



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE
UNA ENOLASA RECOMBINANTE DE *T.*
solium Y SU POTENCIAL USO COMO
ANTÍGENO INMUNODIAGNÓSTICO DE
NEUROCISTICERCOSIS

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

REYNALDO PONCE ALMERÍ

LIMA – PERÚ

2017

Asesor de tesis:

Mirko Zimic, PhD.

“Puedo ordenarle al Espejo que revele muchas cosas y a algunos puedo mostrarles lo que desean ver. Pero el Espejo muestra también cosas que no se le piden y éstas son a menudo más extrañas y más provechosas que aquellas que deseamos ver. Lo que verás, si dejas en libertad al Espejo, no puedo decirlo. Pues muestra cosas que fueron, cosas que son y cosas que quizá serán. Pero si fueron, son o serán, ni siquiera el más sabio puede decirlo”

— «El Espejo de Galadriel», El Señor de los Anillos de J. R. R. Tolkien.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a mis padres por su constante apoyo en esta empresa llamada ciencia. Ellos han sido mi principal soporte para poder culminar con la realización del presente trabajo.

En segundo lugar quiero agradecer a mis asesores de tesis Mirko Zimic y Patty Sheen que más allá de la formalidad que conlleva la dirección del trabajo de investigación han sido mis mentores a lo largo de estos años y cuya amistad atesoro. Gracias a ellos se pudieron canalizar los fondos PIBAP-FINCyT del proyecto “*Desarrollo de una prueba de inmunodiagnóstico para cisticercosis asociado a un quiste único*” hacia este estudio.

En tercer lugar quiero agradecer a todos mis compañeros del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular del LID: Pilar, Patty Fuentes, Patricia Durán, Manuel, Ricardo, Kathy Lozano, Kathy Vallejos, Marco, Bryan, José Luis, Anita, Nancy, Daniel, Luis Cirilo, David, Daniela, Marita, Manuel y Hugo, por su valiosa ayuda y consejos en la realización de distintas pruebas experimentales y protocolos, pero sobre todo por los momentos entrañables y experiencias que pasamos juntos siguiendo el mismo camino de la ciencia.

Por último, y no menos importante, quiero agradecerle a Evelyn por todo su cariño y aliento brindados en los últimos meses que me han impulsado a terminar con la redacción de la presente tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III.	MARCO TEÓRICO	8
III.1.	BIOLOGÍA DEL PARÁSITO	8
III.1.1.	MORFOLOGÍA	8
III.1.2.	CICLO DE VIDA.....	10
III.1.3.	GENÓMICA.....	13
III.2.	CISTICERCOSIS HUMANA	15
III.2.1.	PATOLOGÍA Y PATOGENIA.....	16
III.2.2.	EPIDEMIOLOGÍA.....	19
III.2.3.	DIAGNÓSTICO	22
III.3.	ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA.....	32
III.4.	ENOLASA.....	33
III.4.1.	DEFINICIÓN	33
III.4.2.	PROPIEDADES Y DISTRIBUCIÓN	33
III.4.3.	IONES METÁLICOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA ENOLASA	35
III.4.4.	CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.....	36
III.4.5.	MECANISMO DE CATALISIS	38
III.4.6.	PROPIEDADES CATALÍTICAS	41
III.4.7.	MULTIFUNCIONALIDAD	42
III.4.8.	ENOLASA SUPERFICIAL EN HELMINTOS	45
IV.	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	47
V.	OBJETIVOS.....	48
V.1.	GENERAL.....	48
V.2.	ESPECÍFICOS.....	48
VI.	METODOLOGÍA.....	49
VI.1.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	49
VI.2.	MUESTRA	49
VI.2.1.	CISTICERCOS DE <i>T. solium</i>	49
VI.2.2.	SUEROS DE CONEJO	49
VI.2.3.	SUEROS HUMANOS	50
VI.3.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	50
VI.4.	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS	51

VI.4.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ENOLASA DE <i>T. solium</i>	51
VI.4.2. OBTENCIÓN DE LA ENOLASA RECOMBINANTE DE <i>T. solium</i>	55
VI.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs	71
VI.4.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs	73
VI.4.5. EVALUACIÓN DE rEnoTs EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA	83
VI.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	92
VI.6. PLAN DE ANÁLISIS	92
VI.6.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	92
VI.6.2. ENSAYO INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs	93
VI.6.3. CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL INMUNODIAGNÓSTICO DE NCC CON rEnoTs	93
VI.6.4. RECONOCIMIENTO DE rEnoTs POR SUEROS HUMANOS EN EL ENSAYO DE ELISA	94
VII. RESULTADOS	95
VII.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ENOLASA DE <i>T. solium</i>	95
VII.1.1. IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA ENOLASA DE <i>T. solium</i>	95
VII.1.2. ALINEAMIENTO DE LAS ENOLASAS DE TENIA, CERDO Y HUMANO	99
VII.1.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA ENOLASA DE <i>T. solium</i>	99
VII.1.4. DISEÑO DE INICIADORES PARA LA ENOLASA DE <i>T. solium</i>	102
VII.1.5. ANÁLISIS DE SECUENCIA DE rEnoTs	103
VII.1.6. PREDICCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE rEnoTs	104
VII.1.7. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE rEnoTs	107
VII.1.8. EVALUACIÓN <i>in silico</i> DE LA rEnoTs MUTANTE	112
VII.1.9. PREDICCIÓN DE REGIONES TRANSMEMBRANA EN rEnoTs	118
VII.1.10. PREDICCIÓN DE SEÑAL DE SECRECIÓN EN rEnoTs	119
VII.1.11. PREDICCIÓN DE EPÍTOPES DE CÉLULAS B EN rEnoTs	120
VII.2. OBTENCIÓN DE LA ENOLASA RECOMBINANTE DE <i>T. solium</i>	123
VII.2.1. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE ENOLASA DE <i>T. solium</i>	123
VII.2.2. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACION DE rEnoTs	129
VII.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs	132
VII.3.1. CONDICIONES ÓPTIMAS DE ALMACENAMIENTO DE rEnoTs	132
VII.3.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs	133
VII.3.3. MEDICIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS	134
VII.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs	138
VII.4.1. RECONOCIMIENTO DE rEnoTs POR LOS SUEROS PRE Y POST-INMUNE DE CONEJO	138

VII.4.2. REACTIVIDAD DEL SUERO ANTI-rEnoTs FRENTE A OTROS ANTÍGENOS	139
VII.4.3. LOCALIZACIÓN DE LA ENOLASA NATIVA EN CISTICERCOS	141
VII.5. EVALUACIÓN DE rEnoTs EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA.....	142
VII.5.1. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOBLOT DE rEnoTs CON SUEROS HUMANOS.....	142
VII.5.2. EVALUACIÓN DE TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS CON rEnoTs PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA	145
VII.5.3. RECONOCIMIENTO DE rEnoTs SIN DESNATURALIZAR POR SUEROS HUMANOS MEDIANTE ELISA.....	148
VIII. DISCUSIÓN.....	150
VIII.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ENOLASA DE <i>T. solium</i>	150
VIII.2. OBTENCIÓN DE LA ENOLASA RECOMBINANTE DE <i>T. solium</i>	156
VIII.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs.....	157
VIII.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs	159
VIII.5. EVALUACIÓN DE rEnoTs EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA.....	161
IX. CONCLUSIONES	166
X. RECOMENDACIONES.....	167
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	168
XII. ANEXOS	i
ANEXO I. Preparación de buffers para el ensayo Western Blot:	i
ANEXO II. Porcentaje de identidad entre la enolasa de <i>T. solium</i> y de otras especies.....	ii
ANEXO III. Alineamiento de la enolasa de <i>T. solium</i> y platelmintos cercanos	iii
ANEXO IV. Sistemática de <i>T. solium</i>	iv
ANEXO V. Criterios diagnósticos de neurocisticercosis humana	v
ANEXO VI. Respuesta inmunológica en la cisticercosis humana.....	vi
ANEXO VII. Vacunación contra la cisticercosis porcina.....	ix

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i> (Adaptado del CDC).....	12
Figura 2. Categorización funcional de las proteínas de <i>T. solium</i>	15
Figura 3. Distribución global de la cisticercosis humana, 2011.....	19
Figura 4. Principales áreas endémicas de cisticercosis en el Perú.....	22
Figura 5. Árbol filogenético de 39 especies de enolasas.....	35
Figura 6. Subunidades de la enolasa α de levadura.....	37
Figura 7. Modelo de barras y esferas de los principales residuos del sitio activo de la enolasa α de levadura.....	39
Figura 8. Mecanismo catalítico de la enolasa en modo escalonado.....	40
Figura 9. Mapa del plásmido pET-28a (+).....	61
Figura 10. Esquema de la clonación del gen de la enolasa de <i>T. solium</i> en <i>E. coli</i>	63
Figura 11. Interacción entre el Ni^{2+} de la columna de afinidad y la cola de Histidina de rEnoTs...69	69
Figura 12. Representación esquemática del gen anotado de la enolasa de <i>T. solium</i>	95
Figura 13. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las enolasas de <i>T. solium</i> , <i>S. scrofa</i> y <i>H. sapiens</i>	100
Figura 14. Árbol filogenético de 30 enolasas de diferentes especies.....	101
Figura 15. Dominios, motivos y residuos catalíticos predichos para rEnoTs.....	106
Figura 16. Modelo 3D de rEnoTs conformando un homodímero.....	107
Figura 17. Plot de Ramachandran de rEnoTs 3D.....	109
Figura 18. Modelamiento del sitio activo de rEnoTs 3D mediante Ligand Explorer TM	110
Figura 19. Interacciones metálicas de los iones Mg^{+2} con los residuos de rEnoTs en el sitio activo.....	110
Figura 20. Modelo 3D de rEnoTs mostrando estructuras secundarias.....	111
Figura 21. Región estructural de la mutación S41P.....	113
Figura 22. Variación en los ángulos diedros e interacciones metálicas de la mutación S41P.....	114
Figura 23. Desplazamiento del bucle de rEnoTs a nivel del esqueleto polipeptídico por la mutación S41P.....	115
Figura 24. Panorama de la mutación S250P en la estructura secundaria tipo bucle.....	116
Figura 25. Variación en los ángulos diedros e interacciones metálicas de la mutación S250P.....	117
Figura 26. Desplazamiento del bucle de rEnoTs a nivel del esqueleto polipeptídico debido a la mutación S250P.....	118
Figura 27. Resultados de la predicción de hélices transmembrana de rEnoTs.....	119
Figura 28. Predicción de segmento transmembrana de rEnoTs por TopPred 1.10.....	120
Figura 29. Comparación entre los epítopes B lineales de rEnoTs y la enolasa α humana 2psn....	121
Figura 30. Comparación de los epítopes B conformacionales de rEnoTs con los de 2psn.....	122
Figura 31. Epítopes B conformacionales del modelo dimérico de rEnoTs.....	123
Figura 32. Electroforesis del amplicón de la enolasa de <i>T. solium</i> con y sin intrones.....	124
Figura 33. Diagrama del plásmido pET-28a+EnoTs.....	126
Figura 34. PCR del gen maduro EnoTs.....	126
Figura 35. Digestión de plásmidos pET-28a+EnoTs.....	127
Figura 36. Colonias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformantes de pET-28a+EnoTs.....	128
Figura 37. Electroforesis de los extractos de diferentes colonias de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	128
Figura 38. SDS PAGE 12% de las fracciones celulares de expresión de rEnoTs, clona 9.....	129
Figura 39. Cromatograma de la purificación de rEnoTs.....	130
Figura 40. SDS PAGE 12% de las fracciones de purificación de rEnoTs clona 9.....	131
Figura 41. Ensayo de Western Blot de rEnoTs.....	139

Figura 42. Localización de la enolasa nativa en cisticercos de <i>T. solium</i>	141
Figura 43. Ensayo de inmunoblot de rEnoTs (250ng) con un <i>pool</i> de sueros positivos de NCC (dilución 1:1000).....	143
Figura 44. Ensayo de inmunoblot de rEnoTs con un <i>pool</i> de sueros positivos de NCC en condiciones desnaturalantes y no desnaturalantes.	144
Figura 45. Inmunoblot de rEnoTs estandarizado con un <i>pool</i> de sueros positivos de NCC.....	145
Figura 46. Western Blot de tiras inmunocromatográficas con rEnoTs (125 ng) enfrentadas a sueros de pacientes con NCC (+) y sin NCC (-).....	146
Figura 47. Western Blot de tiras inmunocromatográficas con diferentes cantidades de rEnoTs ..	147
Figura 48. Prueba de reacción cruzada de rEnoTs con hidatidosis.	148

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número estimado de casos de cisticercosis y casos de epilepsia asociados a neurocisticercosis por área geográfica.	20
Tabla 2. Características cinéticas de enolasas de distintos organismos.....	44
Tabla 3. Diferentes funciones de la Enolasa	45
Tabla 4. Operacionalización de variables.....	50
Tabla 5. Contigs y ESTs utilizados en la anotación del gen de la enolasa de <i>T. solium</i>	96
Tabla 6. Diseño de iniciadores <i>Forward</i> y <i>Reverse</i> para el gen de la enolasa maduro de <i>T. solium</i>	102
Tabla 7. Condiciones de almacenamiento a corto plazo de rEnoTs	132

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Determinación del peso molecular (PM) del amplicón de la enolasa madura de <i>T. solium</i>	125
Gráfica 2. Actividad enzimática de rEnoTs en saturación de sustrato	133
Gráfica 3. Actividad enzimática de rEnoTs mutante en saturación de sustrato.....	134
Gráfica 4. Velocidad inicial (V_0) de reacción de rEnoTs a diferentes concentraciones de 2-PGA	135
Gráfica 5. Cinética enzimática Michaeliana de rEnoTs	136
Gráfica 6. Plot de Lineweaver-Burk.....	137
Gráfica 7. Plot de Eadie-Hofstee.....	137
Gráfica 8. Reactividad de los anticuerpos policlonales de conejo anti rEnoTs (Post-inmune) frente a tres antígenos diferentes en comparación con el suero Pre-inmune	140
Gráfica 9. Reactividad de distintos grupos de sueros humanos frente a la enolasa recombinante de <i>T. solium</i> expresada en <i>E. coli</i> (rEnoTs)	149

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria que afecta al sistema nervioso central y es causada por la larva de *Taenia solium*, siendo una de las principales parasitosis en el Perú debido a su alta prevalencia. La enolasa es una enzima de la glucólisis y es multifuncional. Ha sido reportada a nivel de superficie celular y en los productos de excreción/secreción de patógenos, incluyendo los cestodos, como factor de invasión. En los platelmintos la glucólisis ocurre en el tegumento por lo que el uso de la enolasa como blanco terapéutico o antígeno inmunodiagnóstico se justifica. El presente estudio se realizó con el fin de obtener una enolasa recombinante de *T. solium* (rEnoTs), caracterizarla enzimáticamente, determinar su inmunogenicidad y evaluarla como antígeno inmunodiagnóstico de NCC humana. El ensayo de actividad enzimática de rEnoTs se realizó midiendo la conversión de 2-PGA a PEP, hallándose su actividad enzimática específica (60 U/mg), su V_{max} (30 μ M PEP/min) y su K_m (0.091mM). Al inmunizar conejos con rEnoTs, se determinó que es inmunogénica al levantar anticuerpos específicos. Por último, se realizó el ensayo inmunodiagnóstico de NCC con sueros humanos, encontrándose que rEnoTs tiene alta sensibilidad (100%) y baja especificidad (35%) en la población peruana, al existir reacción cruzada con individuos sanos. Sin embargo, no se encontró reacción cruzada con extranjeros sanos. En conclusión, se obtuvo una enolasa recombinante de *T. solium* soluble, funcional e inmunogénica. Sin embargo, rEnoTs es inespecífica para el inmunodiagnóstico de NCC en el Perú, pudiendo ser útil en otros escenarios.

Palabras Claves: neurocisticercosis, inmunoblot, antígenos recombinantes, enolasa, caracterización enzimática, *Taenia solium*.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a parasitic disease that affects the central nervous system, is caused by larval stage of *Taenia solium* and is one of the major parasitosis in Peru because of its high prevalence. Enolase is a multifunctional protein with primary role in the cytoplasmic glycolysis. It has recently been reported as cell surface protein and in products of excretion/secretion of different pathogens, including tapeworms, participating as a factor of invasion. Additionally, in flatworms glycolysis occurs mainly in tegument so its use as immunodiagnostic antigen or therapeutic target is justified. This study was conducted in order to obtain a recombinant *T. solium* enolase (rEnoTs), enzymatically characterize, determine its immunogenicity and evaluate it for the immunodiagnostic of human NCC. The enzyme activity assay of rEnoTs was performed measuring the conversion of 2-PGA to PEP, determining its specific enzyme activity (60 U/mg), V_{max} (30 μ M PEP/min) and K_m (0.091 mM). Immunized rabbits with rEnoTs lifted specific anti-rEnoTs, and then rEnoTs was immunogenic. Finally, immunodiagnostic test of NCC was performed and it was found that rEnoTs has high sensitivity (100%) but low specificity (35%) in the Peruvian population, because there is cross-reaction with healthy individuals. However, there was no cross reaction with healthy foreign individuals sera. In conclusion, we obtained a soluble, functional and immunogenic recombinant enolase from *T. solium*. However, rEnoTs is unspecific for immunodiagnostic of NCC in Peru, but it may be useful in other scenarios.

Keywords: Neurocysticercosis, immunoblot, recombinant antigens, enolase, enzyme characterization, *T. solium*.

I. INTRODUCCIÓN

El estadio adulto de *Taenia solium* es el agente causal de la teniasis intestinal, siendo el hombre el hospedero definitivo de este parásito. Para completar su ciclo de vida *T. solium* requiere de un huésped intermediario, que por lo general es el cerdo (*Sus scrofa*), el cual ingiere los huevos de la solitaria que son excretados en las heces del enfermo de teniasis, y a continuación se generan cisticercos en sus órganos y tejidos. El humano al consumir carne de cerdo infestada con dichos cisticercos desarrollara teniasis, cerrándose el ciclo (1).

La cisticercosis humana es una enfermedad parasitaria causada por la larva o cisticerco (metacestodo) de *T. solium*. Se produce cuando la persona ingiere accidentalmente alimentos contaminados con huevos de *T. solium* (excretados en las heces de personas con teniasis) y a continuación éstos pasan a través del intestino hacia el torrente sanguíneo, de donde se distribuyen a diferentes tejidos, enquistándose y desarrollando vesículas denominadas cisticercos dentro de las cuales se encuentra invaginada la larva de *T. solium* (2). Dichos quistes pueden alcanzar hasta 5 centímetros de diámetro, complicando la fisiología del órgano donde se encuentran. Cuando dichos cisticercos alcanzan el sistema nervioso central (SNC) la enfermedad se denomina neurocisticercosis (NCC), la cual causa convulsiones, migrañas y ataques de epilepsia en el hospedero, pudiendo incluso ocasionarle la muerte (3).

El Perú es un país endémico de la teniasis y cisticercosis, debido a su alta prevalencia en toda la sierra del país, costa norte y selva alta, por lo que su

diagnóstico, tratamiento, control y prevención son de gran relevancia para su erradicación (4).

El diagnóstico definitivo de la neurocisticercosis es posible con la ayuda del análisis de imágenes (Tomografía o Resonancia Magnética), sin embargo el acceso a ellos es restringido en los países en vías de desarrollo por su costo elevado. Entre otros métodos de diagnóstico de neurocisticercosis se encuentran las pruebas serológicas (detección de antígenos, ELISA y Western Blot), que son técnicas confirmatorias, Rayos X (que detectan solo quistes calcificados) y las manifestaciones clínicas, que no trascienden, puesto que los síntomas de los pacientes con neurocisticercosis son comunes con otras patologías neurológicas (2).

Las pruebas serológicas nos brindan una alternativa económica de diagnóstico con alta especificidad y sensibilidad para los casos poliquisticos, sin embargo estas pruebas fallan en los casos en que el paciente tiene un solo quiste, o éstos se encuentran calcificados (5). Ante esta falencia surge la necesidad de una prueba serológica mucho más sensible para la detección de estos casos de neurocisticercosis (6).

Los antígenos recombinantes han resultado ser útiles en el diagnóstico y prevención de un gran número de enfermedades infecto-parasitarias. La búsqueda de mejores antígenos parasitarios da lugar a una mejor respuesta inmune del hospedero y por lo tanto una mejor protección (7). De esto se deduce que aquellos antígenos parasitarios que tengan epítopes más inmunogénicos serán los mejores candidatos para pruebas diagnósticas que detectan anticuerpos antiparasitarios

producidos por el hospedero, siempre y cuando no se presente reacción cruzada con otros patógenos (8).

La enolasa además de ser una enzima crucial de la vía glucolítica es una proteína de superficie celular de muchos agentes patogénicos que se encuentra involucrada en el mecanismo de invasión tisular al hospedero, por lo que se encuentra expuesta al reconocimiento del sistema inmune de éste (9). Cabe resaltar que en los Platelminos la glucólisis ocurre principalmente a nivel de tegumento, por lo que las enzimas involucradas en dicho proceso metabólico, como la enolasa, son abundantes en dicho tejido (10, 11). En consecuencia, su empleo como blanco terapéutico y como antígeno vacunal o de inmunodiagnóstico es prometedor para una serie de enfermedades infecto-parasitarias (12), entre ellas la neurocisticercosis humana.

A la luz que nuestro equipo de bioinformática recientemente ha secuenciado el genoma de *T. solium* y se ha anotado el gen de la enolasa, el propósito del presente trabajo fue obtener y caracterizar enzimáticamente a la enolasa recombinante de *T. solium* y evaluar su potencial en el diagnóstico de neurocisticercosis humana.

La importancia de esta investigación radica en dos aspectos: i) Que es pionero en la obtención y caracterización enzimática de la enolasa recombinante de *Taenia solium*, cuyo conocimiento abre la posibilidad a múltiples aplicaciones, como por ejemplo la búsqueda de inhibidores específicos, utilizándola como blanco terapéutico de drogas antiparasitarias; y ii) Que evalúa la capacidad inmunodiagnóstica de la enolasa de *T. solium*, con el propósito de obtener un

alternativa práctica, reproducible y económica para la detección de casos de neurocisticercosis, incluyendo aquellos de difícil diagnóstico.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, LID, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema en el Perú con respecto a la cisticercosis radica en su alta prevalencia en zonas endémicas de *T. solium*, que corresponden a toda la sierra, la costa norte y la selva alta del país (4). Es de notar que entre el 30 y 50 % de los casos de epilepsia reportados para estas zonas se encuentra asociados con cuadros de Neurocisticercosis, por lo que es de mucha importancia el control de esta enfermedad, empezando por detectarla, con miras hacia su erradicación (13).

El diagnóstico de la neurocisticercosis se complica debido a que sus síntomas son comunes con otras enfermedades neurológicas, por lo que es necesario relacionar los antecedentes epidemiológicos y clínicos, los hallazgos radiográficos y las pruebas inmunológicas. En la actualidad con la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han mejorado el diagnóstico de la neurocisticercosis; no obstante, el uso de esta prueba es limitado por su alto costo, siendo de difícil acceso para las comunidades pobres, que básicamente son las zonas endémicas de esta enfermedad en nuestro país (14). En este sentido, las pruebas serológicas han surgido como una alternativa viable y económica para la detección de la cisticercosis, siendo la técnica de Inmunoblot la prueba de inmunodiagnóstico más sensible para esta enfermedad (15).

El Inmunoblot del CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) o EITB (por sus siglas en inglés *Enzyme-linked Immuno-electro Transfer Blot*) es el ensayo de inmunodiagnóstico para cisticercosis más común y se basa en 7 bandas de Lectin-Lentin glicoproteínas (LLGP) del cisticerco (16). Esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad (98 y 100%, respectivamente) cuando hay dos o más

cisticercos instalados en el paciente; sin embargo, en casos de pacientes con un único quiste o quistes calcificados, la sensibilidad puede bajar hasta 50-80% (5, 17, 18) dificultando así el diagnóstico de esta enfermedad.

Aunque el LLGP-EITB es una excelente prueba inmunodiagnóstica, el procedimiento de purificación de sus glicoproteínas, a partir de quistes recogidos de cerdos infectados naturalmente, ha sido difícil de estandarizar entre laboratorios. Además, esta fuente decrece con la erradicación de la cisticercosis (19). El uso de antígenos proteicos recombinantes o sintéticos proveen una alternativa más simple, reproducible y fiable para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis (20).

Las proteínas de superficie celular, secretorias y/o excretorias que posean epítopes inmunogénicos deben ser consideradas como potenciales antígenos de inmunodiagnóstico de neurocisticercosis, ya que se encuentran altamente expuestos al sistema inmune del hospedero (9).

La enolasa es una enzima del metabolismo celular y además es una proteína de superficie celular que tiene antecedentes como candidato vacunal y de diagnóstico para otras enfermedades parasitarias (21, 12), por lo que su empleo en el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis es tentador.

La falta de conocimiento de las características bioquímicas de las enzimas de relevancia en los patógenos, y en este caso de *T. solium*, restringen las medidas terapéuticas adecuadas para su tratamiento y/o erradicación. Considerando que en los Platelminos, Phylum al que pertenece *T. solium*, la glucólisis ocurre principalmente a nivel de tegumento y es su principal vía metabólica de

subsistencia (22), el conocimiento de las propiedades y características bioquímicas de las enzimas involucradas en dicho proceso, entre ellas la enolasa, es de mucha importancia ya que abre paso a múltiples aplicaciones, como la inhibición enzimática por fármacos y/o anticuerpos específicos (23).

