						
M6	D7	0.103	0.0424	0.02913	0.03117	9.27	0.00289	0.00204																																																																																																																																																																																																																											
	D8	0.11		0.03322					M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																																																																																		
M7	E7	0.462	0.418	0.1036	0.1061	3.44	0.00365	0.00258																																																																																																																																																																																																																											

	E8	0.503		0.1087				
M8	F7	0.107	0.0437	0.03132	0.03193	2.72	0.000869	0.000615
	F8	0.109		0.03255				
M9	G7	0.142	0.076	0.04592	0.04526	2.08	0.000943	0.000667
	G8	0.138		0.04459				
M10	H7	0.132	0.0671	0.04249	0.04214	1.17	0.000493	0.000348
	H8	0.13		0.04179				
Blancos (1X PBS + Tween 20 0.05%)	H1	0.0621	0	-	-	-	-	-
	H2	0.0616		-				
	H3	0.0701		-				
	H4	0.0634		-				