En consecuencia, se eligió a la enolasa de *T. solium* por ser una enzima imprescindible para la supervivencia de este parásito y encontrarse expuesta al sistema inmune del hospedero.

III. MARCO TEÓRICO

III.1. BIOLOGÍA DEL PARÁSITO

III.1.1. MORFOLOGÍA

Las solitarias del género *Taenia* (*T. solium*, *T. saginata* y *T. saginata asiática*) son gusanos planos de color blanco opaco, excepcionalmente largos y segmentados, midiendo hasta 12 metros en el estadio adulto. La *T. solium* por lo general mide entre 1.5 a 5 metros de longitud. La cabeza o escólex es el órgano de fijación al hospedero, posee cuatro ventosas y un rostelo que puede presentar una corona de ganchos (*T. solium*), estar desnudo y hundido (*T. saginata*), o con tener ganchitos rudimentarios (*T. saginata asiática*). Cuando los ganchos están presentes, éstos se hallan organizados en dos hileras de 22 a 32 ganchos. El escólex tiene el tamaño de la cabeza de un alfiler y es seguido por una región pequeña y estable, el cuello, a partir de la cual proliferan largas cadenas de segmentos o proglótidos, llamados en conjunto estróbilo, por lo que éste tiene la forma de una cinta larga que puede estar constituida por más de un millar de proglótidos. El estróbilo continuamente está en crecimiento, de manera que en el extremo posterior de la tenia se encuentran los proglótidos más grandes y antiguos. La característica principal de las solitarias es que carecen de tracto digestivo y más bien el tegumento que las rodea cumple la función de absorción, digestión, protección y tracción. El tegumento recubre a todo el gusano y su capa más externa se encuentra formada por microvellosidades cubiertas de glicocalix (24).

Los huevos son esféricos y miden entre 20 a 50 μm . Tienen una apariencia radial bajo la luz del microscopio ya que el embrión hexacanto se encuentra rodeado por

el embrióforo, que es una envoltura constituida por bloques de proteínas del tipo queratinas unidos entre sí por un material cementante. Estudios ultraestructurales han revelado que los huevos poseen varias capas y membranas que permiten la supervivencia de la oncósfera en el medio exterior (25). La envoltura más externa es el vitelo, que es una cápsula translúcida al microscopio, constituido por un grupo de células que forman un sincitio. La siguiente envoltura es el embrióforo, que le da una estructura rígida y protege al embrión cuando los huevos están en el exterior, haciéndolos extremadamente resistentes y permitiéndoles soportar una amplia gama de temperaturas ambientales. Finalmente se encuentra la membrana oncosferal que rodea al embrión hexacanto. Cuando los huevos son liberados al ambiente desde un hospedero definitivo, muchos de ellos se encuentran totalmente desarrollados e infectivos, sin embargo otros pueden estar en diferentes estadios de desarrollo y madurar fuera del huésped. Posteriormente cuando los huevos son ingeridos por un hospedero intermediario, el material cementante que une los bloques del embrióforo es susceptible a la digestión enzimática, lo que permite la liberación de la oncósfera (24).

Una vez liberadas, las oncósferas microscópicas migran a través de la lámina propia intestinal y se mantienen en la mucosa intestinal entre 15 a 48 horas luego de ingeridos los huevos (26). Después de penetrar el intestino, el desarrollo post oncosferal conlleva a la formación de los cisticercos o metacestodos. El cisticercos se desarrolla completamente entre 177 y 325 días post infección, formándose a su alrededor una cápsula inflamatoria, la cual impide la evaginación del escólex. Los cisticercos están compuestos de dos cámaras: la interior que contiene el escólex y canal espiral, y el compartimiento exterior que la rodea y contiene el fluido

vesicular, que por lo general es menor a 0.5 ml. Una vez que un cisticerco vivo es ingerido por el hospedero definitivo, lo primero que ocurre es la ampliación del poro vesicular que permite que el escólex y el cuello se reviertan hacia el exterior, mientras que la pared y el fluido vesicular son desintegrados en el tracto digestivo del hospedero. Tanto el tegumento como los sistemas nervioso y excretor del cisticerco son similares a los descritos para la tenia adulta. En la cisticercosis el metacestodo de *T. solium* puede establecerse en el sistema nervioso central, ojos, músculo estriado y cardiaco, y en el tejido subcutáneo. Los cisticercos pueden adquirir dos formas: la vesicular y la racemosa. La primera es la más frecuente y se presenta como quistes esféricos u ovals de 0.5 cm a 1.5 cm de diámetro, de color blanco translucido o amarillento, en cuyo interior se encuentra el escólex como un granulo sólido y excéntrico. La segunda forma es la racemosa, circunscrita por una membrana delicada, en la cual se presentan múltiples sacos con formas de racimos de uvas. Es de mayor tamaño, llegando a medir hasta 20 cm de diámetro y pudiendo contener hasta 60 ml de fluido. El cisticerco racemoso es una larva degenerada de *T. solium*, que se puede desarrollar a partir de la forma vesicular si el espacio donde se encuentra lo permite (2).

III.1.2. CICLO DE VIDA

El ser humano se infecta de teniasis por *T. solium* al comer carne cruda o mal cocido de cerdo (*Sus scrofa*), u otro hospedero intermediario, infectado con cisticercosis. Una vez ingerido, la pared y fluido vesicular del cisticerco son degradados por los jugos gástricos e intestinales del huésped, permitiendo la evaginación del escólex y su fijación, mediante sus coronas de ganchos y ventosas, en el tercio superior del intestino delgado. Estudios microscópicos en

modelos animales han demostrado que las microvellosidades intestinales son engullidas por las ventosas, mientras que los ganchos del rostelo quedan enterrados en las criptas de Lieberkuhn de la mucosa intestinal (24).

El parásito adulto se desarrolla y empieza a liberar proglótidos grávidos entre 8 y 12 semanas luego de la infección inicial. Aunque la literatura nos dice que las solitarias pueden vivir en el intestino humano hasta 25 años, la práctica revela que las solitarias en promedio viven por un periodo de tiempo menor. Los proglótidos son expulsados mediante las heces del huésped (en promedio entre 4 a 5) en una frecuencia que puede ser diaria, inter diaria o solo dos veces por semana.

Cuando los huevos liberados son ingeridos por los cerdos, o cualquier hospedero intermediario adecuado, las enzimas digestivas y la bilis promueven la disgregación de los bloques del embrióforo y degradan la membrana oncosferal. De esta manera la oncósfera activada penetra la pared intestinal y luego es transportada vía los vasos sanguíneos o linfáticos a distintos tejidos del animal donde se desarrolla hasta convertirse en un cisticerco. Los cisticercos se establecen principalmente en el músculo esquelético y cardiaco, tejido subcutáneo y cerebro de los cerdos, en un lapso de aproximadamente 8 semanas. Éstos permanecen viables por lo menos un año, cuando los cerdos por lo general son llevados al matadero. En cerdos de más edad se hacen evidentes procesos inflamatorios alrededor de los cisticercos, apreciándose rara vez quistes calcificados (24). El ciclo se completa cuando el hombre consume dicha carne infectada con cisticercos viables (Figura 1).

El cerdo (*Sus scrofa*) es el principal hospedero intermediario de *T. solium*, sin embargo, existen otras especies que también pueden adquirir la cisticercosis, incluyendo el ser humano. El hombre adquiere la cisticercosis por malos hábitos de higiene, al consumir alimentos contaminados con materia fecal de un individuo con teniasis que contengan huevos de *T. solium* (27). Se ha observado una alta prevalencia de teniasis por *T. solium* entre pacientes con neurocisticercosis, lo que indicaría que dichos portadores de solitarias constituyen una fuente potencial de infección de cisticercosis, tanto para ellos mismos como para los que los rodean (24).

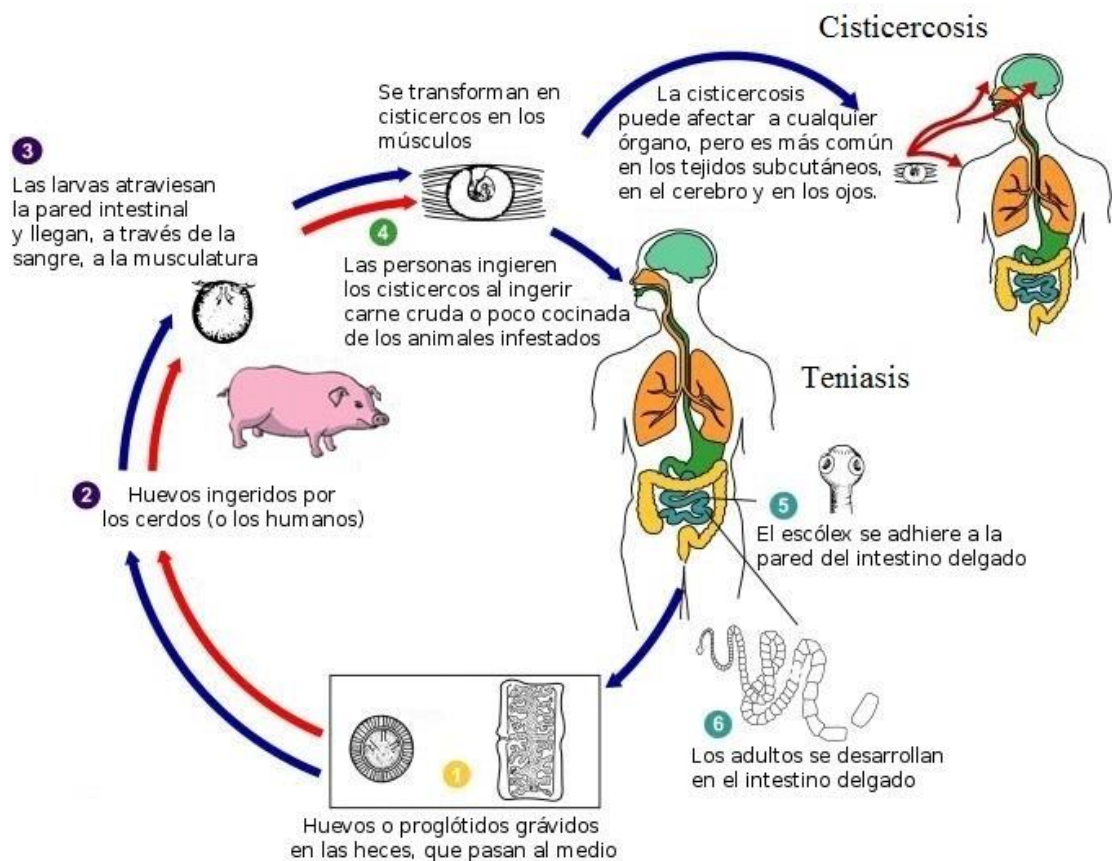


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium* (Adaptado del CDC).

Recientemente en Indonesia y china se han reportado casos de cisticercosis por *T. solium* en perros, lo que constituiría una fuente importante de teniasis humana, ya que en estas regiones se acostumbra a comer a dichos animales (24). Otras especies de mamíferos donde se han reportado cisticercos con rostelo armado son por ejemplo: gatos, camellos, liebres, osos pardos, zorros, ratas y ratones (28, 29).

III.1.3. GENÓMICA

El genoma completo de dos especímenes de *T. solium* provenientes de Huancayo (cisticerco) y Puno (proglótido), han sido secuenciados y anotados por El Grupo de Trabajo de la Cisticercosis en el Perú, conformado por personal de diversas instituciones (La Universidad Peruana Cayetano Heredia, el NIH y el CDC). De éste estudio se estimó que el genoma completo de *T. solium* consta de aproximadamente 133 MB, con un contenido de GC de 42.54%, un total de 17, 746 genes predichos y cerca de 6, 200 genes anotados, 28 proteínas transmembranas putativas y 273 proteínas secretorias, y un porcentaje del 87% al 93% de sus genes en sintenia con la de otros cestodos. Vale la pena mencionar que dicho genoma resulto del ensamblaje híbrido de las secuencias de los estadios larval y adulto de *T. solium*, provenientes de Huancayo y Puno, respectivamente, es decir, de ejemplares peruanos. De esta manera, el genoma disponible de *T. solium* se convierte en una herramienta invaluable para el mejoramiento del diagnóstico tanto de neurocisticercosis como teniasis, implementación de la vacunología reversa, conocimiento de los factores de virulencia, desarrollo de herramientas de genotipificación (como los microsatélites) y diseño de drogas basadas en el genoma. Por lo tanto, con el conocimiento del genoma de *T. solium* las estrategias de control y prevención de cisticercosis y teniasis progresaran, a la

vez que se tendrá un mejor entendimiento la biología celular y molecular de este parásito (30).

Paralelamente, El consorcio del Genoma de *T. solium*, encabezado por la Universidad Nacional Autónoma de México, ha secuenciado el genoma nuclear de este parásito, mediante secuenciación Illumina y pirosecuenciación 454, y se encuentra disponible en la base de datos “GeneDB” (<http://www.genedb.org>). Los datos de la secuencia ensamblada por este grupo sugieren que el genoma de *T. solium* es de unos 120 Mb, mostrando una gran cantidad de genes especializados en rutas de detoxificación, proteínas no canónicas de choque térmico y una gran variedad de antígenos reconocidos (22).

Por otro lado, se encuentra el genoma de *T. solium* anotado por el Instituto de Genómica de Beijing (2010) a partir de un aislado procedente de China, secuenciado y ensamblado mediante una combinación de las plataformas 454 e Illumina, y disponible en la base de datos TGD (<http://taenia.big.ac.cn/>). El ensamblaje final fue de aproximadamente 130 Mb, involucrando un total de 11 902 genes predichos y 8 404 proteínas con anotación funcional (Figura 2).

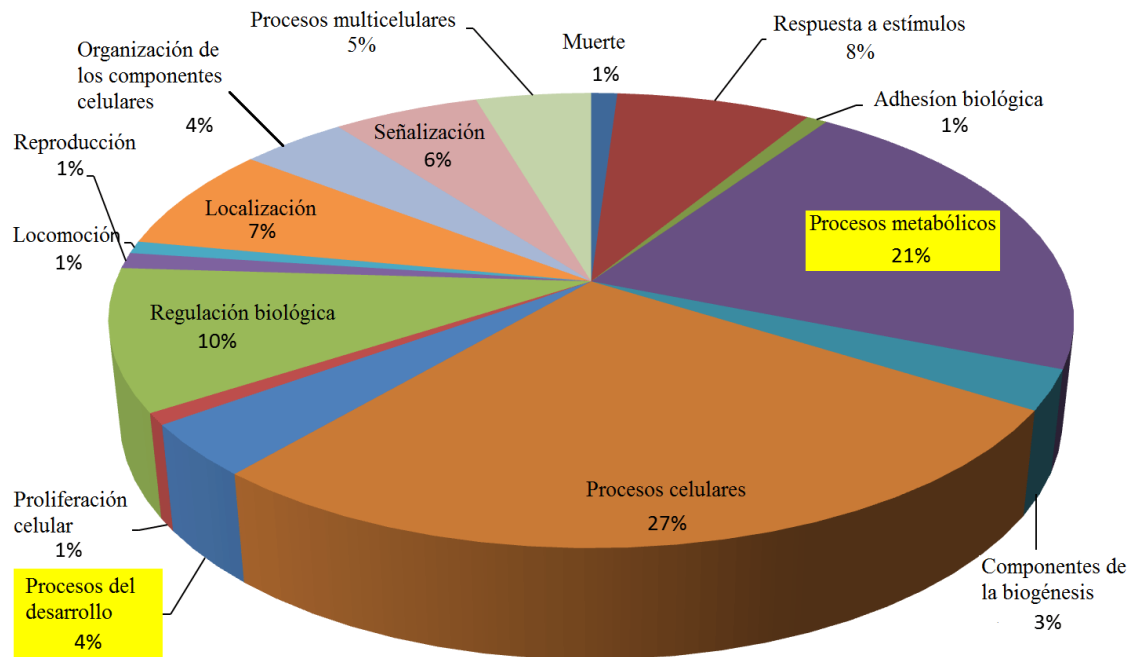


Figura 2. Categorización funcional de las proteínas de *T. solium*. Proporción de las 8 404 proteínas con anotación funcional en diferentes categorías de “Gene Ontology”. Tomado del Taenia Genome Database (<http://taenia.big.ac.cn/>).

III.2. CISTICERCOSIS HUMANA

La cisticercosis humana es la enfermedad parasitaria causada por el cisticerco de la *Taenia solium*. Tal infestación puede ocurrir en diversos órganos y tejidos como la piel, músculos, en los ojos o en las vísceras, pero tiende a manifestarse en el sistema nervioso central (SNC), momento en el cual la enfermedad se denomina neurocisticercosis, cuya sintomatología es similar a otras enfermedades neurológicas y crisis epilépticas, causando grandes daños e incluso la muerte del afectado (3). Esta enfermedad parasitaria tiene una alta prevalencia en países en vías de desarrollo de África, Asia y Latinoamérica (31).

La heteroinfección es el mecanismo más frecuente por el cual se adquiere la cisticercosis, en la cual los huevos de un individuo parasitado, es decir con teniasis, son ingeridos por otra persona. Ocasionalmente sucede la autoinfección, que puede ser externa, en la cual los huevos o segmentos de proglótidos eliminados por los individuos con teniasis son ingeridos por ellos mismos por malos hábitos de higiene. Finalmente, con menor frecuencia, ocurre la autoinfección interna en donde los proglótidos de los individuos con teniasis son regurgitados hacia el estómago, con la consiguiente liberación de los huevos (2).

III.2.1. PATOLOGÍA Y PATOGENIA

Como ya se mencionó esta enfermedad ocurre cuando las oncósferas penetran la barrera intestinal del huésped, en este caso el ser humano, luego de lo cual se distribuyen vía el sistema circulatorio prácticamente a cualquier parte del organismo, donde se enquistan y crecen hasta formar los cisticercos. Se ha estimado que el periodo entre la llegada de los huevos al intestino y la constitución del cisticerco por lo general es de dos a tres meses. Los cisticercos pueden permanecer viables por mucho tiempo, debido a que la maduración de oncósfera a cisticerco es irregular. Este último aspecto se ha comprobado en pacientes en los cuales han aparecido cisticercos en diferentes épocas pese a haber tenido solo una infección. Esto hace suponer que existe un periodo de maduración latente de los cisticercos incluso en un mismo huésped (2).

Los cisticercos se pueden ubicar en muchas partes del cuerpo, pero en la mayoría de los casos involucra el Sistema Nervioso Central (SNC). Luego de esta localización le siguen en frecuencia el tejido subcutáneo, músculo esquelético y cardiaco, y ojos. El número de cisticercos en un mismo individuo puede variar de

muchos a unos pocos o inclusive solo uno (2). La cisticercosis humana se desarrolla principalmente en el SNC (neurocisticercosis) debido a que es un lugar inmunológicamente privilegiado para la supervivencia del metacestodo. Una vez que la oncosfera traspasa los capilares y se aloja en el SNC es protegido por la Barrera Hemato – Encefálica (BHE) y se hace de difícil acceso para el sistema inmune, favoreciendo su maduración a cisticerco (32).

En el SNC se puede desarrollar neurocisticercosis en cualquiera de sus estructuras. La localización más frecuente es en el parénquima de los hemisferios cerebrales, seguido de las cavidades ventriculares y cisternales, espacio sub-aracnoideo, las meninges y la médula. La cisticercosis múltiple es más común que la única y se han reportado quistes gigantes únicos de 5 cm de diámetro o más. La neurocisticercosis en el parénquima cerebral es la más común, y en este caso los cisticercos adoptan la forma vesicular, siendo quistes únicos ovoides o esféricos y homogéneos de 0.5 a 1 cm de diámetro. En la neurocisticercosis parenquimatosa, los cisticercos se ubican en las zonas más vascularizadas. Los hemisferios cerebrales son comúnmente afectados por este tipo de neurocisticercosis, siendo el cerebelo, el tallo cerebral y la médula espinal afligidos con menor frecuencia. La forma racemosa prefiere las cavidades, ventrículos y cisternas, en las cuales puede adquirir distintas formas y tamaños. En la localización ventricular de la neurocisticercosis el IV ventrículo es el afectado con mayor frecuencia. Cuando se ubican en el espacio subaracnoideo, los cisticercos pueden adquirir la forma racemosa (con mayor frecuencia) o vesicular (raro), produciéndose una meningitis por cisticercosis lo cual puede afectar a los pares craneanos y obstruir el paso del

Líquido Céfaló – Raquídeo (LCR). Por último, la médula espinal puede verse afectada por cisticercos vesiculares, pero es poco común (27).

Cuando los cisticercos mueren, ya sea naturalmente o por tratamiento, se produce una reacción inmunológica con exudado alrededor de estos que desencadenan inflamación que puede obstruir los canales de LCR, causar hipertensión craneana e hidrocefalia y en algunos casos lesionar los pares craneanos. Se ha detectado la presencia de una forma de neurocisticercosis miliar, la cual consiste en múltiples cisticercos pequeños en el parénquima cerebral, que produce encefalitis. Es posible que mediante la escanografía (TAC) no se pueda detectar los quistes debido a la gran inflamación presente (2).

Por otro lado se ha estimado que en la neurocisticercosis la mitad los cisticercos se ubican en el parénquima, una cuarta parte en los ventrículos y solo un 5% en la médula espinal. Alrededor de los cisticercos vivos se presenta una cápsula fibrosa, con excepción de los cisticercos ubicados en el cerebro y ojos, que es fácilmente desprendible. Durante su vida los cisticercos presentan mecanismos de adaptación al huésped, que los pueden mantener vivos hasta 20 años, y con poca reacción inflamatoria periquística. Cuando mueren se degeneran hacia una masa amorfa coloidal, rodeada por células inmunes de varios linajes, como linfocitos, eosinófilos, histiocitos y células gigantes, formándose un granuloma que se fibrosa y termina por calcificarse. Dado que el promedio de vida de los cisticercos es variable, es posible encontrar en un mismo individuo, cisticercos vivos, en deterioro y muertos (2).

III.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La cisticercosis es una de las enfermedades tropicales desatendidas del mundo, predominante en los países en vías de desarrollo y producto de la contaminación por materia fecal. Es la principal causa de epilepsia tardía en los países endémicos de *T. solium*, en donde la prevalencia de esta enfermedad es el triple que en los países desarrollados. Entre los factores que contribuyen a la presencia de la cisticercosis se encuentran la contaminación del suelo por excretas humanas (que luego serán consumidas por los cerdos), un mal saneamiento ambiental y malos hábitos de higiene personal (2).

La distribución global de la teniasis y cisticercosis humana causadas por *T. solium* incluye regiones endémicas como América Latina, el Sur y el Sur-Este de Asia, y el África Subsahariana (Figura 3).

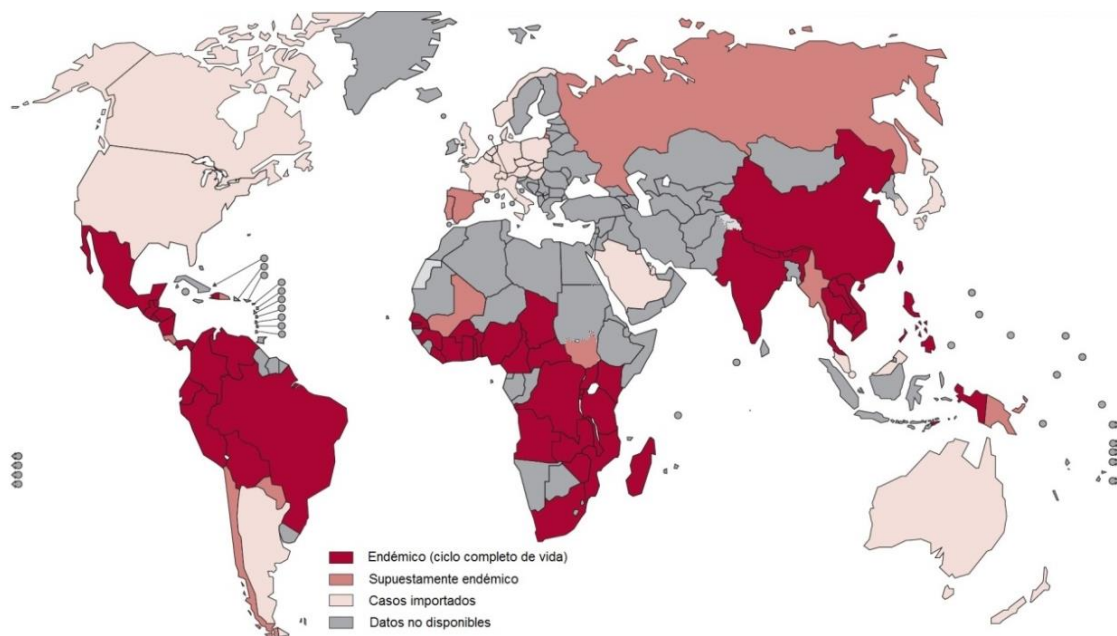


Figura 3. Distribución global de la cisticercosis humana, 2011 (Adaptado de WHO 2013 [33])

Se estima que más de 50 millones de personas en el mundo sufren de cisticercosis, causando 50 000 muertes por año (24). Entre las personas con epilepsia de los países endémicos, se ha estimado que un 29% de ellos tienen cisticercosis. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado que alrededor del mundo 50 millones de personas tienen epilepsia, de las cuales un tercio de todos los casos ocurren donde la infección por *T. solium* es endémica (Tabla 1) (33). En algunos países de América Latina y África la frecuencia de epilepsia, es del 3% de los cuales entre el 25 y 40% tienen evidencia de cisticercosis (34).

Tabla 1. Número estimado de casos de cisticercosis y casos de epilepsia asociados a neurocisticercosis por área geográfica*.

Área	No. De casos de cisticercosis humana	No. De casos de epilepsia activa asociada con neurocisticercosis
África	Datos no disponibles	0.31 - 4.6 millones
China	3 - 6 millones	Datos no disponibles
India	Datos no disponibles	> 1 millón
América Latina	11 - 29 millones	0.45 - 1.35 millones

*Adaptada de WHO (33).

La neurocisticercosis (NCC) puede llegar a ser fatal y ha sido reportada como causa de muerte en Brasil, Camerún, México y los Estados Unidos. La proporción anual de muertes causada por epilepsias asociadas con neurocisticercosis ha sido estimada en 6.9% de los casos incidentes en Camerún y 0.5% en México (33).

En un estudio de 1, 336 autopsias de casos de neurocisticercosis en América Latina, se encontró que el 53% de los casos presentaron síntomas neurológicos, mientras que el resto fue asintomático. El 76% de los casos estuvieron entre los 10

y 50 años de edad. Se encontró que la mayoría procedía de zonas rurales El 18% de los casos tenía un antecedente de teniasis (35).

En el caso de Perú se han llevado a cabo estudios seroepidemiológicos mediante el EITB en grupos poblacionales definidos, encontrándose seroprevalencias basales de entre 10 y 20% en la población general, con valores de dos a tres veces más altos en grupos de individuos con epilepsia de las mismas poblaciones (36, 37). En base a los estudios de seroprevalencia el “Grupo de Cisticercosis del Perú” ha determinado que las zonas más endémicas del Perú para NCC corresponden a toda la sierra, la costa norte y la selva alta (Figura 4) (4). Asimismo, este grupo encontró que en la costa norte y la selva alta la tasa de migración andina es elevada. La NCC está presente con menor frecuencia en el resto del país, con Iquitos aparentemente libre de la enfermedad debido a su aislamiento geográfico del resto de departamentos (4).

No existen muchos datos sobre la prevalencia e incidencia de la epilepsia en el Perú, no obstante, los datos de prevalencia (15/1000) e incidencia (entre 90 y 150/100 000) en Tumbes son de dos a tres veces mayor respecto a los de USA y Europa. En el 2005, los datos de los estudios realizados en Tumbes determinaron que la NCC contribuye en un 30% de las epilepsias en este departamento. Asimismo, los estudios serológicos o radiológicos de personas epilépticas de otras zonas endémicas del Perú se encuentran asociados entre un 30 y 50% con casos de NCC (4). Se han estimado en 400, 000 los casos de NCC sintomática para Latinoamérica y en 31, 000 para Perú (38). Por otro lado, Rajkotia *et al.* (39) estimaron que el tratamiento de la NCC consume el 54% de un salario mínimo

anual, durante el primer año, además de causar una pérdida de 44.5 horas de actividad productiva por mes.



Figura 4. Principales áreas endémicas de cisticercosis en el Perú (4).

III.2.3. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de la neurocisticercosis se complica debido a la heterogeneidad de la sintomatología neurológica. Sin embargo, en situaciones en las que el paciente proviene de una zona endémica y presenta síntomas como epilepsia tardía, hipertensión endocraneana, meningitis crónica, etc., debe de considerarse como un caso potencial neurocisticercosis, por lo que se tendrá que diferenciar con tumor cerebral, obstrucción ventricular o cualquier otra patología de compresión cerebral (2). En este sentido, los estudios paraclínicos, en particular los radiológicos, son el soporte esencial para el diagnóstico de esta enfermedad. Debido a la carencia de tales herramientas de diagnóstico en muchas zonas endémicas, se estima que existe una subestimación global de esta

parasitosis. Entre las principales herramientas de diagnóstico de neurocisticercosis encontramos a las siguientes:

III.2.3.1. Diagnóstico Radiológico

La radiografía simple, mielografía, ventriculografía y arteriografía fueron útiles en el pasado. En la actualidad, estos procedimientos han dejado de ser utilizados debido a sus limitaciones y por marcada invasividad, con excepción de la radiografía simple para la demostración de calcificaciones por cisticercosis. Hoy en día el diagnóstico radiológico de la neurocisticercosis, que constituye el estándar de oro, descansa en la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética que permiten visualizar la localización, el número y el estadio de los parásitos (27).

Tomografía Axial Computarizada (TAC)

La TAC es el método más utilizado en la actualidad y permite detectar los parásitos en sus diferentes estadios. La clasificación radiológica de la neurocisticercosis mediante este método es variada, siendo las imágenes principales (2):

1. *Quistes parenquimatosos vivos*: Las imágenes son menos densas, únicas o múltiples, de varios milímetros de diámetro y raramente de unos cuantos centímetros, que no toman el medio de contraste, por lo que se presentan como zonas oscuras, y a veces muestran al escólex como un punto de mayor densidad.
2. *Quistes en involución*: Son similares al anterior pero presentan en la periferia una zona de mayor densidad que toma el medio de contraste, a

veces en forma anular, correspondiente a la inflamación periquística. Este estado llamado también forma granulomatosa, corresponde a quistes en proceso degenerativo, es decir, en etapa coloidal avanzada o etapa granular.

3. *Calcificaciones*: Pueden corresponder a parásitos que han sido recientemente destruidos, por lo que en la vecindad se presenta una reacción inflamatoria; o parásitos destruidos con anterioridad (solo la calcificación).
4. *Forma encefálica aguda*: Por lo general se encuentra en niños con múltiples quistes, dando origen a inflamación cerebral con hipertensión intracraneana y ventrículos colapsados. Se pueden observar a los quistes de forma nodular.
5. *Quistes intraventriculares*: En este caso se observan claramente, como zonas ovoides oscuras, cuando se usa medio de contraste yodado intraventricular.
6. *Formas meníngeas y formas con hidrocefalia*: Puede demostrarse que hay toma del medio de contraste en las meninges o presentarte hidrocefalia como consecuencia frecuente de neurocisticercosis, y sintomatología crónica.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Este método diagnóstico es utilizado con menor frecuencia que la TAC, pero reconoce mejor la inflamación perilesional. Asimismo, sirve para una mejor detección de los quistes intraventriculares o cerebelosos y las formas racemosas.

Además la RMN permite ver en calidad superior al escólex dentro del cisticerco. Sin embargo, la RMN no es apropiada para identificar las calcificaciones (2).

III.2.3.2. Inmunodiagnóstico

Los primeros métodos de inmunodiagnóstico de neurocisticercosis utilizaban la fijación del complemento para medir anticuerpos en el LCR, la inmunolectroforesis, la hemaglutinación pasiva y la doble inmunodifusión (27). Con el tiempo estos métodos fueron reemplazados por una serie de pruebas, entre las que destacan el Inmunoblot y el ELISA, que se mencionan a continuación:

Inmunoblot

Llamado técnicamente EITB (por su acrónimo en inglés *Enzyme-linked Immuno-electro-Transfer Blot*) o “Western Blot”. Actualmente es el inmunoensayo más robusto para el diagnóstico de neurocisticercosis (NCC). Diferentes tipos de antígenos de *T. solium* han sido probados mediante esta técnica a lo largo de los años, presentándose resultados variados, sin embargo las glicoproteínas de unión a Lentin Lectin (LLGP del inglés *lentil lectin-bound glycoprotein*) han sido las que han obtenido mejor sensibilidad y especificidad (16), por lo que la prueba de LLGP-EITB es considerada como la referencia serológica estándar para el diagnóstico de NCC.

El LLGP-EITB es el método de Inmunoblot que detecta anticuerpos dirigidos hacia una o más de las 7 glicoproteínas, provenientes de extractos de cisticercos de *T. solium*, que han sido transferidas hacia tiras de nitrocelulosa previa electroforesis. En pacientes con lesiones múltiples intracraneales la sensibilidad llega a ser del 95% y la especificidad 100%, usando suero sanguíneo o LCR. Sin

embargo, cuando el paciente presenta un quiste único o quistes calcificados la sensibilidad disminuye hasta un rango que va del 50 al 80%. En cualquier caso la especificidad del LLGP-EITB notablemente se mantiene en 100%, presentándose solo casos anecdóticos de falsos positivos (20). Es importante mencionar que un resultado positivo mediante esta prueba no significa NCC activa ya que los anticuerpos pueden persistir por años luego de la muerte del parásito, asimismo puede indicar cisticercosis no neurológica, teniasis o exposición previa al parásito (27, 6).

Si bien el LLGP-EITB es un método excelente, no es tan fácil la purificación de sus antígenos ya que se requieren cisticercos de cerdos infectados naturalmente, además de una estandarización del sistema del gel de poliacrilamida para una correcta separación en la electroforesis. Por este motivo en los últimos años se han buscado métodos alternativos como la utilización de fracciones proteicas de fluido de cisticercos (40) o la producción de antígenos recombinantes que puedan ser de utilidad para el diagnóstico de NCC. En este último caso destaca el trabajo de Noh *et al* (20) que realizaron un inmunoblot utilizando dos proteínas recombinantes (rGP50 y rT24H) y un péptido sintético (TsRS1) del grupo de las LLGP, consiguiendo resultados similares al LLGP-EITB, 99% de sensibilidad y 99% de especificidad, pero con la ventaja de tener una fuente antigénica mucho más accesible. Sin embargo no se pudo mejorar la sensibilidad de la detección de pacientes con quiste único.

Por otro lado el inmunoblot se ha realizado utilizando otros fluidos corporales como la saliva y la orina, buscando anticuerpos reactivos contra los antígenos del cisticercos. Estos métodos tienen la ventaja de ser menos invasivos y de fácil

obtención y son de gran utilidad para llevar a cabo estudios epidemiológicos en zonas endémicas de *T. solium*. Sin embargo, tienen el inconveniente de poseer menos sensibilidad y especificidad que los métodos que utilizan suero o LCR, decayendo aún más estos valores cuando se presenta un quiste único (6).

ELISA

La técnica ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* o “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) es la más frecuentemente utilizada debido a la facilidad en la preparación de sus antígenos. Su formato de desarrollo es más simple y menos costoso que el EITB, por lo que puede realizarse en la mayoría de laboratorios. El ELISA es una prueba cuantitativa que puede ser utilizada en diversos estudios con gran rendimiento y es más objetiva que el EITB ya que no depende de la interpretación personal para determinar los casos positivos de la enfermedad (40).

En los últimos años se han evaluado muchos antígenos con la prueba de ELISA para evaluar su eficacia en el diagnóstico de cisticercosis y NCC. Con el tiempo las proteínas antigénicas utilizadas en este ensayo han ido sofisticándose; de modo que han evolucionado desde extractos crudos de cisticercos y fracciones purificadas de éstos hasta proteínas recombinantes y péptidos sintéticos.

En el caso del diagnóstico de NCC se considera que el ensayo de EITB es más sensible y específico que el ELISA. Sin embargo, estudios recientes han reportado una alta sensibilidad y especificidad del ELISA comparables al EITB. En este sentido Zimic y su grupo estandarizaron un ELISA basado en una fracción proteica de 53/25 kD, con actividad Catepsina, parcialmente purificada a partir de

fluido quístico de *T. solium*, encontrando una sensibilidad del 98% en pacientes con múltiples cisticercos parenquimales y 84% en pacientes con quiste único, mientras que la especificidad fue del 92.7% (40). Por su parte, Lee y compañía mediante la utilización de antígenos recombinantes y sintéticos, pudo conseguir hasta 96.3% de sensibilidad y 98,6% de especificidad en pacientes con 2 o más quistes viables (19).

Dot-ELISA

Llamado también ELISA de punto, es una modificación de la técnica de ELISA en la cual se usan tiras de membrana de nitrocelulosa en lugar de placas de poliestireno, haciendo al proceso más sencillo y económico. La lectura se realiza de manera visual, donde el cambio de color indica la reacción positiva. La aplicación de este método es ideal para hacer tamizaje diagnóstico en zonas endémicas. Este método se ha empleado para determinar cisticercosis humana a partir de antígenos provenientes de extracto de cisticerco de *T. solium*, hallándose una sensibilidad del 80.7% y una especificidad de 92.4% (41). Recientemente, Piña *et al.* (42) utilizaron la fracción proteica de 53/25 kD con actividad Catepsina de fluido quístico de *T. solium* para la evaluación del Dot-ELISA en el diagnóstico de NCC, encontrando una sensibilidad del 94.4% al 100% en individuos con quistes extraparenquimatosos, una sensibilidad de 74.6% al 80% en individuos con quistes parenquimatosos múltiples y una sensibilidad del 29% al 45% en individuos con quiste único; mientras que la especificidad estuvo entre el 99% al 100%, presentando muy poca reacción cruzada con otras parasitosis.

Antígenos de suero, LCR y orina

Los antígenos producidos por el parásito vivo pueden ser detectados por medio de técnicas inmunoenzimáticas de captura, utilizando para ello anticuerpos monoclonales o policlonales. Este método tiene la ventaja de detectar cisticercosis activa, a diferencia de los ensayos de detección de anticuerpos que muchas veces pueden ser positivos en cisticercosis inactiva (parásitos muertos por tratamiento o calcificados). Cuando se usó el suero humano como fuente de antígenos y además anticuerpos monoclonales contra el antígeno de secreción HP10 en un ensayo de ELISA, se determinó un 85% de sensibilidad y 92% de especificidad para casos de NCC, pero mostrando mejor relación entre la existencia de parásitos vivos y las imágenes por TAC (43).

En la búsqueda de fuentes menos invasivas para la toma de antígenos se ha usado a la orina en vez del suero de la sangre y LCR, que da positiva en el 92% de los pacientes con quistes viables y 62.5% cuando tienen un solo quiste, mientras que no se detectaron antígenos cuando los quistes estaban calcificados (44).

Consideraciones en el inmunodiagnóstico

Es importante mencionar que las pruebas de inmunodiagnóstico se ven afectadas por factores biológicos tanto del hospedero (Género, Edad, Genética, Estado de inmunológico y de salud) como del parásito (cepa, invasividad, viabilidad y patogenicidad) (6).

Por otro lado, cabe resaltar que la obtención de una ensayo sensible y específico al 100% para el diagnóstico de la NCC, inclusive asociado a quiste único, sería de gran valor, principalmente por la reducción de costos en los estudios

seroepidemiológicos y para el diagnóstico fehaciente de casos provenientes de zonas en las cuales las TAC y Resonancia Magnética son de difícil acceso (27).

III.2.3.3. Otros exámenes

En este caso no son patognomónicos para la neurocisticercosis, pero sin embargo brindan información importante para orientar el diagnóstico. Entre los principales se encuentran:

1. *Biometría Hemática*: Se presenta hipereosinofilia, entre el 6 y el 35% de los casos, aunque esta característica está ausente en la mayoría de los pacientes.
2. *Examen coproparasitoscópico*: La presencia de huevos de *T. solium* en pacientes con neurocisticercosis es poco frecuente, sin embargo se ha reportado hasta un 27% de casos positivos de cisticercosis en individuos con teniasis (27). La presencia de huevos o segmentos de proglótidos en las heces, ya sea por hisopado rectal o tamizaje de heces demuestra la infección por el parásito adulto de *Taenia* sin embargo no permite diferenciar entre *T. solium* y *T. saginata*, para cuyo caso se debe de buscar proglótidos enteros para determinar la especie por inspección histológica. Vale la pena mencionar que este examen es de mucha importancia ya que la presencia del parásito adulto es un riesgo potencial para el paciente y sus convivientes cercanos de desarrollar cisticercosis si es que ya no la padecen.
3. *Prueba de PCR anidada*: Mediante la amplificación del gen Tso31 por PCR anidado se puede diferenciar entre teniasis por *T. solium* y por *T.*

saginata, siendo lo más resaltante de este método que se puede trabajar directamente con muestras fecales para hacer la amplificación. Esta prueba ha resultado bastante útil en zonas endémicas para diagnosticar teniasis intestinal por *T. solium*, y por lo tanto tratar a estos pacientes y prevenir la cisticercosis. Esta prueba mostro una sensibilidad del 97% y una especificidad del 100% (45).

4. *Estudio de LCR*: El estudio citoquímico del LCR es importante ya que en el caso de neurocisticercosis usualmente revela aumento de proteínas, disminución de glucosa, por lo general debajo del 40% y aumento de células, especialmente linfocitos y eosinófilos. Si los eosinófilos llegan al 20% o más, la sospecha de neurocisticercosis se incrementa. Estas cifras aumentan en el LCR cuando los parásitos mueren, ya sea espontáneamente o por tratamiento, por lo que se le ha dado el nombre de síndrome del LCR (2).
5. *Cisticercos en localizaciones distintas al SNC*: La presencia de nódulos subcutáneos indoloros y no inflamados de 5 mm a 10 mm de diámetro es un indicio de esta parasitosis y se comprueba por biopsia. Si además de estos nódulos, se presentan teniasis intestinal o síntomas neurológicos, la sospecha clínica de neurocisticercosis debe de ser mayor. Cuando ya se han calcificado los cisticercos en las formas musculares o subcutáneas antiguas, la radiografía simple permite el diagnóstico. En Asia es más frecuente encontrar las formas musculares y subcutáneas que en América Latina. Cuando la localización es ocular, el fondo de ojo permite la detección de estos parásitos. No obstante, en los casos donde hay opacidad

ocular, la ecografía, la TAC y resonancia magnética son el método de elección (2).

III.3. ANTÍGENOS RECOMBINANTES EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA

Los antígenos recombinantes pueden ser proteínas completas, polipéptidos u oligopéptidos producidos a partir de ADN recombinante. Tales moléculas pueden producirse en de diversas fuentes celulares como bacterias, levaduras, células de insecto o cultivos celulares. Las principales utilidades de los antígenos recombinantes, dada su naturaleza de ser reconocidos por el sistema inmune, son la vacunación y el inmunodiagnóstico de distintas enfermedades (46). La vacunación mediante antígenos recombinantes ha sido utilizada para combatir la infección por *T. solium*, ejemplo de ello lo podemos encontrar en las vacunas recombinantes TSOL18 (47) y S3Pvac (48) evaluadas ampliamente contra la cisticercosis porcina. Por otro lado, en los últimos años muchos grupos han invertido gran esfuerzo en producir antígenos recombinantes adecuados para el inmunodiagnóstico de NCC, ya que estos tienen la ventaja de producir resultados similares dentro y entre los laboratorios (reproducibilidad) y evitan la necesidad de purificar antígenos de cisticercos (6). Los principales antígenos recombinantes que han demostrado ser útiles para el inmunodiagnóstico de NCC son los del complejo LLGP (19, 20), sin embargo no son infalibles. En este sentido la búsqueda de mejores antígenos recombinantes aún continúa. Recientemente, diversos estudios han demostrado que la enolasa es una proteína inmunogénica debido a su capacidad de brindar protección a animales inmunizados con ella ante diversas enfermedades (12). Adicionalmente, diferentes estudios de enolasas

recombinantes de cestodos cercanos a *T. solium* (*E. granulosus* y *Taenia asiática*) han puesto de manifiesto su utilidad inmunodiagnóstica (49, 9, 50).

III.4. ENOLASA

III.4.1. DEFINICIÓN

La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa, EC 4.2.1.11) es una enzima que cataliza la deshidratación del 2-Fosfo-D-glicerato (PGA) a Fosfoenolpiruvato (PEP) durante glucólisis, y se encarga de la reacción inversa en la gluconeogénesis. La enolasa es una metaloenzima puesto que su actividad catalítica es dependiente de cationes metálicos divalentes que actúan como cofactores, siendo el Mg^{+2} el cofactor por excelencia. Por ser la enzima que participa en el penúltimo paso de la vía glucolítica, la enolasa se encuentra ampliamente distribuida en todos los organismos consumidores de glucosa. (51, 52).

III.4.2. PROPIEDADES Y DISTRIBUCIÓN

La enolasa es una de las proteínas más abundantemente expresadas en el citosol de muchos organismos, y además se expresa a nivel de superficie celular (53). Su distribución es universal en los tres dominios (Archaea, Bacteria y Eucarya), habiendo sido identificada y caracterizada en una serie de organismos que van desde bacterias Gram positivas hasta vertebrados superiores como el humano. La mayoría de organismos inferiores como las arqueas y bacterias solo poseen un gen de la enolasa, en tanto que en las levaduras y otros organismos superiores se manifiestan isoformas (12). En los vertebrados la enolasa se manifiesta en tres isoenzimas: α -enolasa, identificada en una variedad de tejidos incluyendo el

hígado; β -enolasa, que se expresa principalmente en el tejido muscular; y γ -enolasa, que se encuentra a nivel de tejido neuronal y neuroendocrino (54). Dichas enolasas están constituidas de dos subunidades que constituyen un dímero cuyo peso molecular varía entre 82 a 100 kD (57), mientras que en algunas eubacterias (*Bacillus subtilis*, *Thermotoga maritima* y *Streptococcus pneumoniae*) se han identificado enolasas octaméricas (55). En los mamíferos como los humanos existen tres loci independientes, α , β y γ , que codifican las tres isoenzimas de la enolasa (56). Varios estudios han identificado diferentes homodímeros y heterodímeros, $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$, $\alpha\gamma$ y $\gamma\gamma$ de la enolasa expresados a nivel de tejido nervioso a excepción de $\beta\gamma$. Interesantemente otros investigadores han reportado un *switch* genético en la expresión del tipo de enolasa en el músculo cardíaco y esquelético durante el desarrollo embrionario de ratas, de manera que en el feto la isoenzima predominante es la $\alpha\alpha$, pero conforme el desarrollo progresa esta se va reemplazando por los tipos $\alpha\beta$ y $\beta\beta$ en el músculo cardíaco adulto y por el isotipo $\beta\beta$ en el músculo adulto. Por otro lado la enolasa tipo $\alpha\alpha$ se expresa en la mayoría de tejidos, que incluye hígado, bazo, cerebro, tejido adiposo y riñón (57).

Pancholi *et al.* (57) comparó las secuencias aminoacídicas de 39 enolasas de distintos organismos (eubacterias, protistas, fungis, vegetales y animales), encontrando entre 40 a 90% de identidad entre dos enolasas de distintas especies, lo que determinó un alto grado de conservación en todos organismos analizados (Figura 5).

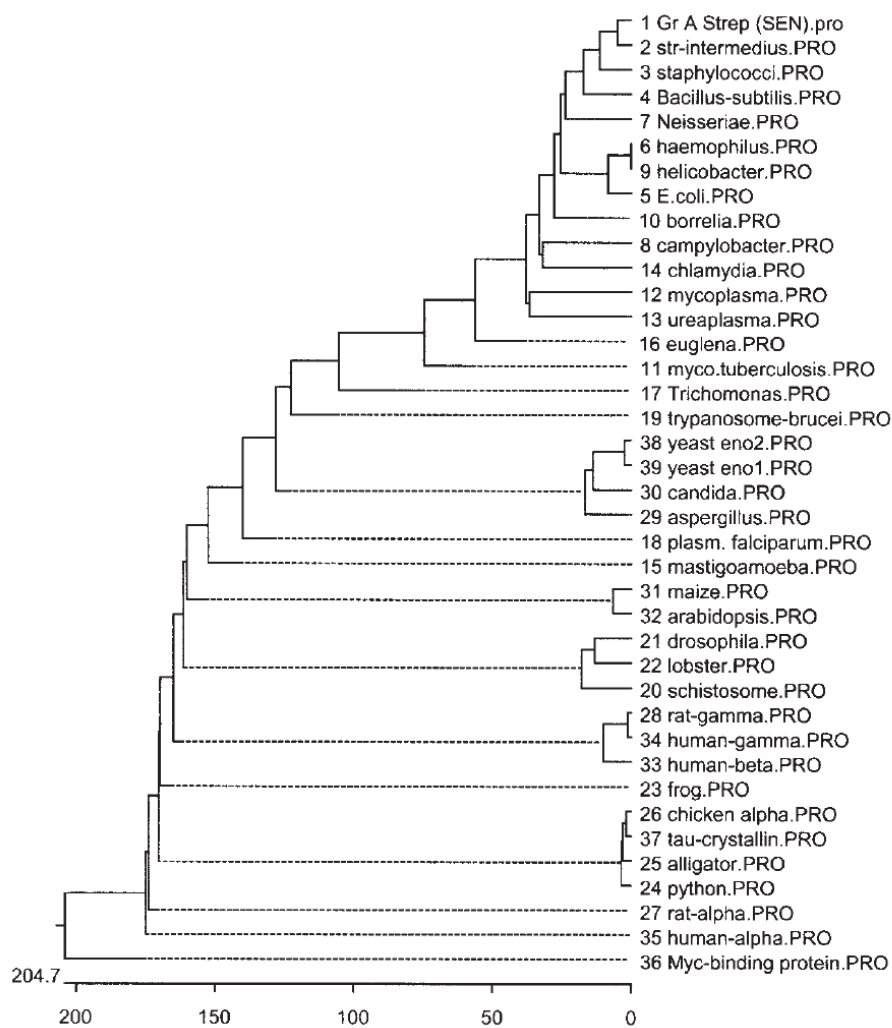


Figura 5. Árbol filogenético de 39 especies de enolasas (57).

III.4.3. IONES METÁLICOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA ENOLASA

Se han identificado seis iones metálicos divalentes capaces de activar a la enolasa, estos son: Magnesio, Manganeso, Zinc, Cadmio, Cobalto y Níquel. Aunque el Magnesio es el ion activador por naturaleza, la unión de la enolasa con éste es mucho más débil que con el Zinc (58). En este sentido, la enolasa califica como un complejo enzimático activado por iones metálicos, más que como una típica metaloenzima en donde el metal está fuertemente unido. El rol del Mg^{+2} en la activación de la enolasa es doble puesto que tiene dos sitios de unión a la enzima

que contribuyen con la catálisis. El primero de ellos es el llamado conformacional, ya que al unírsele el Mg^{+2} induce cambios conformacionales en sitio activo y permite la unión del sustrato (Metaloenzima). Una vez unido el sustrato firmemente, el otro ion Mg^{+2} ingresa al segundo sitio de unión, denominado catalítico, que es un componente necesario para la catálisis enzimática. La fuerza de activación relativa de los iones metálicos en la enolasa va en el siguiente orden: $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe(II)^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}$ y otros iones metálicos divalentes. Es de notar que la fuerza de unión del ion metálico al sitio catalítico es siempre más débil que al sitio conformacional (59).

III.4.4. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Los estudios de finales de los 80s definieron la estructura cristalina de la enolasa de levadura mediante rayos X, confirmando que la α -enolasa está compuesta de dos subunidades en contacto y dispuestas en forma antiparalela. La interacción entre las subunidades se da entre el N-terminal de una subunidad con el C-terminal de la otra, de manera que el Glu20 forma un par iónico con la Arg414 (Figura 6).

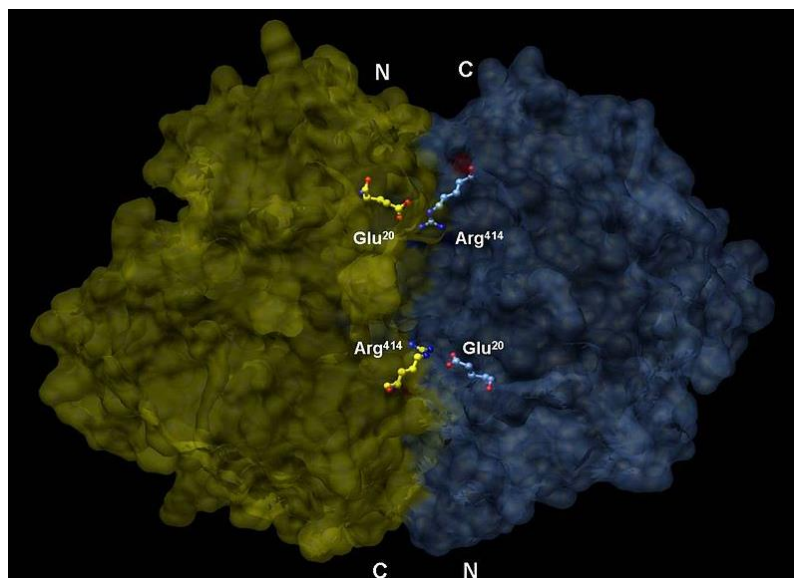


Figura 6. Subunidades de la enolasa α de levadura (1ONE.pdb en UCSF Chimera), mostrando sus dominios N-terminal y C-terminal y la interacción iónica entre sus residuos Glu²⁰ y Arg⁴¹⁴.

Cada subunidad está conformada por un dominio N-terminal pequeño y uno C-terminal grande. El dominio N-terminal a su vez está constituido de tres hojas- β y cuatro hélices- α (topología $\beta_3\alpha_4$). El dominio C-terminal comienza con dos hojas- β , seguido de dos hélices- α y termina con un barril compuesto de hojas- β y hélices- α alternadas, dispuestas de modo que las hélices- α rodean a las hojas- β [topología $\beta\alpha\beta\alpha(\beta\alpha)_6$]. De este modo la enzima adquiere una estructura globular y compacta, como resultado de las interacciones hidrofóbicas significativas entre estos dos dominios (60). Los residuos del sitio catalítico y alrededores son conservados, lo que indicaría que el plegamiento básico de todas las enolasas es estructuralmente el mismo.

III.4.5. MECANISMO DE CATÁLISIS

En base a los estudios cristalográficos han sido propuestos varios mecanismos catalíticos de la enolasa. En principio, la enolasa cataliza la eliminación del grupo OH- del C3 de un intermediario enolato (carbanion) creado a partir de la remoción de un protón del C2 del 2-PGA por una base en el sitio activo de la enolasa de una manera secuencial (61). Los estudios cinéticos junto con los cristalográficos han determinado que los grupos responsables de la mecánica de este proceso general de catálisis acido-base son aquellos localizados en la superficie opuesta al sitio activo (localizado en una cavidad del extremo C-terminal). Se ha establecido que una mutación en cualquiera de los residuos Glu168, Glu211, Lys345 o Lys396, conlleva a una reducción de 105 veces la actividad catalítica de la enolasa. Por lo tanto, estos aminoácidos son imprescindibles en la catálisis enzimática. Asimismo la His159 es un residuo crucial en el sitio activo, puesto que la mutación His159Ala solo retiene el 0.01% de la actividad de la enolasa, fallando en la ionización del C2 del PGA, en consecuencia la His159 sirve como una base catalítica en la reacción enzimática (Figura 7). Otro detalle importante es el cierre del sitio activo. Cuando el PGA se une a la enolasa- α interactúa con Gln167, Lys396 y los dos cationes Mg^{2+} , como resultado el grupo carboxilo desprotonado del PGA es rotado y neutralizado. Un movimiento extenso del *loop* Ser36-His43 (³⁶Ser-Gly-Ala-Ser-Thr-Gly-Val-His⁴³) y un pequeño movimiento de los *loops* Ser158-Gly162 y Asp255-Asn256 permiten la coordinación del carbonilo del PGA y la cadena hidroxilo lateral de la Ser39 con el Mg^{2+} catalítico. Este movimiento cerraría el sitio activo (57).

Luego de esto los *loops* Val153–Phe169 and Ser250–Gly277 se mueven juntos, permitiendo que la His159 done un proton al grupo fosforilo del PGA. Posteriormente la interacción del fosforilo protonado del PGA con la Arg374 (*loop* G) y el Mg^{2+} catalítico resultan en la sobreneutralización de la carga negativa del fosforilo y por lo tanto el pK_a de C2 del PGA disminuye hasta un rango fisiológico (considerando que el valor pK_a del proton de C2 del PGA libre esta alrededor de 30). El movimiento de la Lys345 de la hebra 6 cerca de la Arg374 (*loop* G) promueve la disminución del pK_a de su grupo ϵ -amonio, haciendo que este pierda un proton y acepte otro proveniente del C2 del PGA. Finalmente, el proton compartido por los carboxilatos del Glu168 y Glu211 forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo de C3 del PGA. Este proton luego es transferido del carboxilato hacia el hidroxilo, produciéndose H_2O y PEP (Figura 8).

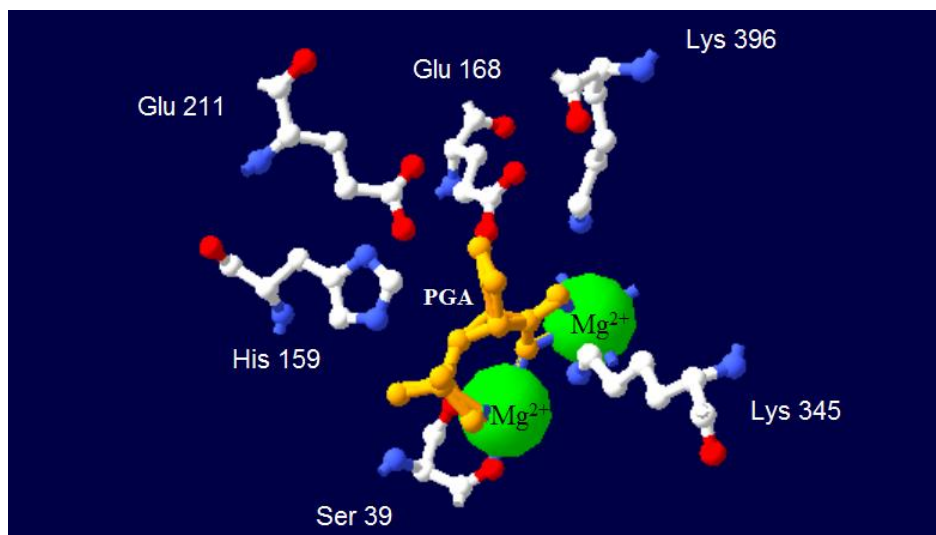


Figura 7. Modelo de barras y esferas de los principales residuos del sitio activo de la enolasa α de levadura, el PGA y los Mg^{2+} (1ONE.pdb) utilizando el programa Swiss-PdbViewer 4.1.0.

En la reacción inversa el agua retenida por los residuos Glu168, Glu211 e His373 (este último colabora con la unión al Hidrógeno), es desprotonada por uno de los carboxilatos y el OH⁻ resultante luego se une al C3. Al mismo tiempo el proton de la ε-amonio de la Lys345 se añade al C2, lo que resulta en la eliminación del enlace doble entre el C2 y C3 y por lo tanto la formación del PGA (57, 62).

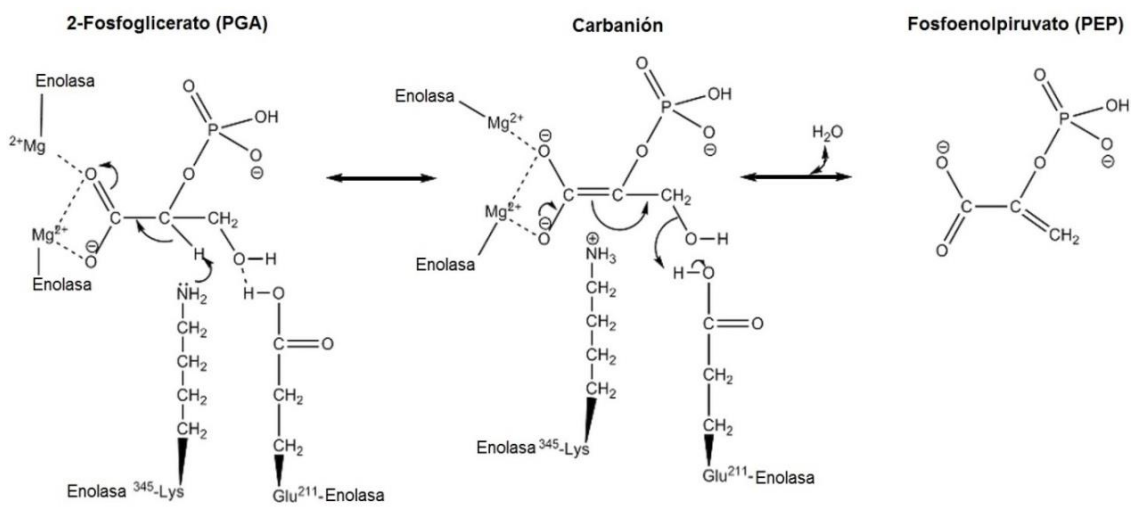


Figura 8. Mecanismo catalítico de la enolasa en modo escalonado (modificado de Nguyen y Thompson [63]).

El fluoruro es un competidor ampliamente conocido del sustrato de la enolasa. El fluoruro forma un complejo con el Mg^{2+} y HPO_4^{-2} , que se une al sitio activo en lugar del 2-PGA. En tal sentido, el consumo de agua fluorada inhibe la actividad de la enolasa en las bacterias orales, interrumpiendo su vía glucolítica, y por tanto, su funcionamiento metabólico normal, previniendo la formación de caries dental (64).

III.4.6. PROPIEDADES CATALÍTICAS

Las propiedades catalíticas de la enolasa han resultado ser variables para distintos organismos estudiados. Si consideramos la constante de Michaelis, K_m , que mide en un buen número de casos la afinidad de la enzima (E) por su sustrato (S) (65), en este caso de la enolasa por el 2-PGA, vamos a notar que ésta varía en un rango que va de 0.03 a 7.5 mM, cuyos valores extremos corresponden al K_m de la α -enolasa humana (56) y al K_m de enolasa de *Streptococcus neumoniae* (55), respectivamente. Es de notar que el valor de K_m para una determinada enzima puede variar ampliamente dependiendo de las condiciones de aislamiento o purificación, el organismo, el isotipo y el sistema de ensayo (66).

Adicionalmente, otros parámetros cinéticos como la actividad enzimática específica (A.E), la V_{max} y la k_{cat} pueden brindar información importante sobre la actividad enzimática de la enolasa. Sin embargo, la V_{max} ($\mu\text{M PEP}/\text{min}$) de por sí no genera información trascendental puesto que es una variable dependiente de la concentración enzimática y del volumen de la reacción. En tal sentido el cálculo de la actividad enzimática específica tiene más significado puesto que calcula el número de unidades enzimáticas por mg de enzima (U/mg) (67).

La constante catalítica k_{cat} o número de recambio es equivalente al número de moléculas de sustrato convertidas a producto (P) por unidad de tiempo y a cargo de una sola molécula de enzima, cuando la enzima está saturada por el sustrato. Se han reportado distintos valores de k_{cat} para enolasas de diferentes organismos: 13 200 min^{-1} para *E. coli*, 17 600 min^{-1} para *S. cerevisiae*, 8 000 min^{-1} para conejo, 7 900 min^{-1} para rata (68), 4 200 min^{-1} para *Candida albicans* (69) y 4 766 min^{-1} para *Trypanosoma cruzi* (70).

Los parámetros k_{cat} y K_m nos permiten evaluar la eficiencia catalítica de las enzimas mediante que el cociente k_{cat}/K_m . Este parámetro es conocido como la constante de especificidad y es la constante de velocidad para la conversión E + S a E + P. Existe un límite superior de k_{cat}/K_m , impuesto por la velocidad a la que E y S pueden difundir conjuntamente en una solución acuosa. Este límite controlado por difusión se encuentra entre 10^8 y $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Se dice que las enzimas que tienen un valor de k_{cat}/K_m cercano a este límite han alcanzado la perfección catalítica (67).

Por otro lado el pH y la concentración de Mg^{2+} son otras variables sumamente importantes en la cinética enzimática, puesto que experimentalmente se tienen que encontrar el pH y la $[\text{Mg}^{2+}]$ óptimos de la enzima, en donde se produzca su máximo rendimiento. En la Tabla 2 se muestran las principales características cinéticas de diferentes enolasas provenientes de especies representativas.

III.4.7. MULTIFUNCIONALIDAD

Además de su papel trascendental durante la glucólisis, realizado en el citosol, la enolasa ha sido reportada como una enzima multifuncional. Entre sus múltiples funciones resaltan su papel como proteína estructural τ -cristalino de los lentes de los vertebrados; proteína de unión al protooncogen *c-Myc* o MBP-1 (acrónimo del inglés *Myc Binding Protein*), en este caso funciona como regulador negativo de la expresión de *c-myc*; proteína de estrés hipóxico o HAPs (acrónimo del inglés *Hypoxia Associated Protein*); proteína de *Shock* térmico o HSP48 (acrónimo del inglés *Heat Shock Protein*); proteína receptora de plasminógeno; y proteína de organización sitio-específico de túbulos y centrosomas (57). En la Tabla 3 se hace

un resumen de la diversidad funcional de la enolasa, su rol en las enfermedades microbianas y su papel en la autoinmunidad.

Por otro lado, se ha encontrado que la enolasa además de expresarse en el citosol (catálisis) y en el núcleo (MBP-1) también lo hace a nivel de superficie celular, lo que facilitaría su función receptora del plasminógeno circulante en el medio extracelular (71). Esta unión es mediada por la interacción entre los motivos de Lisina internos o del extremo C-terminal de la enolasa con cualquiera de los dominios Kringle del plasminógeno (72). El plasminógeno mediante sus activadores (o *plasminogen activators* PA) se convierte a su forma activa, la plasmina, que es una potente Serino-proteasa involucrada en la degradación de las redes de fibrina y de la matriz extracelular (12).

Se ha demostrado que en la superficie celular la interacción entre la enolasa y el plasminógeno mejora la activación de este último a plasmina por los activadores de plasminógeno, concentra la actividad proteasa de la plasmina pericelularmente, y protege a la plasmina de la inhibición por la α 2-antiplasmina (73). De esta manera la enolasa superficial integrada al plasminógeno/plasmina se convierte en un importante factor de invasión patogénico, ya que se promueve la degradación de la matriz extracelular que protege los tejidos del hospedero, y por lo tanto se facilita la penetración del patógeno. Este mecanismo es común en varios organismos patogénicos, entre los que destacan: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Candida albicans* y *Leishmania mexicana* (21, 74, 55, 72, 75, 76, 77).

Tabla 2. Características cinéticas de enolasas de distintos organismos*. Modificado de Domingo (70).

Organismo	Isoenzimas	P. M (kDa)	A.E (U/mg)	K _m 2PGA (uM)	K _m PEP (uM)	pH óptimo
<i>Trypanosoma brucei</i>		46.5 (m, r)	63 (r)	54 (r)	244 (r)	7.7
<i>Trypanosoma cruzi</i>		50 (m)	182.1 (n)	55 (n)	147 (n)	8 - 8.5
<i>Homo sapien sapiens</i>	$\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$, $\alpha\gamma$, $\gamma\gamma$	44-46 (m); 95 (n, d)	80 - 84	30	670	6.8 - 6.9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		44 (m); 88 (n, d)	65 - 600	57 - 150	264	7.5 - 7.7
<i>Gallus gallus</i>	Cerebro	51 - 52 (m)	82.8	29		6.8 - 7.1
	Músculo	100 (n, d)	92.3 - 250	38 - 70		
<i>Rattus rattus</i>	Cerebro I	49 (m)	87	57	150	7.5
	Cerebro II	46 (m)	51	36	140	7.5
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	músculo		31	16.2	238	
<i>Cyprinus carpio</i>	músculo	49 (m); 93 (n, d)	88	313	760	6.8
<i>Sus scrofa</i>		45 (m); 90 (n, d)	67.8	330	900	6.8
<i>Candida albicans</i>		46 (m)	35	950		6.8
<i>Thermotoga maritima</i>		48 (m); 345 (n, o)	250	70		7.0 - 8.0
<i>Ricinus communis</i>	Citosol	47.9 (m)	252	61	7200	7.5
	Plastidio		197	25	2600	7.5
<i>Escherichia coli</i>		46 (m); 90 (n, d)	158	1000		8.1
<i>Clostridium difficile</i>	Citosol	50 (m); 338 (n, o)	450-890	3000		7.6
<i>Plasmodium falciparum</i>		50 (m, r)	30	41	250	7.4-7.6
<i>Streptococcus neumoniae</i>	α -enolasa	370 (r, o)	111	7500		7.5
<i>Streptococcus rattus</i>		46 (n)	980	4350		7
<i>Clonorchis sinensis</i>		49.6 (m, r)	36.5	45		7.5
<i>Schistosoma japonicum</i>		50 (m, r)	35.8	1990	530	6.5-7.0

* P.M, peso molecular; A.E, actividad enzimática específica; m, monómero; d, dímero; o, octámero; r, recombinante; n, nativo.

Tabla 3. Diferentes funciones de la Enolasa*

Diversidad Funcional	
t-cristalino	
Receptor de unión a plasminógeno	
Proteína de unión a Myc	
Proteína de estrés hipóxico	
Proteína de Choque Térmico	
Organizador sitio-específico de Centrosoma	
Rol en enfermedades microbianas	
Enfermedades bacterianas	Receptor de unión a plasminógeno en grupo A de <i>Streptococos/Neumococos</i>
Enfermedades fúngicas	Antígeno inmunodominante de <i>Candida albicans</i> , <i>candidiasis invasiva</i>
Alergias fúngicas	Respuesta IgE específica a enolasa para <i>Candida albicans</i> y <i>Aspergillus</i>
Enfermedades dentales	Mediador de caries dental en <i>S. Intermedius</i> y <i>S. mutans</i>
Cáncer /neuroológicas	Formación de tumor, metástasis (a través de la unión a plasminógeno), marcador tumoral
Autoinmunidad	
Anticuerpo anti-centrosoma	
Anticuerpos citoplasmáticos anti neutrófilos (ANCA's)	
Vasculitis	
Lupus Eritematoso Sistémico	
Nefritis	
Colitis ulcerosa	
Enfermedad de Crohn	
Colangitis esclerosante primaria	
Cirrosis biliar	
Hepatitis autoinmune	
Lupus Eritematoso discoide	
Retinopatía asociada al cáncer (apoptosis)	
Endometriosis	
Fiebre reumática aguda	
Trastorno neurológico post-estreptocócica / compulsivo obsesivo	

* Adaptado de Pancholi (57)

III.4.8. ENOLASA SUPERFICIAL EN HELMINTOS

En el caso de los helmintos la enolasa ha sido reportada a nivel de tegumento donde interacciona con su entorno. En nemátodos Jolodar *et al.* (78) reportan la enolasa del parásito *Onchocerca volvulus* a nivel de tegumento con propiedades de unión a plasminógeno, lo que facilitaría la migración de las larvas a través de los tejidos del hospedero. Por su parte Nakada *et al.* (79) determina la expresión

de la enolasa en los tres estadios de desarrollo de *Trichinella Spiralis*, a nivel muscular, además de obtenerla de manera recombinante y funcional en *E. coli*.

Con respecto a las investigaciones llevadas a cabo en los Platelmintos o gusanos planos se ha encontrado que en trematodos la enolasa se une específicamente al plasminógeno, en el caso de *Fasciola hepática* se halla en los productos de excreción y secreción (10), en *Schistosoma Bovis* la enolasa, además, mejora la activación del plasminógeno hacia plasmina (80) y ratones vacunados con enolasa recombinante de *S. Japonicum*, adquieren resistencia a Esquistosomiasis (66). En los cestodos, Du *et al.* (49) caracterizaron la enolasa recombinante de *Taenia asiática* determinando que ésta reaccionaba con suero de humanos y cerdos infectados con este parásito en un ensayo de Western Blot, y además determinaron por inmunofluorescencia la ubicación de la enolasa nativa a nivel de tegumento. Gan *et al.* (9) lograron clonar y expresar a la enolasa recombinante de *Echinococcus granulosus* en *E. coli* y encontraron que tenía un uso potencial como candidato vacunal al comparar su reactividad con sueros de pacientes con hidatidosis y normales, mediante la técnica de Western Blot, asimismo determinaron su ubicación a nivel de tegumento. Por ultimo Wang *et al.* (50), utilizaron la enolasa recombinante de *E. granulosus* para probarla en un ensayo de inmunodiagnóstico de Equinocosis quística mediante ELISA, encontrando un 81.25% de sensibilidad y un 100% de especificidad en el diagnóstico de esta enfermedad.

Cabe resaltar que en los Platelmintos la glucólisis ocurre principalmente a nivel de tegumento, por lo que las enzimas involucradas en dicho proceso metabólico, incluida la enolasa, son abundantes en dicho tejido (9).

IV. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En un país como el Perú con zonas endémicas de cisticercosis y teniasis, que abarcan toda la sierra, la costa norte y la selva alta, y donde existe una alta prevalencia de la neurocisticercosis (4), la investigación aplicada al tratamiento, prevención y diagnóstico de esta enfermedad es de suma importancia.

El conocimiento de las características y del comportamiento bioquímico de la enolasa recombinante de *T. solium* abre las puertas para su utilización en diversos fines, que pueden ser meramente académicos o aplicativos, como por ejemplo utilizarla de candidato vacunal de cisticercosis porcina, interfiriendo de esta manera con el ciclo de vida del parásito; o como blanco terapéutico de drogas antiparasitarias específicas, mejorando así su tratamiento.

Adicionalmente, la implementación con herramientas de inmunodiagnóstico como los antígenos recombinantes podrían ayudar a mejorar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de neurocisticercosis, incluso en los casos de quiste único o quistes calcificados, brindando una alternativa práctica, reproducible y económica para la detección de esta enfermedad en comparación con las pruebas de diagnóstico existentes. De esta manera se beneficiarían aquellos sectores de bajos recursos donde el acceso a una prueba definitiva como la tomografía axial computarizada (TAC) y/o resonancia magnética nuclear (RMN) es bastante restringido.

En consecuencia, el estudio de la enolasa recombinante de *T. solium* en los aspectos antes mencionados es justificable.

V. OBJETIVOS

V.1. GENERAL

- Obtener una enolasa recombinante de *T. solium*, caracterizarla enzimáticamente, y evaluarla en el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis humana.

V.2. ESPECÍFICOS

- Expresar en *E. coli*. a la enolasa recombinante de *T. solium*.
- Medir la actividad enzimática y parámetros cinéticos de la enolasa recombinante de *T. solium*.
- Evaluar a la enolasa recombinante de *T. solium* como antígeno de inmunodiagnóstico de neurocisticercosis de humana y determinar su inmunogenicidad en conejo.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio es del tipo experimental, cuya variable independiente vendría a ser la enolasa recombinante de *T. solium* y en función a ésta cuenta con un diseño simple. Las variables dependientes son la actividad enzimática, la inmunogenicidad y el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis, de manera que el estudio cuenta con un diseño de medias repetidas en base a estas variables.

Por otro lado, la metodología es cuantitativa para unos ensayos y cualitativa para otros ya que describe, compara y analiza los resultados a partir de la observación, cuantificación y categorización de las variables en el grupo de estudio.

VI.2. MUESTRA

VI.2.1. CISTICERCOS DE *T. solium*

Los cisticercos de *T. solium* se aislaron a partir de un solo cerdo (*Sus scrofa*) infestado con cisticercosis proveniente del departamento de Huancayo y fueron proporcionados por El Grupo de Cisticercosis del Perú. Se seleccionaron dos cisticercos que sirvieron de fuente para la extracción del mRNA a partir del cual se obtuvo la enolasa recombinante de *T. solium*.

VI.2.2. SUEROS DE CONEJO

Se tomaron muestras de sueros de 2 conejos hembra (*Orhyctolagus cuniculus*) de la raza *New Zealand White*, previo al proceso de inmunización y luego de las inmunizaciones con la enolasa recombinante de *T. solium*, para evaluar su capacidad inmunogénica por Western Blot y ELISA.

VI.2.3. SUEROS HUMANOS

La muestra de sueros de pacientes peruanos positivos y negativos para neurocisticercosis (confirmados por LLGP-EITB) fueron donados por el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) a través del Grupo de Neurocisticercosis del Perú. Dichos sueros se utilizaron para evaluar la capacidad inmunodiagnóstica de la enolasa recombinante de *T. solium* por Western Blot. Adicionalmente se trabajó con 2 sueros controles europeos. El total la muestra fue de 20 sueros humanos.

VI.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 4. Operacionalización de variables.

Tipo de variables	Variables	Indicadores	Unidades o categorías	Tipo de variables
Independiente	Enolasa recombinante de <i>T. solium</i> (rEnoTs)	Concentración de la proteína	mg/mL	Cuantitativa continua
Dependientes	Caracterización enzimática	Actividad enzimática específica	U/mg	Cuantitativa continua
		Constante de afinidad (Km)	mM (PGA)	Cuantitativa continua
		Velocidad máxima (Vmax)	mM (PEP)/min	Cuantitativa continua
	Ensayo de inmunogenicidad por Western Blot	Reconocimiento de rEnoTs por los sueros de conejo pre y post inmune	Si reconoce (banda) No reconoce (no banda)	Cualitativa nominal
Inmunodiagnóstico de NCC humana por Western Blot	Reconocimiento de rEnoTs por los sueros de pacientes positivos y negativos para NCC	Positivo (banda) Negativo (no banda)	Cualitativa nominal	

VI.4. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

VI.4.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ENOLASA DE *T. solium*

VI.4.1.1. Identificación del gen anotado de enolasa de *T. solium*

Se analizó la secuencia de la enolasa de *T. solium* anotada por nuestro equipo de bioinformática, determinándose el marco de lectura abierto y las secuencias intrónicas y exónicas del gen de enolasa. Esta secuencia se subió a la base de datos GenBank con el código de acceso número KX906690.

Para determinar a qué subtipo pertenecía nuestra secuencia anotada se realizó un alineamiento, mediante Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), de la secuencia aminoacídica de nuestra enolasa y de las enolasas humanas ENO1, ENO2 y ENO3 del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Adicionalmente, se le comparó con las enolasas anotadas de *T. solium* del GeneDB (<http://www.genedb.org>).

VI.4.1.2. Alineamiento de las enolasas de tenia, cerdo y humano

Con el objetivo de comparar el grado de conservación entre la enolasa de *T. solium* con las de su hospedero intermediario (*Sus scrofa*) y su hospedero definitivo (*homo sapiens*), se realizó un alineamiento múltiple con la ayuda del programa Clustal W 2.1 de las secuencias aminoacídicas de las enolasas alfa de *T. solium*, *Sus scrofa* (cerdo) y *homo sapiens* (hombre). Asimismo, se halló el porcentaje de identidad entre ellas.

VI.4.1.3. Análisis filogenético de la enolasa de *T. solium*

Se realizó un análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la enolasa de *T. solium* (que sirvió de molde para obtener rEnoTs), comparándola con enolasas de distintos organismos. Con este fin se utilizó el método filogenético *Maximum Likelihood* (81), que es un método estadístico basado en modelos de evolución molecular a partir del cual se busca conseguir el mejor árbol filogenético que explique la matriz de caracteres homólogos (secuencias aminoacídicas). Para el alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas se utilizó el programa Clustal W 2.1 y para la construcción de árbol filogenético el programa MEGA v6 (www.megasoftware.net).

VI.4.1.4. Diseño de iniciadores para el gen de la enolasa de *T. solium*

Los iniciadores *Forward* y *Reverse* para el gen maduro de la enolasa de *T. solium* anotado por nuestro equipo se diseñaron a partir secuencias extremas del gen, utilizando el programa *Geneious 4.84*, siguiendo los cuidados necesarios para optimizar su especificidad, es decir, un contenido de GC entre el 40 a 60%, extremo 3' con guanina (G), temperatura de *melting* (T_m) similar entre los iniciadores y superior a los 55°C; y evitando en lo posible hibridaciones del tipo horquilla, auto-dímeros y dímeros de ambos iniciadores, repeticiones excesivas de nucleótidos y dinucleótidos, entre otros parámetros.

VI.4.1.5. Análisis de secuencia de rEnoTs

Las secuencias nucleotídicas de las rEnoTs clonadas en el vector pET28a (secuenciadas en MACROGEN) fueron analizadas y comparadas con sus electroferogramas respectivos para su curación. Estas secuencias además se tradujeron *in silico* con ayuda de la herramienta "*Translate Tool*" del servidor

ExPASy (<http://www.expasy.org/>), en base al código genético más frecuente de los eucariontes, lo que sirvió para detectar las mutaciones.

VI.4.1.6. Predicción de las características de rEnoTs

Las principales características de la secuencia aminoacídica de la rEnoTs como el peso molecular, el punto isoeléctrico y la estabilidad de rEnoTs se predijeron con ProtParam del servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>). Por su parte, los dominios funcionales y sitios claves de la secuencia de rEnoTs se exploraron con el software InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/interproscan.html>), PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) y MEME (<http://meme-suite.org/>).

VI.4.1.7. Predicción de estructura tridimensional (3D) de rEnoTs

La predicción de la estructura 3D de rEnoTs se hizo en base al modelamiento por homología de su secuencia aminoacídica. Para ello se utilizó la herramienta SWISS MODEL (modo automático) del servidor ExPASy. Este procedimiento se realizó con la finalidad de encontrar la estructura 3D más adecuada para rEnoTs a partir de la topología de proteínas cristalizadas y disponibles en el “*Protein Data Bank*” (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

VI.4.1.8. Evaluación *in silico* de la rEnoTs mutante

Las mutaciones en la secuencia de la enolasa han demostrado ser importantes y determinantes para la conservación de su actividad enzimática. Se ha demostrado por cristalografía y ensayos enzimáticos que la mutación de un solo residuo puede causar la pérdida por completo de la actividad enzimática si este se encuentra en el sitio activo o participa en el movimiento catalítico (57). Con la finalidad de

determinar si las mutaciones generadas en la enolasa recombinante de *T. solium* afectaban de manera determinante a su estructura 3D o si es que interferían con su sitio activo, se evaluó *in silico* las mutaciones generadas en rEnoTs explorando las variaciones estructurales de rEnoTs generadas por el cambio de residuo mediante el programa Swiss-PdbViewer 4.1.0 del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) (<http://spdbv.vital-it.ch/disclaim.html>).

VI.4.1.9. Predicción de regiones transmembrana en rEnoTs

Según la literatura la enolasa no es una proteína de membrana por carecer de los motivos característicos transmembrana (12). Para corroborar este dato en la rEnoTs se realizó la predicción de las regiones transmembrana de su secuencia aminoacídica mediante 2 servidores distintos:

- TMpred, predicción de Hélices transmembrana y su orientación (http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html).
- TopPred 1.10, predicción de la topología de proteínas de membrana en base al análisis de hidrofobicidad y de la regla de residuos positivos (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>).

VI.4.1.10. Predicción de señal de secreción en rEnoTs

Del mismo modo se desconoce el mecanismo por el cual la enolasa es transportada hacia la superficie celular ya que carece de péptido señal. Con la finalidad de determinar si rEnoTs cuenta con una señal de secreción se utilizó el servidor SignalP 4.1 del “*Center for Biological Sequence analysis*” (CBS) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), que predice la presencia y localización del sitio de clivaje del péptido señal en las secuencias aminoacídicas. Este método

de predicción tiene como base una combinación de muchas redes neuronales artificiales.

VI.4.1.11. Predicción de epítopes de células B en rEnoTs

La predicción de epítopes de células B a partir de la secuencia aminoacídica de la enolasa se realizó utilizando dos programas disponibles en la página web del CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>):

- BepiPred 1.0 Server, para la predicción de epítopes lineales de células B, el cual usa una combinación del modelo oculto de Markov y propensión.
- DiscoTope 2.0 Server, para la predicción de epítopes conformacionales de células B en base a la estructura tridimensional de la proteína. El método utiliza un cálculo de la accesibilidad de superficie y una puntuación de la tendencia epitópica de los aminoácidos.

VI.4.2. OBTENCIÓN DE LA ENOLASA RECOMBINANTE DE *T. solium*

VI.4.2.1. Extracción de mRNA a partir de cisticercos

Los cisticercos de *T. solium* habían sido extraídos por disección del tejido muscular, lavados tres veces con buffer PBS, y almacenados en solución RNAlater® (ThermoFisher Scientific) a 4°C por 24 horas y luego a -70°C hasta su utilización.

Una vez descongelados los cisticercos, la extracción de su RNA se realizó individualmente cada uno de ellos, mediante el método de extracción del Tiocianato de guanidina-Fenol-Cloroformo (82), adaptado por Life Technologies™ con la utilización del reactivo TRIzol®. El protocolo de

extracción de RNA usando TRIzol[®] (Life Technologies[™]) se describe a continuación:

1. En primer lugar se añadió 1mL del reactivo TRIzol[®] en el tubo de centrifuga que contenía al cisticerco (de aproximadamente 5 mm de diámetro) y se procedió con la homogenización mediante el homogeneizador de energía Omni Tip[™]. Se dejó reposar a temperatura de ambiente por 5 minutos.
2. Se añadió 0.2 mL de cloroformo (100%), y se agito vigorosamente por 20 segundos. Se dejó reposar a temperatura de ambiente por espacio de 3 minutos.
3. Se centrifugó a 12 000 x gravedades (g) por 15 minutos a 4°C.
4. En la fase acuosa resultante o sobrenadante se encuentra el ARN. Se extrajo la fase acuosa y se trasvaso a un tubo nuevo donde se le agregó 0.5 mL de Isopropanol (puro). Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se homogenizó suavemente y se centrifugó a 12 000 x g por 10 minutos a 4°C.
6. En este punto el RNA precipitó. Se descartó el sobrenadante.
7. Se agregó 0.5 mL de Etanol al 75% para lavar. Se centrifugó a 7 500 x g por 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
8. Se dejó secar al ambiente el pellet de RNA por 10 minutos y se resuspendió en 0.1 mL de agua libre de nucleasas, se homogenizó mediante pipeteo e incubó por 10 minutos a 55°C en baño maría, luego de

lo cual se almaceno a -70°C . Se determinó su concentración en el NanoDrop™ (Thermo Scientific).

VI.4.2.2. Clonación del gen de enolasa de *T. solium*

Retrotranscripción del transcriptoma del cisticerco de *T. solium*

Se realizó la retrotranscripción del mRNA total extraído (transcriptoma) de los cisticercos mediante PCR reverso (RT-PCR), utilizándose para ello el iniciador universal de mRNA, Oligo (dT)₁₂₋₁₈. Este iniciador consiste en polinucleótidos de 12 a 18 bases de timina complementarios a la terminación poliadenilada presente en el extremo 3' del mRNA de los organismos eucariotas. Los componentes de la reacción RT-PCR así como sus volúmenes se detallan a continuación:

Componente	Volumen (uL)	[Final]
RNAsa <i>Free Water</i>	1	-
Buffer Retrotranscriptasa 10X	1	1X
MgCl ₂ 25 mM	2.2	5.5 mM
dNTPs 10 mM	2	2 mM
<i>Random Hexamers</i> 50uM	0.5	2.5 uM
RNAsa Inhibidor	0.2	0.4 U/uL
Retrotranscriptasa	0.6	3 U/uL
RNA (60 ng/uL)	2.5	15 ng/uL
Total	10	

El ciclaje en el termociclador para el RT-PCR fue el siguiente:

Paso	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
1	10	25
2	30	48
3	5	95
4	5	5
Total	50	

Amplificación del gen maduro de la enolasa de *T. solium*

Del cDNA (monocatenario), producido a partir del transcriptoma del cisticerco de *T. solium*, se amplificó el gen maduro de la enolasa (bicatenario) mediante PCR. Para tal fin se utilizaron los iniciadores *Forward* y *Reverse* previamente diseñados para el gen de la enolasa de *T. solium*. La reacción de PCR utilizando una DNA polimerasa convencional [*Thermus aquaticus* (*Taq*) polimerasa] se detalla a continuación:

Componente	Volumen (uL)	[Final]
Agua libre de nucleasas	7.9	
<i>Taq</i> Buffer 10X	2	1X
MgCl ₂ 25 mM	2	2.5 mM
DMSO	2	-
dNTPs Mixtos 10 mM	2	2 mM
<i>Forward</i> Eno 10 uM	1	0.5 uM
<i>Reverse</i> Eno 10 uM	1	0.5 uM
<i>Taq</i> Polimerasa	0.1	3 U/uL
cDNA (20 ng/uL)	2	2 ng/uL
Total	20	

El ciclaje en el termociclador fue el siguiente:

Paso	Temperatura (C°)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	4	1
Desnaturalización	94	0.5	35
<i>Annealing</i> óptimo	55	1	
Extensión	72	1.5	
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	∞	1

Alternativamente, se utilizó una DNA polimerasa de alta fidelidad “*Phusion Flash* II DNA *Polymerase*” con actividad de corrección (Thermo Scientific). La reacción fue:

Componente	Volumen (uL)	[Final]
Agua libre de nucleasas	6	
2X <i>Phusion Flash PCR Master Mix</i> *	10	1X
<i>Forward</i> Eno 10 uM	1	0.5 uM
<i>Reverse</i> Eno 10 uM	1	0.5 uM
cDNA (20 ng/uL)	2	2 ng/uL
Total	20	

(Contiene DNA polimerasa *Phusion Flash II*)*

El ciclaje óptimo para esta polimerasa fue el siguiente:

Paso	Temperatura (C°)	Tiempo (seg)	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	10	1
Desnaturalización	98	1	30
<i>Annealing</i>	55	5	
Extensión	72	29	
Extensión final	72	60	1
Mantenimiento	4	∞	1

Electroforesis y purificación de los amplicones de enolasa

Con el objetivo de comprobar el tamaño correcto de los amplicón de la enolasa se realizó una electroforesis horizontal de estos productos. Se prepararon geles de agarosa al 0.8% con Bromuro de Etidio (100 mL Buffer TAE 1X + 0.8 gr agarosa + 16 uL BrEt) en los cuales se cargaron los amplicones de enolasa resuspendidos en Buffer de carga (Azul de Bromofenol con Sucrosa) y se corrieron en una cámara electroforética con Buffer TAE 1X (Promega) a 90 Voltios por espacio de 45 minutos.

Los amplicones se purificaron con “QIAquick PCR *Purification Kit*” (QIAGEN), obteniéndose éstos a una concentración de 155 ng/uL (NanoDrop™).

Digestión del gen de enolasa y del plásmido pET28a

El amplicón de la enolasa codante y el plásmido pET-28a(+) (Figura 9) se digirieron con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* (New England Biolabs[®], NEB) a 37°C por tres horas para producir extremos cohesivos en ambos, mediante la reacción:

Componente	Volumen (uL)
Amplicón enolasa (155 ng/uL)	18
10X Buffer 3 NEB	12
100X BSA	6
<i>NcoI</i> (10 U/uL)	2.5
<i>XhoI</i> (10 U/uL)	2.5
H ₂ O	79
Total	120

Componente	Volumen (uL)
pET-28a(+) (2 ug/uL)	5
10X Buffer 3 NEB	6
100X BSA	3
<i>NcoI</i> (10 U/uL)	1.5
<i>XhoI</i> (10 U/uL)	1.5
H ₂ O	43
Total	60

Una vez digeridos el amplicón de la enolasa y el plásmido pEt-28a(+) se corrieron electroforéticamente en geles de agarosa 1% y se purificaron con el “QIAEX II Gel Extraction Kit” (QIAGEN) y se cuantificaron en NanoDropTM.

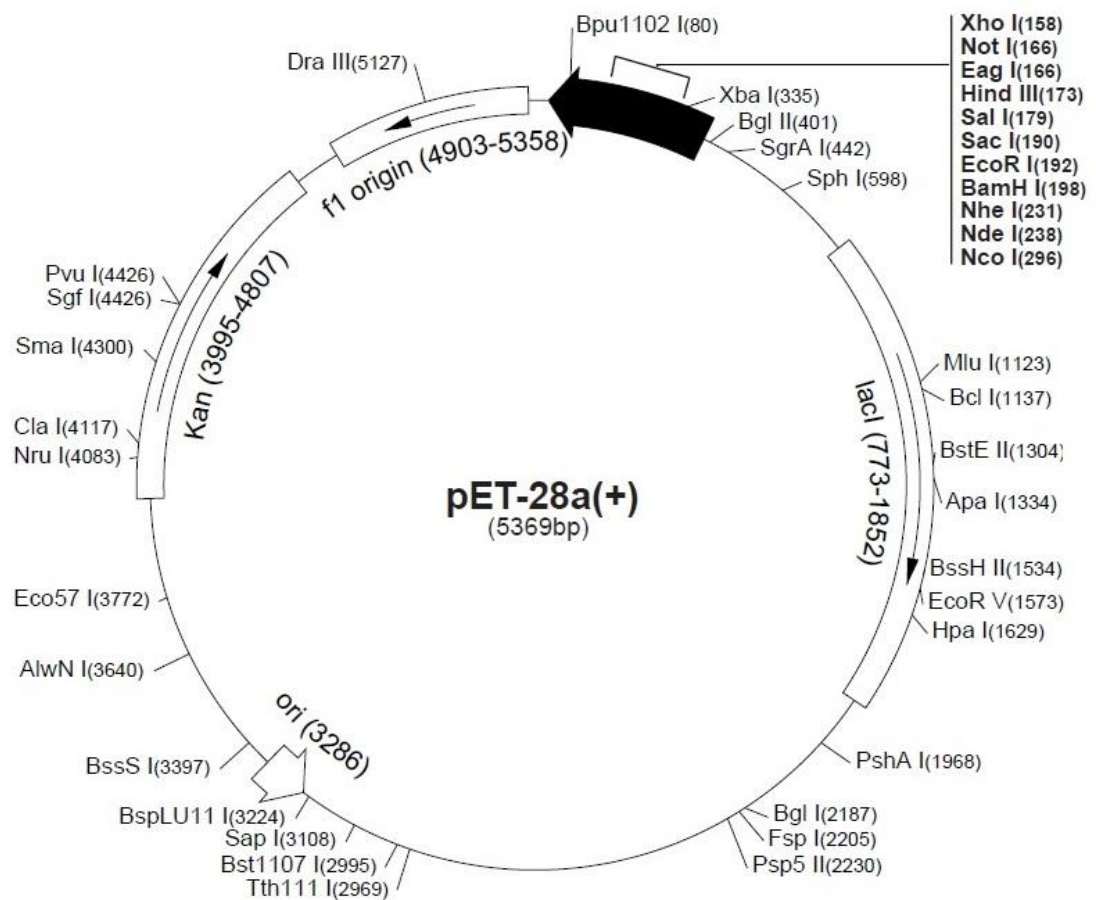


Figura 9. Mapa del plásmido pET-28a (+)

Ligación del gen de enolasa en el plásmido pET-28a(+)

La ligación del amplicón de la enolasa y el plásmido pEt-28a(+) digeridos se realizaron con una Ligasa comercial (NEB). Se realizaron distintas reacciones con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de ligación. Estas se detallan en el siguiente recuadro:

Ligación	Volumen (uL)			
	L1	L2	L3	L4
Proporción Enolasa : pET-28a(+)	1:3	1:3	1:6	1:3
pET-28a(+) (40ng/uL)	1	1.5	0.5	2
Enolasa (40ng/uL)	3	4.5	3	6
Buffer Ligasa10X	1	1	1	2
Ligasa 400 U/uL	0.5	0.5	0.5	1
Agua	4.5	2.5	5	9
Total	10	10	10	20

La reacción de ligación se dejó por espacio de 18 horas (*overnight*) a 16°C.

Transformación y clonación del plásmido pET-28a+EnoTs

El gen de la enolasa de *T. solium* ligado al pET-28a (+), desde ahora pET-28a+EnoTs, se introdujo por *shock* térmico, intercalando temperaturas de 0 y 42°C, a células competentes de *E. coli* cepa NovaBlue (transformación) con la finalidad de reproducirlo (clonamiento). Luego, dichas células transformantes se sembraron en placas de agar Luria-Bertani (LB) con Kanamicina (antibiótico de selección), esparciéndolas uniformemente y se dejaron incubando a 37°C por 20 horas. En la Figura 10 se muestra el esquema básico que se siguió para la clonación del gen de la enolasa de *T. solium*.

Esquema de clonación del gen de la enolasa de *T. solium* en *E. coli*

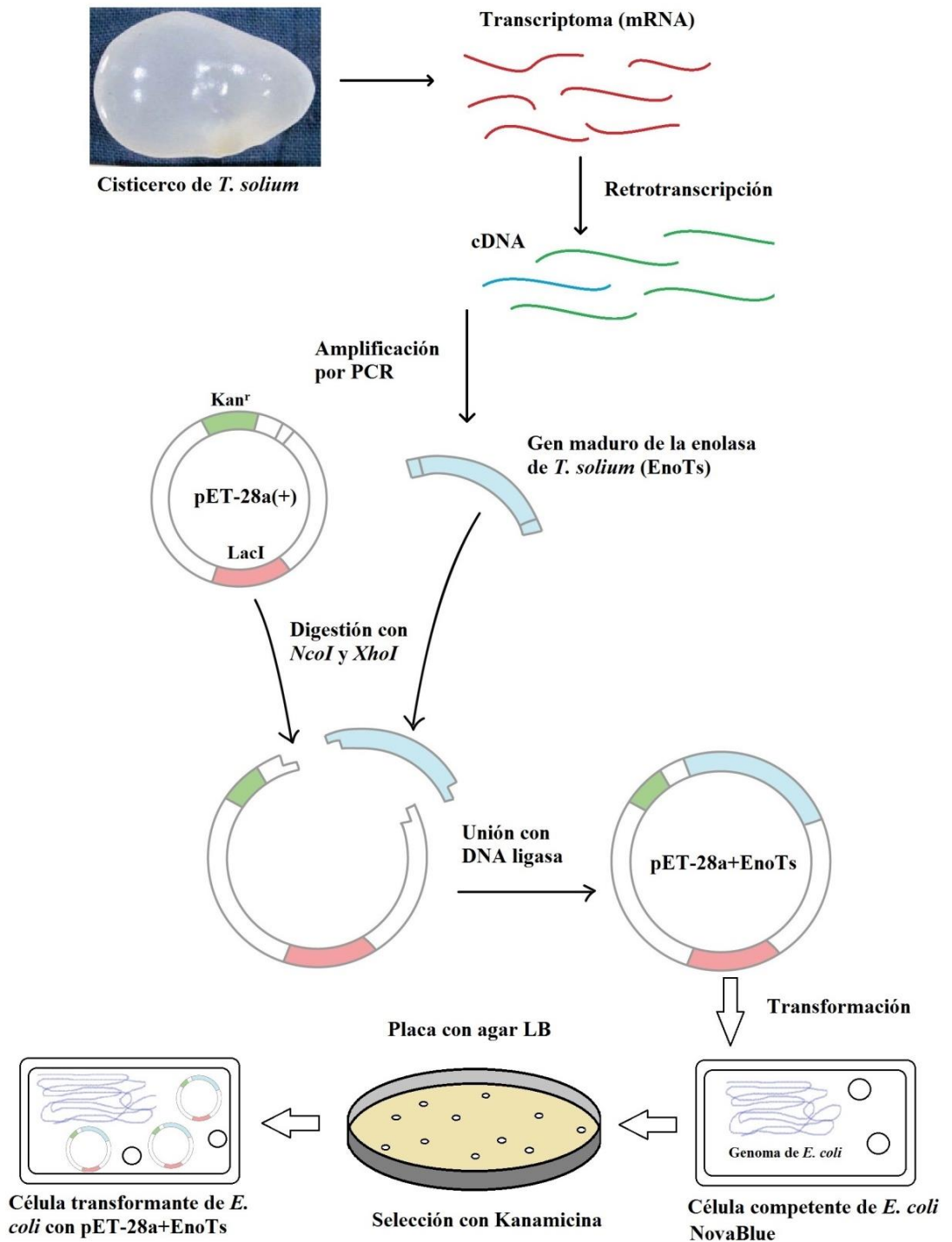


Figura 10. Esquema de la clonación del gen de la enolasa de *T. solium* en *E. coli*.

PCR colonia

Luego de la incubación *overnight* se observó crecimiento de colonias en las placas LB agar + kanamicina (ver resultados), lo cual significó que aquellas colonias tenían el plásmido con la enolasa insertada en él (pET-28a+EnoTs) o solo el pET-28a(+), que les confieren resistencia a Kanamicina. Para comprobar que dichas colonias transformantes tenían el inserto correcto (pET-28a+EnoTs) se realizó un PCR colonia, el cual consistió en tomar un segmento de colonia transformante mediante un asa de siembra, colocarla dentro de un microtubo para PCR que contenía todos los aditivos para la amplificación de la enolasa (Master mix) y finalmente se procedió con la reacción siguiendo las condiciones descritas previamente para el PCR con *Taq* polimerasa.

Comprobación de los plásmidos recombinantes pET-28a+EnoTs correctos

Para corroborar la inserción correcta del gen de enolasa en el vector pET-28a(+), se procedió con la extracción de plásmidos de aquellas colonias PCR positivas del paso anterior con el kit “Ultra High Isolation Plasmid” (Roche). Una vez extraídos los plásmidos se realizó la digestión de éstos con las enzimas *XhoI* y *NcoI*. Finalmente se realizó una electroforesis de los productos de digestión en un gel de agarosa al 1% a 90V por 1 hora. Aquellos plásmidos pET-28a+EnoTs que resultaron con una correcta inserción del gen se secuenciaron (MACROGEN, Corea), con la finalidad de comprobar la fidelidad y/o mutaciones en la secuencia de enolasa de *T. solium*.

VI.4.2.3. Expresión y purificación de la enolasa recombinante de *T. solium*

Luego de comprobar la inserción y correcta orientación del gen de la enolasa de *T. solium* en el pET28a(+) se descongelaron los plásmidos pET-28a+EnoTs con la finalidad de introducirlos en las células de expresión *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* RosettaTM (DE3) pLysS (Novagen) siguiendo el protocolo propuesto por Gan *et al.* (2010). Estos sistemas de expresión bacteriana (DE3) contienen una copia cromosomal del gen de la RNA polimerasa T7 que está bajo el control del promotor *lacUV5* y por lo tanto su expresión es inducible por el Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). La cepa RosettaTM es un derivado de BL21 que ha sido diseñada para la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados por *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) y por lo tanto se convierte en un sistema de expresión universal. Además la cepa RosettaTM contiene el plásmido pLysS que codifica la Lisozima T7, cuya función es suprimir la expresión basal de la RNA polimerasa T7 previa a la inducción con IPTG, y por lo tanto estabiliza las proteínas recombinantes codificadas en los vectores del tipo pET que pudieran afectar la viabilidad y crecimiento celular (Novagen[®] *Competent Cells*).

Transformación de células competentes *E. coli* cepas BL21 y Rosetta con los plásmidos recombinantes pET-28a+EnoTs

Los plásmidos pET-28a+EnoTs correctamente orientados se transformaron en cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y RosettaTM (DE3) pLysS competentes (preparadas previamente con CaCl₂) mediante *shock* térmico. Luego éstas se sembraron en placas agar LB + Kanamicina y se dejaron crecer por 18 horas a 37 °C.

Expresión de la enolasa recombinante de *T. solium*

Se seleccionaron colonias Rosetta™ (DE3) pLysS transformadas con los plásmidos pET-28a+EnoTs y se les hizo un repique en 2 ml de caldo LB + Kanamicina (Kan), el cual se dejó creciendo *overnight* a 37°C. Al día siguiente se añadió IPTG, a una concentración final de 1mM, para inducir la expresión de la enolasa por dos horas, puesto que el plásmido pET28a(+) posee una región operadora *lac* próxima al promotor T7 (Figura 9). Para comprobar la expresión de la enolasa en dicho cultivo se procedió con la lisis celular por calor, es decir calentando el cultivo bacteriano a 110°C en un Thermoblock. Luego al producto se le añadió el buffer de carga para electroforesis de proteínas “Sample 2x” (Tris-HCl 0.12 M pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, Azul de Bromofenol 0.25%) + Dithiothreitol (DTT), el cual es un agente desnaturalante de proteínas que rompe los puentes disulfuro, y se les realizó una electroforesis desnaturalante en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE 12%) por espacio de 90 minutos a 180V. Asimismo se corrieron como controles negativos cultivos sin inducir.

Una vez comprobada la expresión de la enolasa recombinante de *T. solium* en pequeña escala se realizó la expresión en una escala mayor, el procedimiento fue similar, es decir, se picó una colonia de *E. coli* Rosetta (que había crecido en placa agar LB + Kan) y se le depositó en un tubo con 10 ml de caldo LB + Kan y se dejó crecer *overnight* a 37°C con agitación de 250 revoluciones por minuto (rpm). Al día siguiente se vertió el contenido del tubo en un matraz con 500 mL de caldo LB + Kan y se dejó creciendo el cultivo bacteriano a 37°C y 250 rpm por aproximadamente 3 horas hasta que su densidad óptica (OD) estuvo entre 0.6 y

0.8 (fase de crecimiento exponencial), momento en que se agregó IPTG en una concentración final de 1mM para inducir la expresión de la enolasa recombinante por espacio de 4 horas en las mismas condiciones previas. Transcurrido este tiempo se centrifugó el cultivo a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió al pellet, que contenía las bacterias del cultivo, en “Binding Buffer” pH 7.4 (Fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM). Finalmente esta suspensión se almacenó en tubos cónicos de 50 mL a – 70°C.

Recuperación de las fracciones celulares de expresión soluble e insoluble.

Luego de la expresión de la enolasa en 500 mL de cultivo bacteriano se procedió con la sonicación de las células de *E. coli* que la expresaron para romperlas y determinar si la expresión de la enolasa recombinante de *T. solium* se daba a nivel de citoplasma (fracción celular soluble) y/o a nivel de membranas (fracción celular insoluble).

Se realizaron tres choques térmicos de las células de *E. coli* resuspendidas en “Binding Buffer”, intercalando temperaturas de -70°C y 37°C. Luego las células se sonicaron sobre hielo en el SONICATOR[®], utilizándose un microtip de punta gruesa y siguiendo un programa de pulsos ultrasónicos de un segundo de duración por uno de descanso por 60 veces, repitiéndose este programa 3 veces con intervalos de descanso de 2 minutos. Finalizado este procedimiento se centrifugó la muestra sonicada a 12 500 rpm a 4°C por espacio de 20 minutos para separar las fracciones celulares soluble e insoluble. El sobrenadante que contenía la fracción de expresión soluble se trasvaso a un nuevo recipiente y dependiendo de su uso se colocó sobre hielo o se guardó a -20°C, mientras la fracción de

expresión insoluble se resuspendió en “Buffer A” pH 7.4 (Fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM, Urea 8M) y se almaceno a -70°C.

Posteriormente se realizó un SDS PAGE 12% de las fracciones de expresión solubles e insolubles, utilizando como control negativo un extracto celular de *E. coli* Rosetta transformante de pET-28a+EnoTs pero no inducida con IPTG, para determinar en cuál de ellas se daba la mayor expresión de la enolasa de *T. solium*.

Purificación de la enolasa recombinante mediante Cromatografía de afinidad

Una vez que se determinó la expresión de rEnoTs principalmente a nivel de citoplasma de *E. coli* (fracción celular soluble) se procedió con su purificación mediante una cromatografía de afinidad a Níquel, debido a que rEnoTs contiene en su extremo C-terminal una cola de 6 Histidinas (aportado por el pET28a+). El principio de esta técnica descansa en la alta afinidad de los anillos de imidazol de la Histidina por el catión Ni^{2+} que se encuentra unido a la Sefarosa de la matriz de la columna por medio del agente quelante ácido iminodiacético (IDA) (Figura 11). De esta manera cuando las proteínas recombinantes (6X His) pasan a través de la columna de afinidad quedarán atrapadas por su interacción con el Ni^{2+} , pudiendo ser recuperadas posteriormente mediante elución con un Buffer Imidazol que compita con la interacción Ni^{2+} - His (83).

Con este propósito, se montó el sistema de purificación por cromatografía líquida de baja presión BioLogic™ LP System (BIORAD), el cual consistía básicamente en un soporte para los Buffers de elución y muestra, una columna de afinidad de Sefarosa- Ni^{2+} de 5 mL (HiTrap™, GE Healthcare Life Sciences), un detector UV de alta sensibilidad para los picos proteicos (280 nm), una bomba peristáltica, un

sistema de mangueras, un sistema colector de las fracciones, y una PC anexa con un software (BioLogic LP Data View™ Software) para el registro de los cromatogramas.

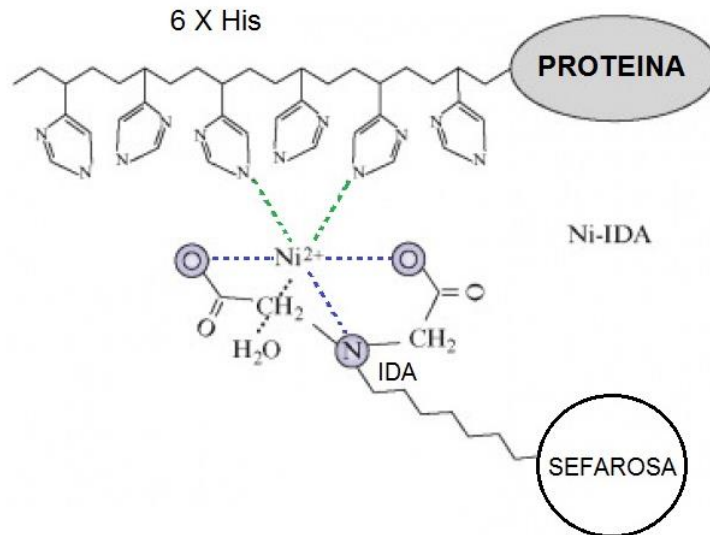


Figura 11. Interacción entre el Ni^{2+} de la columna de afinidad y la cola de Histidina de rEnoTs.

La fracción celular soluble que contenía la mayor cantidad de rEnoTs expresada se filtró (diámetro de poro $0.45 \mu\text{m}$; Millipore Corporation, Bedford, USA) y se pasó a través de la columna de Sefarosa- Ni^{2+} previamente equilibrada con el Binding Buffer. Luego se pasó 75 mL de Buffer Fosfato Imidazol 20 mM pH 7.4 por la columna para lavarla de las proteínas no específicas que no se le habían unido. El siguiente paso consistió en eluir gradualmente la rEnoTs unida a la columna, mediante el paso de Buffers fosfato sódico 20mM pH 7.4, NaCl 0.5 M con concentraciones crecientes de imidazol, que fueron desde los 40 a 500mM. De esta manera se recuperó la enolasa recombinante en distintas fracciones de

purificación que se colectaron en tubos de vidrio de 5 mL de capacidad. El Cromatograma mostrando las absorbancias de los picos proteicos y sus conductividades eléctricas en el tiempo (de acuerdo a las fracciones) quedo registrado en el ordenador gracias al software BioLogic LP Data View™. Posteriormente se realizó un SDS PAGE 12% de las fracciones colectadas para comprobar la presencia de rENoTs así como su grado de pureza.

Concentración de la enolasa recombinante de *T. solium*

Las fracciones de purificación colectadas y comprobadas por SDS PAGE 12% se juntaron en una celda de ultrafiltración Amicon® (Millipore Corporation, Bedford, USA) con el propósito de concentrar la rEnoTs. El volumen total de las fracciones juntas en el Amicon® fue de aproximadamente 30 mL el cual se completó hasta los 50 mL (máxima capacidad de la celda) con Buffer PBS pH 7.4 (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM). Luego se procedió con la concentración, se cerró la celda y por presión gaseosa de N₂ se forzó la filtración de la solución a través de una membrana cuyo tamaño de poro era de 10 kDa, de manera que rEnoTs (47 kDa) permaneció dentro de la celda. Se concentró hasta que el volumen de la solución fue de 10 mL y se volvió a repetir el procedimiento. Finalmente se obtuvo 10 mL de solución de rEnoTs concentrada en Buffer PBS pH 7.4, con aproximadamente 2.5 mM imidazol, la cual se almaceno a 4°C y -20°C.

Cuantificación de la enolasa recombinante de *T. solium* concentrada

Para cuantificar la enolasa recombinante de *T. solium* expresada y concentrada en los pasos previos, se utilizó el método colorimétrico de Bradford (84). Con este

objetivo, a partir de un stock de BSA de 10 mg/mL se prepararon las diluciones estándares de 100, 80, 40, 20, 10 y 5 µg/mL en Buffer PBS pH 7.4 para la curva estándar de calibración. Del mismo modo se hicieron diluciones de 1:5, 1:10 y 1:20 de la rEnoTs concentrada para su cuantificación. Luego se cargó 20 uL de estas diluciones + 200 uL del reactivo Bradford 1X (BioRad) en diferentes pocillos de una placa óptica para realizar la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm y medir así el cambio de absorbancia con respecto al blanco (Buffer PBS pH 7.4).

VI.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs

VI.4.3.1. Condiciones óptimas de almacenamiento de rEnoTs

Como paso previo a la caracterización enzimática se evaluaron diferentes condiciones de almacenamiento a corto plazo de rEnoTs purificada y concentrada. Estas condiciones fueron a evaluadas en un periodo de tiempo de 45 días, siendo en total cuatro mediciones (intervalos de 15 días entre una y otra). Entre las variables de almacenamiento estuvieron: la temperatura (4, -20 y -70°C), la composición del Buffer (Tris-HCl o PBS) y el proceso de eliminación de imidazol del cual derivaba rEnoTs (ultrafiltración Amicon[®] o diálisis). En cada condición de almacenamiento se midió la concentración a lo largo del tiempo de análisis.

VI.4.3.2. Ensayo de la actividad enzimática de rEnoTs

La actividad catalítica de la enolasa consiste en transformar el 2-Fosfoglicerato (2-PGA) hacia Fosfoenolpiruvato (PEP) y viceversa ($\Delta G = 1.1$ kJ/mol), desprendiéndose una molécula de agua en la reacción (85).

La actividad enzimática de rEnoTs se realizó por el método espectrofotométrico (51) en el sentido de conversión de 2-PGA a PEP, puesto que el 2-PGA fue el sustrato de la reacción. Por lo tanto se midió la producción de PEP traducido como el incremento de la absorbancia a 240 nm en el espectrofotómetro.

Contenido de la reacción enzimática

El contenido final de la solución de la reacción enzimática fue Tris-HCl 50 mM pH 7.15; MgSO₄ (o MgCl₂) 10 mM, KCl 200 mM y 2-PGA 1mM, siguiendo protocolos previamente establecidos (86, 87). En el momento previo a la medición de la actividad enzimática se añadió 500 ng de rEnoTs (en buffer PBS pH 7.4). El volumen final de la reacción fue de 1 mL y se llevó a cabo a temperatura ambiente (21 °C) en una cubeta de cuarzo, adecuada para lecturas UV.

Lectura en espectrofotómetro

Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 240 nm (tomando en cuenta el incremento de la absorbancia) en intervalos de 10 segundos y por espacio de 10 minutos. En el control negativo o blanco se añadió 0.1 mL de PBS pH 7.4 en lugar de la solución de rEnoTs, mientras que para el control positivo se utilizó la enolasa comercial (Sigma-Aldrich®) de levadura (*S. cerevisiae*). Se registraron los datos de absorbancia por duplicado y se utilizó el promedio de éstos para los cálculos posteriores.

Por la ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot C \cdot L$ (88); donde A es absorbancia; ϵ , el coeficiente de extinción molar del PEP ($\epsilon_{\text{PEP}} = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y L, la longitud de 1 cm de la cubeta de cuarzo; se determinó la concentración (C) del PEP formado (51, 86). En base al $\Delta [\text{PEP}]$ vs Δ Tiempo fue posible hallar la velocidad de la

reacción, que nos sirvió para determinar las Unidades enzimáticas por mg de rEnoTs.

VI.4.3.3. Medición de los parámetros cinéticos

Para medir los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de rEnoTs se varió la concentración del sustrato 2-PGA de 0.1 a 4 mM (87) y se midió la absorbancia en intervalos de 10 segundos por 3 minutos para determinar las velocidades iniciales (V_o) en cada condición. Las mediciones se realizaron por duplicado, trabajándose con el promedio de los datos que sirvieron para graficar la cinética de Michaelis-Menten (67).

VI.4.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs

Para evaluar la inmunogenicidad de rEnoTs se inmunizaron conejos con este antígeno y luego se evaluó su reconocimiento por los sueros pre y post-inmune por inmunoblot.

Adicionalmente, se evaluó la localización de la enolasa de *T. solium* en el cisticerco mediante el reconocimiento del suero post-inmune anti rEnoTs generado en conejo.

VI.4.4.1. Generación de anticuerpos policlonales contra rEnoTs

Los anticuerpos policlonales se generaron con la finalidad de evaluar la capacidad de rEnoTs para generar una respuesta inmune humoral (principalmente anticuerpos del tipo IgG) en conejo tras la exposición con dosis repetitivas de rEnoTs.

Se siguió el protocolo del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular para la generación de anticuerpos policlonales contra proteínas recombinantes en conejo, aprobado por el Comité Institucional de Ética para uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se usaron conejos hembra (*Orhyctolagus cuniculus*, New Zealand White) de 1 a 1.5 meses de edad (1.8 - 2.0 kg). El protocolo de inmunización se detalla a continuación:

Obtención de suero de la oreja del conejo

- Se puso lidocaína en gel sobre la superficie de la oreja donde se encontraba la vena marginal o la arteria central y se dejó que haga efecto por 10 minutos.
- Se limpió la oreja con etanol y se tomó la muestra de sangre de la vena o arteria presionando la base de la oreja para incrementar la presión sanguínea. Para ello se insertó la aguja (No. 23 de 1 pulgada) en un ángulo no mayor a 45°, cuidando de no lesionar la vena, y se extrajo al menos 2 mL de sangre (pre o post-inmune).
- Después de la sangría, se mantuvo presionada la zona donde se tomó la muestra por 30 segundos para detener rápidamente el sangrado.
- Se colectó la sangre en tubos de 15 ml y luego se almacenó a 4°C toda la noche.
- Se centrifugó por 20 min a 5000 rpm y 4°C (sedimentó el coagulo sanguíneo) y se recuperó el suero (sobrenadante).
- Se etiquetó el tubo conteniendo el suero y conservó a -20°C.
- El Suero pre-inmune, se utilizó como control en los ensayos. Se extrajeron 2 ml de sangre de la oreja del conejo previo a las inmunizaciones.

Inmunizaciones

Los conejos se inmunizaron por vía subcutánea con jeringas de tuberculina de 1 mL de capacidad, manteniendo la piel levantada para insertar la aguja en un ángulo de 90° al administrar las dosis (1mL) la cual se distribuyó en 4 puntos del lomo del animal.

Preparación de las dosis de inmunización

Se incluyó en cada dosis 0.6 mg del antígeno rEnoTs y 0.5 mg del adyuvante QuilA en 1 ml de solución salina. Se preparó un stock de 10X QuilA 5 mg/ml en solución salina.

Cada dosis de inmunización se preparó de la siguiente manera:

Componente	[Stock]	[Final]	Vol inicial
rEnoTs	1 mg/ml	0.6 mg/ml	600 uL
QuilA	5 mg/ml	0.5 mg/ml	100 uL
NaCl 0.9%	—	—	300 uL
		Vol. final	1,000 uL

Administración

- 1^{ra} dosis. Se administraron 0.6 mg de rEnoTs y 0.5 mg de QuilA en solución salina por vía subcutánea en un volumen final de 1 ml.
- 2^{da} dosis. Después de 1 ó 2 semanas se extrajeron 2 ml de sangre de la oreja y se administró la segunda dosis, de igual contenido que la primera dosis.
- 3^{ra} dosis. Después de 1 semana se extrajeron 2 ml de sangre de la oreja y se administró la tercera dosis, de igual contenido que la primera dosis.
- 4^{ta} dosis. Se procedió como en la tercera dosis.

- Sangrado final. Después de 1 semana de administrada la cuarta dosis se realizó la sangría final del corazón, colectándose 50 ml de sangre.

Sangría final: punción cardíaca

Para obtener la mayor cantidad de suero post-inmune se realizó la sangría final del animal por punción cardíaca. La punción cardíaca se realizó bajo anestesia, sedando al conejo con una mezcla de 1.6 mL de Ketamina (60 mg/Kg) y 0.8 mL de Xilacina (40 mg/Kg) por vía intramuscular. Se utilizaron agujas de 25-50 mm x 18 G (suficientemente largas para penetrar en el ventrículo) acopladas a jeringas 20 ml.

Se introdujo la aguja en el área donde se sintió el máximo pulso cardíaco. La aguja se fijó con los dedos para mantenerse en el ventrículo durante la extracción y en el cambio de jeringa. El llenado y cambio de las jeringas se realizó con la ayuda de un asistente; es decir, cuando una jeringa se llenaba de sangre, se procedía con el cambio de ésta por una nueva, sin sacar la aguja fija al ventrículo.

Una vez obtenida la muestra (aproximadamente 50 mL) se administró 2 mL de Halatal (20 mg/Kg) para sacrificar el animal. Se dejó coagular la muestra y se separó el suero a 5000 rpm por 15 min a 4°C. Se tomaron alícuotas del suero y se guardaron a -20°C.

VI.4.4.2. Reconocimiento de rEnoTs por los sueros pre y post-inmune

Para determinar el reconocimiento de rEnoTs por los anticuerpos policlonales generados en el conejo (suero post-inmune) en comparación con los anticuerpos

no específicos (suero pre-inmune) se realizó el ensayo de Western Blot o Immunoblot con dichos sueros. Para ello se siguió el protocolo de Immunoblot (EITB) de la Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) modificado (Gan *et al.*, 2010) para rEnoTs con sueros de conejo.

Procedimiento del EITB

Los buffer se prepararon de acuerdo al protocolo establecido por el INCN (Anexo 1).

Electroforesis:

- Se prepararon geles desnaturalantes (con SDS) de poliacrilamida al 12%.
- Se preparó la muestra de rEnoTs con buffer de carga “Sample 2x” en una proporción de 1:1 y se procedió a hervir a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar la proteína. Luego se cargaron distintas cantidades de rEnoTs en los pocillos del gel. Así mismo se añadió un marcador de peso molecular pre-teñido “Dual Color” (BIORAD)
- Se realizó la electroforesis aplicando una corriente constante de 10 mA por 25 minutos hasta que el frente de corrida atravesó linealmente el gel apilador “*stacking gel*”, luego se cambió la corriente a 30 mA por 45 minutos hasta que el frente de corrida estuvo a punto de salirse del gel de resolución “*resolving gel*”, momento en que se detuvo la electroforesis.

Transferencia:

- Una vez terminada la SDS-PAGE, se desmontó la cámara electroforética y se retiró el gel.

- En el buffer de transferencia se humedeció el papel Whatman[®], y la membrana de nitrocelulosa se colocó contigua al gel de poliacrilamida, luego se armó el “sándwich” de transferencia que consistió poner el gel y la membrana de nitrocelulosa entre dos papel Whatman[®] humedecidos y exteriormente dos esponjas absorbentes. Se eliminaron las burbujas que quedaron atrapadas en el “sándwich” con la ayuda de un rodillo.
- En la cámara se colocó buffer de transferencia refrigerado a 4°C, luego se procedió con la transferencia a 700 mA por 1 hora y 30 minutos. Durante el tiempo de transferencia se mantuvo al buffer en una temperatura homogénea de 16°C con la ayuda de “ice packs”.
- Luego de terminar la transferencia se descartó el gel y papel whatman y se recuperó la membrana nitrocelulosa.
- En buffer de PBS + Tween 20 al 0,3% se colocó la membrana de nitrocelulosa y se lavó una vez por 15 minutos. Posteriormente se lavó con buffer PBS dos veces cada 5 minutos.

Bloqueo e incubación con los sueros de conejo (anticuerpos policlonales):

- Se colocó la membrana de nitrocelulosa en una placa de Western Blot nueva y se le añadió 20 mL de solución de bloqueo (tween-20 0,3% + leche descremada al 5% p/v en PBS). Luego se añadió 40 uL de suero pre o post-inmune de conejo para obtener una dilución final de 1:500 del suero.
- Luego se dejó incubando 3 horas a temperatura ambiente en un *shaker* con agitación moderada.

Incubación con anti IgG-conejo (anticuerpo secundario):

- Se descartó la solución de bloqueo con el suero diluido, luego se lavó 3 veces cada 5 minutos con PBS-Tween-20 0,3% para quitar los residuos de la solución de bloqueo, con agitación moderada a temperatura ambiente.
- Se añadió 10µl de anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa HRP (*horseradish peroxidase*, GE Healthcare Life Sciences) a la placa conteniendo 20 mL de PBS-Tween-20 0,3%, de manera que el anticuerpo secundario se diluyó 1:2000 en la placa. Luego se incubó por 1.5 horas en *shaker* con agitación moderada a temperatura ambiente.

Revelado (precipitación colorimétrica del DAB):

- El revelado se realizó por precipitación colorimétrica del DAB mediada por la peroxidasa HRP. Para ello se retiró la solución con el anticuerpo conjugado y se lavó 3 veces cada 5 minutos con PBS-Tween-20 0,3% a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 2 veces cada 5 minutos con buffer PBS para eliminar los restos del Tween-20 (inhibidor de la peroxidasa).
- Se añadió 15 mL de la solución de revelado DAB (sustrato) sobre la placa con la membrana y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se controló la reacción hasta observar bandas bien definidas en las membranas.

- Se detuvo la reacción descartando el sustrato y lavando las membranas con agua destilada al menos 2 veces cada 5 minutos. Se dejaron secar las membranas.

VI.4.4.3. Reactividad del suero anti-rEnoTs con otros antígenos

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos policlonales anti rEnoTs generados en el conejo post inmunización, se realizó un ensayo de ELISA de rEnoTs comparando las reactividades con otros dos antígenos diferentes: EnoSc, enolasa nativa de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich®) y PZAase, pirazinamidasa recombinante de *M. tuberculosis* expresada en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular UPCH. Con este objetivo se siguió el protocolo de ELISA previamente descrito para Catepsina L (40), que se detalla a continuación:

- Se repartió 100 uL de solución del antígeno (1 ng/uL) purificado (100 ng) resuspendido en buffer carbonato-bicarbonato (0.159% Na₂CO₃, 0.293% NaHCO₃, pH 9.2) en los pocillos de placas de microtitulación o de ELISA y se incubaron por 16 horas a 4°C.
- Se eliminó el antígeno remanente por decantación y se bloquearon los pocillos con 120 uL de solución de BSA al 3% (p/v) en PBS. Se incubaron las microplacas durante una hora a 37°C en cámara húmeda.
- Se lavaron las microplacas tres veces con 200 uL de buffer de lavado PBS-T (0.05% Tween-20 en PBS) durante 7 minutos en agitación constante, mediante un agitador - incubador de placas (SOLD - VWR Incubating Microplate Shaker).

- Se añadió 100 uL de sueros (pre o post inmune anti rEnoTs) por triplicado diluidos 1/1000 en PBS y se incubo a 37°C por una hora en cámara húmeda.
- Se lavaron tres veces las microplacas con buffer de lavado PBS-T.
- Se añadió 100 uL de anticuerpo anti-IgG de conejo (Fab específico, GE Healthcare Life Sciences) conjugado con HRP a una dilución 1/10000 en PBS, y seguidamente se incubo durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
- Nuevamente se lavaron tres veces las microplacas con buffer de lavado PBS-T.
- Se añadió 100 uL de sustrato o-fenilendiamina (OPD), disolviendo una tableta de 5 mg de OPD en 10 mL de una solución de sustrato (0.52% ácido cítrico y 1.38% Na₂HO₄) más 10 uL de peróxido de hidrógeno al 30%, y se dejó reaccionar durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Para terminar la reacción se añadió 50 uL de una solución de 0.5 M HCL (*stopping solution*)
- Finalmente, se leyeron las absorbancias de las muestras por triplicado en un lector de ELISA a 490 nm con un filtro a 600 nm, controlando la temperatura, y se registraron los datos.

VI.4.4.4. Localización de la enolasa nativa en cisticercos de *T. solium*

Se evaluó la localización de la enolasa nativa en las distintas fracciones de los cisticercos de *T. solium* mediante Western Blot, utilizando para ello el suero anti rEnoTs previamente generado en conejo.

Se modificaron algunas condiciones del protocolo de Western Blot anterior, que se mencionan a continuación:

Preparación de muestra:

- Los cisticercos fueron lavados tres veces con buffer PBS pH 7.4, y a continuación se extrajo el contenido líquido de su vesícula mediante jeringas estériles. Este fluido de cisticerco fue almacenado a 4°C.
- La vesícula del cisticerco remanente fue resuspendida en Binding Buffer pH 7.4 (Fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM) y almacenada a -70°C. Se le realizó un choque térmico y se le sonó, obteniéndose así el extracto de cisticerco. Luego se separaron las fracciones celulares solubles e insolubles de éste, siguiendo el protocolo previamente descrito. La fracción celular insoluble del cisticerco (membranas) se resuspendió en "Buffer A" pH 7.4 (Fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM, Urea 8M) y se almacenó a -70°C. La fracción celular soluble (citosol) se obtuvo en Binding buffer y se almacenó a -20°C. Se utilizó como control negativo BSA a 30 ng/uL

Electroforesis:

- Se preparó la muestra de rEnoTs con buffer de carga "Sample 2x" en una proporción de 1:1 (total 20 uL) en condiciones desnaturalantes, adicionando DTT.

Bloqueo e incubación con el anticuerpo primario:

- La solución de bloqueo contuvo BSA al 3% en PBS (con Tween-20 0,3%).

- La dilución final de los sueros pre y post-inmune de conejo fue 1: 2500.
- Se dejó incubando O/N a 4°C.

Incubación con el anticuerpo secundario:

- Se añadió anti-IgG de conejo conjugado HRP en una dilución de 1:5000 y se incubo por 1.5 horas en agitación moderada a 37°C

VI.4.5. EVALUACIÓN DE rEnoTs EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA

VI.4.5.1. Estandarización del ensayo de inmunoblot de rEnoTs

Para la estandarización del inmunoblot con sueros humanos se partió del protocolo de Inmunoblot (EITB) de La Unidad de Cisticercosis del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) y del protocolo utilizado por Gan *et al.* (9), modificando las condiciones de estos para obtener resultados óptimos.

Se trabajó con el antígeno rEnoTs diluido hasta una concentración de 50 ng/uL, a partir del cual se cargaron en el gel de poliacrilamida cantidades que fueron de: 500, 250, 125, 62.50 y 31.25 ng de antígeno. Por su parte el suero humano de prueba fue un *Pool* de sueros de pacientes peruanos con NCC proporcionado por el El Grupo de Trabajo de la Cisticercosis en el Perú, identificado previamente como seropositivo en la prueba de EITB-LLGP. A continuación se detallan los ensayos de estandarización más representativos donde se modificaron ciertas condiciones del inmunoblot.

Ensayo de inmunoblot N°01

En este ensayo se probó el reconocimiento de rEnoTs por el *pool* + de sueros, con algunas modificaciones respecto al protocolo original de inmunoblot del INCN.

Condiciones:

- Electroforesis: 10 – 30 mA / 200 – 240 V x 1 hora
- Transferencia: 1 A x 1 hora
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces
- Bloqueo: leche en polvo 5% (marca Gloria) en PBS por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 3 veces
- Anticuerpo primario o *pool* de sueros humanos positivos (+) de NCC: diluidos 1:500 en PBS, incubados por 3 horas a temperatura ambiente (TA).
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 3 veces
- Anticuerpo secundario (dilución 1:5000): anti IgG humano conjugado con HRP diluido 1:5000 en PBS por 2 horas a TA.
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces + PBS x 2 veces
- Revelado: DAB sustrato x 10 minutos en oscuridad.
- Enjuagado con agua destilada.

Ensayo de inmunoblot N°02

En este experimento se probaron las soluciones de bloqueo BSA al 3% y leche en polvo al 5%, diluidas en PBS Tween-20 (0.3%).

Condiciones:

- Electroforesis: 10 mA y 160V x 30 min + 30 mA y 240 V x 30 min
- Transferencia: 1 A, 90 V y 40 W x 1 hora 10min
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces
- Bloqueo: BSA 3% o leche en polvo 5% (p/v) x 2 horas a TA
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 3 veces
- Anticuerpo primario (dilución 1:500): *pool* (+) x 3 horas a TA
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces
- Anticuerpo secundario (dilución 1:5000): 1 h 30 min a TA
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces + PBS x 2 veces
- Revelado: DAB sustrato x 10 minutos en oscuridad.
- Enjuagado con agua destilada.

Ensayo de inmunoblot N°03

En este ensayo se fusionaron los pasos de bloqueo e incubación con el anticuerpo primario (como el protocolo original del INCN) y se incubaron *overnight* (O/N). Se testearon diluciones de 1:500, 1:1000 y 1:4000 del *pool* (+) de sueros humanos. Adicionalmente, se aumentó el tiempo de incubación con el conjugado.

Condiciones:

- Electroforesis: 10 mA y 160V x 30 min + 30 mA y 220 V x 30 min
- Transferencia: 1 A, 90 V y 40 W x 1 hora y 10min
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces

- Bloqueo + anticuerpo primario (dilución 1:500, 1:1000 y 1:4000): leche 5% + *pool* (+) en PBS Tween-20 (0.3%) por 1 hora a TA y luego O/N a 4°C
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces
- Anticuerpo secundario (dilución 1:5000): 2 horas a TA
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces + PBS x 2 veces
- Revelado: DAB sustrato x 10 minutos en oscuridad.
- Enjuagado con agua destilada.

Ensayo de inmunoblot N°04

En este ensayo se modificaron las condiciones de carga de rEnoTs en el gel desnaturalante (con SDS) de poliacrilamida 12%. Se evaluó la influencia del agente desnaturalante DTT en la electroforesis de rEnoTs, y por lo tanto en su transferencia hacia la membrana de nitrocelulosa. Se aumentó ligeramente el tiempo de transferencia.

Condiciones:

- Carga de muestra: 250 ng de rEnoTs Hervida y con DTT, solo DTT, Hervida, sin tratamiento.
- Electroforesis: 10 mA y 160V x 30 min + 30 mA y 220 V x 30 min
- Transferencia: 1 A, 90 V y 40 W x 1 hora y 20 min
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces
- Bloqueo + anticuerpo primario (dilución 1:1000): leche 5% + *pool* (+) en PBS Tween-20 (0.3%) por 1 hora a TA y luego O/N a 4°C
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces

- Anticuerpo secundario (dilución 1:5000): 2 horas a TA
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces + PBS x 2 veces
- Revelado: DAB sustrato x 10 minutos en oscuridad.
- Enjuagado con agua destilada.

Ensayo de inmunoblot N°05

En este caso se compararon las condiciones de electroforesis nativa y desnaturalante de rEnoTs. Los pasos posteriores se mantuvieron como en el ensayo N°04.

Condiciones:

- PAGE desnaturalante: gel de poliacrilamida 12% con SDS, rEnoTs en Sample 2X con SDS + DTT + hervido.
- PAGE no desnaturalante: gel de poliacrilamida 12% sin SDS, rEnoTs en Sample 2X sin SDS, se homogenizó bien antes de cargar.

VI.4.5.2. Evaluación de tiras inmunocromatográficas con rEnoTs para el diagnóstico de neurocisticercosis humana

Generación de tiras inmunocromatográficas de rEnoTs

Una vez estandarizado el ensayo de inmunoblot con el *pool* (+) de sueros humanos se procedió con la preparación de tiras inmunocromatográficas a partir del corte de las membranas de nitrocelulosa transferidas con el antígeno rEnoTs.

Para este objetivo se prepararon los geles de poliacrilamida al 12% con un solo pozo grande, que abarcaba casi todo el gel (120 mm de longitud), y un pozo pequeño para el marcador de peso molecular. Luego se procedió a cargar la

rEnoTs junto con el Sample 2X, haciéndose el cálculo para depositar 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 ng de rEnoTs.

Se siguió el tratamiento:

- SDS PAGE: gel de poliacrilamida 12% con SDS, rEnoTs en Sample 2X con SDS + DTT + hervido.

Posteriormente se realizó:

- Electroforesis: 10 mA y 160V x 30 min + 30 mA y 220 V x 30 min
- Transferencia: 1 A, 90 V y 40 W x 1 hora y 20 min
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces

Una vez obtenidas las membranas de nitrocelulosa transferidas con diferentes cantidades del antígeno, se procedió a cortarla en tiras de 3 mm de ancho por 60 mm de largo con ayuda de un rodillo especial. Luego estas tiras se colocaron entre papel Whatman[®] humedecido con PBS y se guardaron a -20°C.

Sueros de pacientes

Para la evaluación de rEnoTs en el inmunodiagnóstico de NCC se realizó un ensayo piloto con una muestra de sueros de pacientes peruanos provenientes de la costa y sierra, donados por El Grupo de Trabajo de Cisticercosis en el Perú radicado en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN). Adicionalmente, se trabajó con sueros de voluntarios extranjeros sanos. La identificación, antecedentes e historia de estos sueros se detallan a continuación:

- *Pool (+)*: Mezcla de sueros de pacientes con NCC de quistes múltiples provenientes de la costa y sierra peruana, identificados como seropositivos en el EITB-LLGP.
- *Pool (-)*: Mezcla de sueros de pacientes peruanos sin NCC, identificados como seronegativos en el EITB-LLGP.
- Códigos 129133, 129135, 129137, 129443 y 129456: Sueros individuales de pacientes peruanos con NCC de quistes múltiples, seropositivos en el EITB-LLGP, provenientes de la costa y sierra peruana.
- Códigos 129120, 129121, 129123, 129124, 129140, 129475, 129487, 129492, 129501 y 129502: Sueros individuales de pacientes peruanos sin neurocisticercosis, seronegativos en el EITB-LLGP, provenientes de la costa y sierra peruana.
- C y S: Sueros de individuos extranjeros (Reino Unido) sanos y sin antecedentes de cisticercosis u otras helmintiasis.

Condiciones

Luego de descongelarse las tiras inmunocromatográficas se depositaron en placas de inmunoblot con canaletas limpias y estériles para los pasos posteriores. El volumen final de incubación fue de 500 uL (capacidad de la canaleta), siendo las condiciones:

- Bloqueo + anticuerpo primario (dilución 1:500): leche 5% + sueros diluidos en PBS Tween-20 (0.3%) por 1 hora a TA y luego O/N a 4°C
- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces
- Anticuerpo secundario (dilución 1:5000): 2 horas a TA

- Lavado: PBS Tween-20 (0.3%) x 2 veces + PBS x 2 veces
- Revelado: DAB sustrato x 10 minutos en oscuridad.
- Enjuagado con agua destilada.
- Se dejó secar al aire las tiras inmunocromatográficas para su posterior análisis.

Prueba de reacción cruzada con otra cestodiasis

Adicionalmente, para evaluar el reconocimiento de rEnoTs por sueros de pacientes con otras cestodiasis (reacción cruzada), se incluyó en el análisis el suero de un paciente peruano con hidatidosis (donado por el INCN). Se evaluaron 3 cantidades de antígeno (250, 125 y 62.5 ng) siguiendo las mismas condiciones del ensayo anterior y se comparó la reactividad con un suero positivo y uno negativo (en el reconocimiento de rEnoTs).

VI.4.5.3. Reconocimiento de rEnoTs sin desnaturalizar por sueros humanos mediante ELISA

Para evaluar el reconocimiento de rEnoTs por distintos sueros humanos (NCC +, NCC – y europeos sanos) en condiciones no desnaturalizantes se realizó un ensayo de ELISA, siguiendo un protocolo previamente descrito (40):

- Se colocaron 100 ng de rEnoTs resuspendida en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.2 (100 uL) en los pocillos de placas de ELISA y se incubaron por 16 horas a 4°C.

- Transcurrido este tiempo se eliminó el antígeno remanente por decantación y se bloquearon los pocillos con 120 uL de solución de BSA al 3% (p/v) en PBS, incubándose por una hora a 37°C en cámara húmeda.
- Se lavaron los pocillos tres veces con 200 uL de buffer de lavado PBS-T durante 6 minutos en agitación constante.
- Se añadieron 100 uL de sueros humanos (Los mismos del Western Blot) diluidos 1/500 en PBS a los pocillos por triplicado y se incubó a 37°C por una hora en cámara húmeda.
- Se lavaron tres veces las microplacas con buffer de lavado PBS-T.
- Se añadió 100 uL de anticuerpo anti-Human-IgG (*Goat* IgG, GE Healthcare Life Sciences) conjugado con HRP a una dilución 1/10000 en PBS, y seguidamente se incubó durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
- Nuevamente se lavaron tres veces las microplacas con buffer de lavado PBS-T.
- Se añadió 100 uL de sustrato OPD y se dejó reaccionar durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- Se paró la reacción añadiendo 50 uL de una solución de 0.5 M HCL.
- Por último, se leyeron las absorbancias de las muestras en un lector de ELISA a 490 nm con un filtro a 600 nm, controlando la temperatura, y se registraron los datos.

VI.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El protocolo para la producción de anticuerpos policlonales anti – rE_{no}Ts en conejo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), con número de registro SIDISI: 0000063302.

El suero de pacientes con neurocisticercosis y el suero de pacientes controles fueron provistos por El Grupo de Trabajo de la Cisticercosis en el Perú a cargo de Dr. Héctor H. García, guardando estricto anonimato en cuanto a la identidad de dichos pacientes (códigos encriptados).

VI.6. PLAN DE ANÁLISIS

VI.6.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática específica se calculó como la pendiente de la grafica Δ [PEP] vs Δ Tiempo, cuyas mediciones fueron por duplicado. Se determinó el índice de correlación R^2 .

Para calcular los parámetros cinéticos K_m y V_{max} se realizó el diagrama Lineweaver-Burk en base a las inversas ($1/V_o$ vs $1/[2-PGA]$) y alternativamente el diagrama de Eadie-Hofstee (V_o vs $V_o/[2-PGA]$) (89). Asimismo se determinó la constante catalítica (K_{cat}) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m). Para cada punto de las gráficas se trabajó con el promedio de dos mediciones y se hallaron las ecuaciones de las curvas con sus respectivos R^2 .

VI.6.2. ENSAYO INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs

Se estableció un límite de detección (LOD) para el reconocimiento de rEnoTs por los sueros de los conejos pre y post inmune en base a una serie de diluciones (1/4) de rEnoTs. La presencia de la banda de rEnoTs (48 kDa) en el Western Blot se tradujo como reconocimiento.

En reconocimiento de diferentes antígenos por el suero anti-rEnoTs se categorizó como fuerte, moderado y leve. Por otro lado, el cálculo de las medias de las absorbancias de cada grupo, sus desviaciones estándar y la comparación de medias por la prueba de hipótesis t de Student ($\alpha = 0.05$) se realizó mediante el programa estadístico STATA 11.1 (*Stata Statistical Software: Release 11*. <http://www.stata.com>).

VI.6.3. CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL INMUNODIAGNÓSTICO DE NCC CON rEnoTs

La sensibilidad se calculó como el porcentaje de verdaderos positivos cuando la NCC está presente, de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} * 100\%$$

Donde VP son los verdaderos positivos, es decir los individuos con NCC detectados por Western Blot, y FN son los falso negativos, es decir los individuos con NCC no detectados por Western Blot.

Por su parte la especificidad se calculó como el porcentaje de verdaderos negativos cuando los individuos son sanos o no presentan NCC, mediante la fórmula:

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP} * 100\%$$

Donde VN son los verdaderos negativos, es decir los individuos sanos no detectados por Western Blot, y FP son los falso positivos, es decir los individuos sanos detectados como positivos por Western Blot.

En ambos casos, se recurrió a la ayuda de un segundo observador para determinar la presencia (positivo) o ausencia (negativo) de banda de rEnoTs (48 kDa) en las tiras inmunocromatográficas, duplicándose de esta manera el número de observaciones.

Los intervalos de confianza al 95% para la sensibilidad y especificidad se calcularon mediante el programa STATA 11.1.

VI.6.4. RECONOCIMIENTO DE rEnoTs POR SUEROS HUMANOS EN EL ENSAYO DE ELISA

El cálculo de las medias de las absorbancias de cada grupo, sus desviaciones estándar y la comparación de medias por la prueba de hipótesis t de Student ($\alpha = 0.05$) se realizó con ayuda del programa STATA 11.1. El límite de detección (*Cut-off*) para una reacción positiva se determinó en base al promedio de las absorbancias de los pocillos blancos.

VII. RESULTADOS

VII.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ENOLASA DE *T. solium*

VII.1.1. IDENTIFICACIÓN DEL GEN DE LA ENOLASA DE *T. solium*

Una vez secuenciado el genoma de *T. solium* el equipo de bioinformática de nuestro laboratorio determinó que el marco abierto de lectura (ORF por sus siglas del inglés *Open Reading Frame*) para el gen de la enolasa es de 1448 pares de bases (pb), el cual contiene intrones y exones, mientras que el mRNA maduro tiene una longitud de 1302 pb (sin intrones) como se nota en la Figura 12. Por otro lado la secuencia proteica de la enolasa predicha a partir de la secuencia del mRNA maduro es de 433 aminoácidos (GenBank Accesoión No. KX906690).

ORF: 1448pb



mRNA: 1302pb

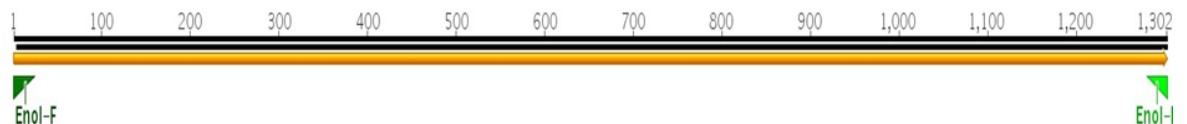


Figura 12. Representación esquemática del gen anotado de la enolasa de *T. solium*. Los exones (en rojo) que conforman el cDNA del gen de la enolasa, y el ORF completo se aprecia como una flecha continua (anaranjado). Abajo, extensión del mRNA maduro del gen de enolasa.

En la Tabla 5 se muestran los contigs y ESTs (acrónimo del inglés *expressed sequence tag*) del genoma *T. solium* utilizados por el equipo de bioinformática en

la anotación y las secuencias completas del ORF, mRNA maduro y proteína de la enolasa.

Tabla 5. Contigs y ESTs utilizados en la anotación del gen de la enolasa de *T. solium*. Secuencias completas del ORF, mRNA y proteína. En turquesa se muestran los intrones del gen y en amarillo los sitios de anclaje de los iniciadores.

Contigs	Contig33992, contig43432
EST	CN653186, CN649593.1
ORF (1448 pb)	<p>ATGTCCATCCAAAAGATTCATGCTCGTCAGATCTTCGACAGTCGTGGGAATCCCAC GTTGAGGTTGATCTAACCCTGCAAGGGAATGTTTCGCGCTGCCGTTCCCTCTGGCG CCTCCACTGGTGTACACGAAGCGGTTGAACTCCGCGATGGTGACAAAAATGCCTACA TGGGCAAGGGTGTCTCAATGCCGTCAAGAACGTCAATGAAGTCATTGCTCCTGCTC TGCTAAAGGAGAAATTCATCGTCACCGACCAGGAGAAGATCGACGAGTTCATGATC AGGCTGGATGGATCACCAAACAAAGGTAGTTGGGAAACACTTTGGTAACTTTGATCT GCCCTTAACTGCTCTCTTGAGACGATCTGACCTTGTTTTTCAGGCAAGCTGGGAGCAA ACGCCATCTTGGGTGTTTCTCTGGCAGTCTGCAAGGCCGAGCTGCCGAGAAGGGTG TCCCCCTTACCGCCACATGCTGACTTGGCTGGTAACAAGGACGTCGTCCTTCCCTGT GCCCTCATTAAACGTGCTCAATGGTGGCAGCCATGCTGGGAACAAGCTGGCTATGCA GGAGTTCATGATTCTCCACCGGTGCCAAGAAGTTCACAGAAGCCATGAAGATGGG CACCGAGGTATACCATCATCTCAAGTCCGTTATTAAGGGCAAATACGGTCTGGATGC CTGTAACGTTGGCGATGAGGGTGGCTTCGCTCCTAACATCCAGGACAATATGGAGGG TCTTGAGCTCCTCAAGACCGCCATTGACAGGGCAGGCTACACCGGCAAGGTCAAGAT CGGCATGGATGTGGCCGCCTCTGAATTCTACCAAGACGGGAAGTATAATCTGGACTT CAAGAATCCCCTGCGGCTGCGTCTTCCATCGTTCCTGGATCGAAGCTGGCTGAGAT CTACTTGGAGATGCTTTCCAAATACCCAATTGTCTCCATTGAGGATCCCTTTGATCAA GATGACTGGGCGCCTGGACTGCCTTTAACGCCAAGGCTGGGATTAGGTAATTGGG CCCCGTTCTGGCTCGTAGGTATGCGTTGAAGTATATAAATATCGCGTTCTTGCCCGCT TCAGATTGTTGGTGACGATTTGACTGTGACAAACCCGAGCGTGTACAGCAAGCTAT CGACAAGAAGGCTTGCAACGCCCTTCTGCTGAAGGTGAATCAGATCGGGTCGGTGAC GGAGTCTATCAAGGCTTGCAAGATGTCTCGCGCTGCTGGCTGGGGCGTAATGGTGTC GCACCGCTCAGGTGAAACGGAGGACTCCACAATCGCTGATATCGTTGTGCGGTCTCCG CACCGGACAGATCAAGACTGGTGCGCCATGTCGCTCAGAGCGTCTAGCTAAGTACAA CCAGCTTCTGCGTATTGAGGAGGAACTTGGTTCTAAGGCCGTCTACGCTGGCGAGCA CTCCGCAATCCTTTGTAA</p>
mRNA (1302 pb)	<p>ATGTCCATCCAAAAGATTCATGCTCGTCAGATCTTCGACAGTCGTGGGAATCCCAC TGTGAGGTTGATCTAACCCTGCAAGGGAATGTTTCGCGCTGCCGTTCCCTCTGGCG GCCTCCACTGGTGTACACGAAGCGGTTGAACTCCGCGATGGTGACAAAAATGCCTAC</p>

	<p>ATGGGCAAGGGTGTCTCAATGCCGTCAAGAACGTCAATGAAGTCATTGCTCCTGCT CTGCTAAAGGAGAAATTCATCGTCACCGACCAGGAGAAGATCGACGAGTTCATGATC AGGCTGGATGGATCACCAACAAAGGCAAGCTGGGAGCAAACGCCATCTTGGGTGT TTCTCTGGCAGTCTGCAAGGCCGGAGCTGCCGAGAAGGGTGTTCCTCTACCGCCA CATGCTGACTTGGCTGGTAACAAGGACGTCGTCCTTCTGTGCCCTCATTTAACGTG CTCAATGGTGGCAGCCATGCTGGGAACAAGCTGGCTATGCAGGAGTTCATGATTCTT CCCACCGGTGCCAAGAACTTCACAGAAGCCATGAAGATGGGCACCGAGGTATACCA TCATCTCAAGTCCGTTATTAAGGGCAAATACGGTCTGGATGCCTGTAACGTTGGCGA TGAGGGTGGCTTCGCTCCTAACATCCAGGACAATATGGAGGGTCTTGAGCTCCTCAA GACCGCCATTGACAGGGCAGGCTACACCGGCAAGGTCAAGATCGGCATGGATGTGG CCGCCTCTGAATTCTACCAAGACGGGAAGTATAATCTGGACTTCAAGAATCCCCTG CGGCTGCGTCTCCATCGTTCCTGGATCGAAGCTGGCTGAGATCTACTTGGAGATGCT TTCCAAATACCAATTGTCTCCATTGAGGATCCCTTTGATCAAGATGACTGGGCCGCC TGGACTGCCTTAAACGCCAAGGCTGGGATTCAGATTGTTGGTGACGATTTGACTGTG ACAAACCCCGAGCGGTACAGCAAGCTATCGACAAGAAGGCTTGCAACGCCCTTCTG CTGAAGGTGAATCAGATCGGGTCGGTGACGGAGTCTATCAAGGCTTGCAAGATGTCT CGCGCTGCTGGCTGGGGCGTAATGGTGTGCGACCGCTCAGGTGAAACGGAGGACTCC ACAATCGCTGATATCGTTGTCGGTCTCCGCACCGGACAGATCAAGACTGGTGCGCCA TGTCGCTCAGAGCGTCTAGCTAAGTACAACCAGCTTCTGCGTATTGAGGAGGAACTT GGTTCTAAGGCCGTCTACGCTGGCGAGCACTTCCGCAATCCTTTGTAA</p>
Secuencia proteica	<p>MSIQKIHARQIFDSRGNPTVEVDLTTAKGMFRAAVPSGASTGVHEAVELRDGDKNAYM GKGVLNAVKNVNEVIAPALLKEKFIVTDQEKIDEFMIRLDGSPNKGKLGANAILGVSLAV CKAGAAEKGVPLYRHIADLAGNKDVVLPVPSFNVNLGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAK NFTEAMKMGTEVYHHLKSVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMEGLELLKTAIDRA GYTGKVKIGMDVAASEFYQDGKYNLDFKNPAAAASSIVPGSKLAEIYLEMLSKYPIVSIE DPFDQDDWAAWTAFNAKAGIQVGDLLTVTNPERVQQAIDKKACNALLKVNQIGSVT ESIKACKMSRAAGWGVMSHRSGETEDSTIADIVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQL LRIEEELGSKAVYAGEHFRNPL</p>
Tamaño	433 aminoácidos

Según la base de datos GeneDB (<http://www.genedb.org/>) existen al menos tres genes de enolasa anotados en el genoma de *T. solium*, es decir existen 3 isotipos de enolasa en este parásito: de 431 (ID: TsM_000447100), 433 (ID: TsM_000595600) y 438 (ID: TsM_000578400) aminoácidos; siendo la secuencia de 433 residuos idéntica a la enolasa reportada en el presente estudio (GenBank Acceso No. KX906690), sin embargo esto no ocurre para su secuencia

nucleotídica (se determinaron 2 SNPs silenciosos al compararla con nuestra enolasa). Haciendo la comparación de la secuencia aminoacídica de cada isotipo de enolasa de *T. solium* con las secuencias de las enolasas humanas del GenBank, se determinó que el isotipo de 433 residuos tiene 75% de identidad con la enolasa alfa humana (ENO1, Accesoión No. P06733), disminuyendo este porcentaje cuando se le comparo con la enolasa beta (ENO3, Accesoión No. P13929) y gamma (ENO2, Accesoión No. P09104). Por su parte la enolasas de 431 y 438 aminoácidos se identificaron con ENO2 y ENO3, respectivamente, como se aprecia en los siguientes cuadros:

	Matriz de Porcentaje (%) de Identidad – Clustal Ω 2.1			
Enolasa	<i>T. solium</i> 431	ENO1	ENO2	ENO3
<i>T. solium</i> 431	100.00	70.40	70.63	71.56
ENO1	70.40	100.00	83.41	83.41
ENO2	70.63	83.41	100.00	83.41
ENO3	71.56	83.41	83.41	100.00

	Matriz de Porcentaje (%) de Identidad – Clustal Ω 2.1			
Enolasa	<i>T. solium</i> 433	ENO1	ENO2	ENO3
<i>T. solium</i> 433	100.00	75.00	71.76	74.77
ENO1	75.00	100.00	83.41	83.41
ENO2	71.76	83.41	100.00	83.41
ENO3	74.77	83.41	83.41	100.00

	Matriz de Porcentaje (%) de Identidad – Clustal Ω 2.1			
Enolasa	<i>T. solium</i> 438	ENO1	ENO2	ENO3
<i>T. solium</i> 438	100.00	65.44	65.21	66.36
ENO1	65.44	100.00	83.41	83.41
ENO2	65.21	83.41	100.00	83.41
ENO3	66.36	83.41	83.41	100.00

Adicionalmente se compararon los tres subtipos de enolasas de *T. solium* anotados hasta el momento.

	Matriz de Porcentaje (%) de Identidad – Clustal Ω 2.1		
Enolasa	<i>T. solium</i> 431	<i>T. solium</i> 433	<i>T. solium</i> 438
<i>T. solium</i> 431	100.00	66.36	74.19
<i>T. solium</i> 433	66.36	100.00	66.97
<i>T. solium</i> 438	74.19	66.97	100.00

VII.1.2. ALINEAMIENTO DE LAS ENOLASAS DE TENIA, CERDO Y HUMANO

De la comparación de las enolasas alfa de *T. solium*, *Sus scrofa* y *Homo sapiens* se pudo hallar un 73% (317/434) de sitios conservados entre las tres secuencias aminoacídicas, existiendo un mayor grado de identidad entre las secuencias de cerdo y humano (96.31%), mientras que la secuencia de *T. solium* fue similar solo en un 75% y 73.84% con las secuencias de humano y cerdo, respectivamente (Figura 13).

VII.1.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA ENOLASA DE *T. solium*

El árbol filogenético mostro una clara agrupación de las enolasas de los platelmintos, formando de esta manera un grupo monofilético distinguible de los demás organismos (Figura 14). Dicha agrupación se sustenta bien por el remuestreo *Bootstrapping* que se realizó 1000 veces, arrojando una probabilidad de ocurrencia del nodo de 0.89. El grupo monofilético de los platelmintos, donde se encuentra la enolasa de *T. solium*, se encuentra bien diferenciado. Asimismo, Se puede apreciar claramente una diferenciación entre los eucariontes y procariontes (considerados como grupo externo).

Adicionalmente, se realizó una matriz del porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas de las enolasas evaluadas en base al alineamiento por Clustal (Anexo 2). Como era de esperarse se observó en la matriz que la secuencia de la enolasa de *T. solium* tiene un mayor porcentaje de identidad con la enolasa de *T. asiatica* (98.61%), mientras que el menor porcentaje de identidad fue con la enolasa de *Streptococcus pneumoniae* (49.30%).

```

Taenia_solium      MSIQKIHARQIFDSRGNPTVEVDLTTAKGMFRAAVPSGASTGVHEAVELRDGKNAYMGK 60
Human_alpha       MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRYMGK 60
Sus_scrofa        MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLHTAKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRYMGK 60
                  ***  *****;*****  *;***;*****;:***;*****;*.  ***

Taenia_solium      GVLNAVKNVNEVIAPALLKEKFIVTDQEKIDEFMIRLDGSPNKGKLGANAILGVSLAVCK 120
Human_alpha       GVSKAVEHINKTIAPALVSKKLVNTEQEKIDKLMIEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK 120
Sus_scrofa        GVSKAVEHINKTIAPALVSKKLVNTEQEKIDKLMIEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK 120
                  ** :***::*:;*****;.:* : *;*****;:*;:**. **;*****;*****

Taenia_solium      AGAAEKGVPLYRHIADLAGNKDVVLPVPSFNVNLGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAKNFTE 180
Human_alpha       AGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPFNFVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFRE 180
Sus_scrofa        AGAVEKGVPLYRHIADLAGNAEVILPVPFNFVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAETFRE 180
                  ***;*****;***** :*;*****;***;*****;*****;*. * *

Taenia_solium      AMKMGTEVYHHLKSVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMEGLELLKTAIDRAGYTKV 240
Human_alpha       AMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDK 240
Sus_scrofa        AMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKNAIGKAGYTDK 240
                  ***;*:*****;*.*** ** * * *****; * * *;*****;*****

Taenia_solium      KIGMDVAASEFYQDGKYNLDFKNPAAAASSIVPGSKLAEIYLEMLSKYPIVSIEDPFDQD 300
Human_alpha       VIGMDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISP-DQLADLYKSFIDYPVVSIEDPFDQD 299
Sus_scrofa        VIGMDVAASEFYRSGKYDLDFKSPDDPSRYISP-DQLADLYKSFIRDYPVVSIEDPFDQD 299
                  *****;:;***;***** * : * * .:***: * .: .:***;*****

Taenia_solium      DWAAWTFNAKAGIQIVGDDLTVTNPERVQQAIDKKACNALLLKVNQIGSVTESIKACKM 360
Human_alpha       DWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKL 359
Sus_scrofa        DWEAWQKFTGSAGIQVVGDDLTVTNPKRISKVAEKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACKL 359
                  ** * * ..***;*****;*: :*: :*;**. *****;*****;***:

Taenia_solium      SRAAGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGS 420
Human_alpha       AQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGS 419
Sus_scrofa        AQSNGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELGS 419
                  :.: *****;*****: ***;**** *****;*****;*****

Taenia_solium      KAVYAGEHFRNPL--      433
Human_alpha       KAKFAGRNRFRNPLAK    434
Sus_scrofa        KAKFAGRNRFRNPLAK    434
                  ** :*.;*****

```

Matriz de Porcentaje de identidad - Creado por Clustal 2.1

1: Taenia_solium	100.00	75.00	73.84
2: Human_alpha	75.00	100.00	96.31
3: Sus_scrofa	73.84	96.31	100.00

Figura 13. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las enolasas de *T. solium* (GenBank Accesoión No. KX906690), *S. scrofa* (GenBank Accesoión No. XP_005665031) y *H. sapiens* (GenBank Accesoión No. P06733), usando Clustal W2.1. Se indican los aminoácidos conservados (asteriscos), las sustituciones conservativas (dos puntos) y las semiconservativas (un punto). En la parte inferior se muestra el porcentaje de identidad entre las secuencias evaluadas.

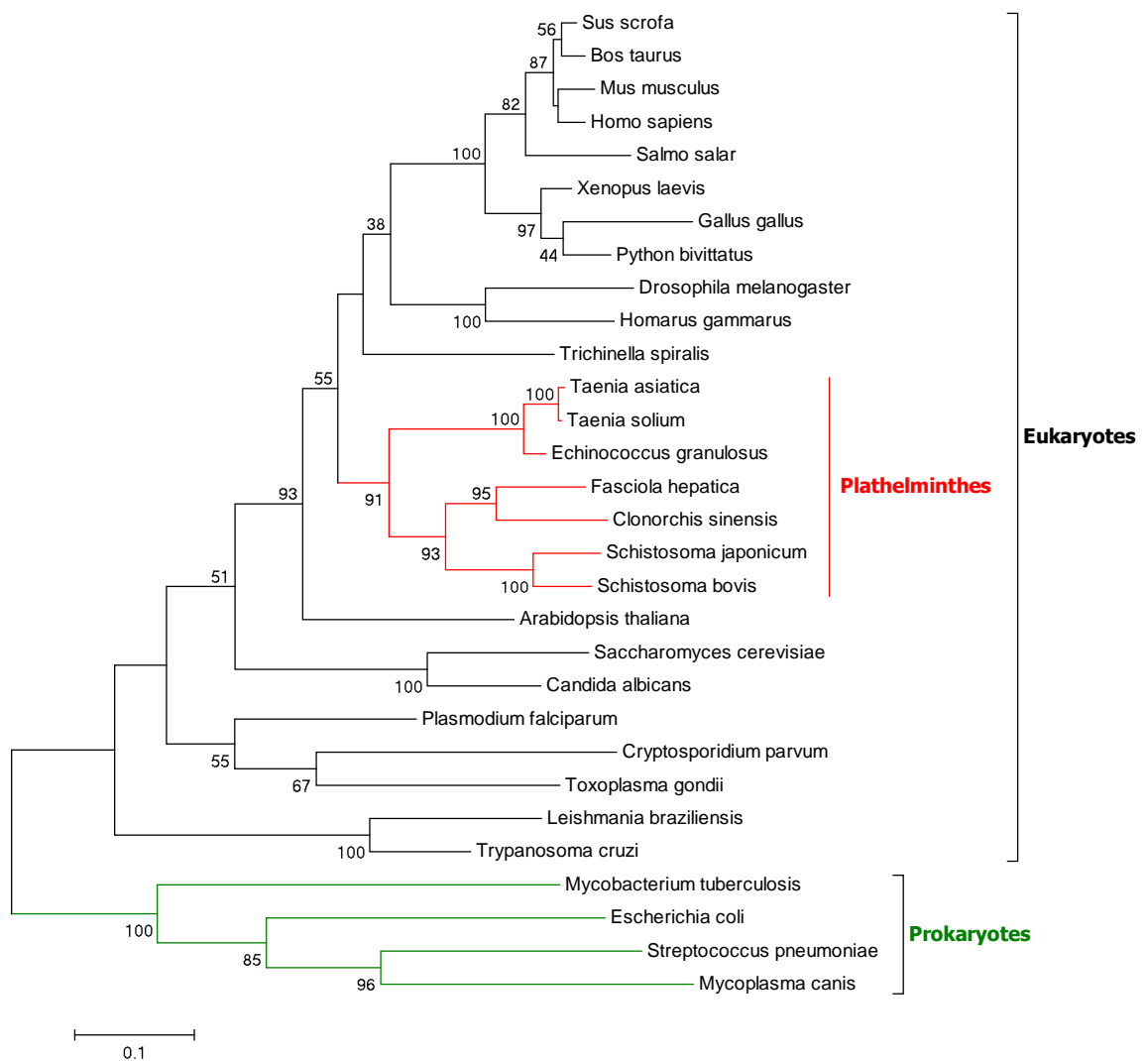


Figura 14. Árbol filogenético de 30 enolasas de diferentes especies usando el método de *Maximun Likelihood* en el programa MEGA v. 6.06. Se indican las probabilidades de ocurrencia de los nodos en base al remuestreo “*Bootstrapping*”. En la parte inferior se muestra la escala de la distancia genética. El grupo de los platelmintos, donde se encuentra la enolasa de *T. solium*, está indicado en rojo. Se utilizó las enolasas de los procariontes como grupo externo. El número de accesión del GenBank de cada enolasa se menciona a continuación: *Mus musculus* (P17182), *Sus scrofa* (XP_005665031), *Bos taurus* (Q9XSJ4), *Homo sapiens* (P06733), *Trichinella spiralis* (Q967U0), *Fasciola hepatica* (Q27655), *Schistosoma bovis* (ACC78611), *Schistosoma japonicum* (ACV41761), *Saccharomyces cerevisiae* (P00924), *Leishmania braziliensis* (XP_001563419), *Cryptosporidium parvum* (Q5CRP8), *Toxoplasma gondii* (Q9UAE6), *Plasmodium*

falciparum (Q27727), *Escherichia coli* (P0A6P9), *Streptococcus pneumoniae* (Q97QS2), *Arabidopsis thaliana* (CAA41114), *Mycobacterium tuberculosis* (AIB47613), *Mycoplasma canis* (EIE41107), *Trypanosoma cruzi* (EKG04398), *Drosophila melanogaster* (NP_001162853), *Homarus gammarus* (1PDY), *Gallus gallus* (BAA07133), *Python bivittatus* (XP_007441409), *Xenopus laevis* (NP_001080346), *Clonorchis sinensis* (NP_001187631), *Echinococcus granulosus* (ACY30465), *Taenia asiática* (ACX56268), *Taenia solium* (KX_906690), *Candida albicans* (AAA34341) y *Salmo salar* (CBL79146).

VII.1.4. DISEÑO DE INICIADORES PARA LA ENOLASA DE *T. solium*

Debido a que los iniciadores de la enolasa alfa de *T. solium* se diseñaron con la finalidad de añadir secuencias de restricción en los extremos de este gen para una futura clonación, tuvieron una longitud de 29 pb (el rango recomendado para una alta especificidad varía entre 18 – 25 pb) motivo por el cual sus T_m predichas fueron elevadas (Tabla 6). En este sentido, el iniciador *Forward* contó con una cola de nucleótidos (ccatgg) específica para el reconocimiento por la enzima de restricción *NcoI*, mientras que el *Reverse* contó con una cola (ctcgag) para la enzima de restricción *XhoI*. Dichas secuencias de restricción sirvieron para hacer la ligación de la enolasa en el plásmido de clonación y expresión pET-28a(+).

Tabla 6. Diseño de iniciadores *Forward* y *Reverse* para el gen de la enolasa maduro de *T. solium*. En rojo se muestran las secuencias de restricción.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	pb	%GC	T _m (°C)	Tamaño Amplicón
Eno-F	ggccatggGGTCCATCCAAAAGATTCATG	29	52	79	1317 pb (1299 pb de fracción mRNA + 18 pb de cola de iniciadores)
Eno-R	ggctcgagGTACAAAGGATTGCGGAAGTG	29	55	78	

VII.1.5. ANÁLISIS DE SECUENCIA DE rEnoTs

Según el secuenciamiento (MACROGEN) la secuencia nucleotídica de la enolasa de *T. solium* amplificada mediante la DNA polimerasa de alta fidelidad y clonada en el pET28a se muestra a continuación:

```
1  ATGGGGTCCA TCCAAAAGAT TCATGCTCGT CAGATCTTCG ACAGTCGTGG GAATCCCCT
61  GTTGAGGTTG ATCTAACCAC TGCCAAGGGA ATGTTTCGCG CTGCCGTTCC CTCTGGCGCC
121 TCCACTGGTG TACACGAAGC GGTTGAACTC CGCGATGGTG AAAAAATGC CTACATGGGC
181 AAGGGTGTTC TCAATGCCGT CAAGAACGTC AATGAAGTCA TTGTCCTGC TCTGCTAAAG
241 GAGAAATTCA TCGTCACCGA CCAGGAGAAG ATCGACGAGT TCATGATCAG GCTGGATGGA
301 TCACCAAACA AAGGCAAGCT GGGAGCAAAC GCCATCTTGG GTGTTTCTCT GGCAGTCTGC
361 AAGGCCGAG CTGCCGAGAA GGGTGTTCCT CTCTACCGCC ACATTGCTGA CTTGGCTGGT
421 AACAAGGACG TCGTCCTTCC TGTGCCCTCA TTTAACGTGC TCAATGGTGG CAGCCATGCT
481 GGAACAAGC TGGCTATGCA GGAGTTCATG ATTCTTCCCA CCGGTGCCAA GAACTTCACA
541 GAAGCCATGA AGATGGGCAC CGAGGTATAC CATCATCTCA AGTCCGTTAT TAAGGGCAAA
601 TACGGTCTGG ATGCCTGTAA CGTTGGCGAT GAGGGTGGCT TCGTCCTTAA CATCCAGGAC
661 AATATGGAGG GTCTTGAGCT CCTCAAGACC GCCATTGACA GGGCAGGCTA CACCGCAAG
721 GTCAAGATCG GCATGGATGT GGCCGCCTCT GAATTCTACC AAGACGGGAA GTATAAATCTG
781 GACTTCAAGA ATCCCGCTGC GGCTGCGTCT TCCATCGTTC CTGGATCGAA GCTGGCTGAG
841 ATCTACTTGG AGATGCTTTC CAAATACCCA ATTGTCTCCA TTGAGGATCC CTTTGATCAA
901 GATGACTGGG CCGCCTGGAC TGCCTTTAAC GCCAAGGCTG GGATTCAGAT TGTGGTGAC
961 GATTTGACTG TGACAAACCC CGAGCGTGTA CAGCAAGCTA TCGACAAGAA GGCTTGCAAC
1021 GCCCTTCTGC TGAAGGTGAA TCAGATCGGG TCGGTGACGG AGTCTATCAA GGCTTGCAAG
1081 ATGTCTCGCG CTGCTGGCTG GGGCGTAATG GTGTGCACC GCTCAGGTGA AACGGAGGAC
1141 TCCACAATCG CTGATATCGT TGTCGGTCTC CGCACCGGAC AGATCAAGAC TGGTGCGCCA
1201 TGTCGCTCAG AGCGTCTAGC TAAGTACAAC CAGCTTCTGC GTATTGAGGA GGAACCTGGT
1261 TCTAAGGCCG TCTACGCTGG CGAGCACTTC CGCAATCCTT TGTACCTCGA GCACCACCAC
1321 CACCACCACT GA
```

Es de notar que la secuencia nucleotídica de rEnoTs en el pET28a tiene una longitud de 1332 pb, ligeramente superior al gen original (1302 pb) debido a la inserción de secuencias codificantes de Histidinas.

Posteriormente se realizó la traducción *in silico* de estas secuencias en el servidor ExPASy, generándose la correspondiente secuencia aminoacídica de rEnoTs de 443 aminoácidos (incluida la cola de 6 Histidinas) en base al primer marco de lectura, obteniéndose:

```
1  MGSIQKI HAR QIFDSRGNPT VEVDLTTAKG MFRAAVPSGA STGVHEAVEL RDGDKNAYMG
61  KGVLNAVKNV NEVIAPALLK EKFI VTDQEK IDEFMIRLDG SPNKGKLGAN AILGVSLAVC
121 KAGAAEKGV P LYRHIADLAG NKDVVLPVPS FNVLNGGSHA GNKLAMQEFM ILPTGAKNFT
181 EAMKMGTEVY HHLKSVIKGK YGLDACNVGD EGGFAPNIQD NMEGLELLKT AIDRAGYTGK
241 VKIGMDVAAS EFYQDGKYNL DFKNPAAAAS SIVPGSKLAE IYLEMLSKYP IVSIEDPFDQ
301 DDWAAWTFAN AKAGIQIVGD DLTVTNPERV QQAIDKKACN ALLLKVNQIG SVTESIKACK
361 MSRAAGWGV M VSHRSGETED STIADIVVGL RTGQIKTGAP CRSERLAKYN QLLRIEEELG
421 SKAVYAGEHF RNPLYLEHHH HHH
```

Adicionalmente se secuenció una enolasa amplificada por la DNA polimerasa (*Taq*) convencional y clonada en pET28a, en cuya secuencia se identificaron dos mutaciones puntuales generadas por la amplificación. Éstas fueron: 121 T → C y 748 T → C.

Al hacer la traducción *in silico* se apreció que tales mutaciones generaron dos sustituciones aminoacídicas: S41P y S250P.

VII.1.6. PREDICCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE rEnoTs

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos de rEnoTs, se predijo que tiene un peso molecular teórico de 47.8 kDa y un punto isoeléctrico (pI) hipotético de 6.55. La fórmula general de esta proteína en relación a su composición atómica

viene dada por $C_{2113}H_{3372}N_{590}O_{639}S_{18}$. En cuanto a su composición aminoacídica el aminoácido más abundante es la Alanina (11.1%) mientras que el más escaso es el Triptófano (0.7%). La vida media estimada de rEnoTs en *E. coli*, *in vivo* (organismo a partir del cual se produce) es de aproximadamente 10 horas. Además, el índice de inestabilidad resulto ser de 32.33, considerándose a rEnoTs como una proteína estable (índice menor a 40). El índice alifático, que define el volumen relativo que ocupan las cadenas laterales alifáticas y que puede interpretarse como un factor positivo para el aumento de la termoestabilidad de las proteínas globulares, fue de 87.90, por lo que rEnoTs es termoestable. Finalmente el promedio de hidropaticidad GRAVY (del ingles *Grand average of hydropathicity*), que es la suma de los valores de hidropaticidad (hidrofobicidad o hidrofiliidad relativa) entre el número de aminoácidos que se encuentran en la proteína, tuvo un valor de -0.21 , indicando el carácter hidrofílico externo y un núcleo hidrofóbico de rEnoTs en solución.

Se determinaron los dominios C-terminal y N-terminal así como los motivos proteicos más importantes. En la figura 15 se puede notar en letras rojas los residuos pertenecientes al dominio N-terminal de rEnoTs, mientras que en letras negras figuran los residuos pertenecientes al dominio C-terminal. Es de notar que la firma proteica de la enolasa se encuentra enmarcada en azul, mientras que el motivo catalítico en verde. La región transmembrana predicha de rEnoTs (ver más adelante) se muestra enmarcada en amarillo y los residuos en celeste pertenecen al motivo interno de reconocimiento del plasminógeno con su región central en fucsia. Por su parte, los residuos donadores y aceptores de protones del sitio

activo de la enolasa (His159, Glu168, Glu211, Lys345, His373 y Lys396) se encuentran enmarcados en rojo.

```

1  MGSIQKI HAR QIFDSRGNPT VEVDLTTAKG MFRAAVPSGA STGVHEAVEL RDGDKNAYMG
61  KGV LNAVKNV NEVIAPALLK EKFI VTDQEK IDEFMIRLDG SPNK GKLGAN AILGVSLAVC
121 KAGAAEKGVP L YRHIADLAG NKDVVLPVPS FNV LNGGS HA GNKLAMQEFFM ILPTGAKNFT
181  EAMKMGTEVY HHLKSVIKGK YGLDACNVGD EGGFAPNIQD NMEGLELLKT AIDRAGYTGK
241 VKIGMDVAAS EFYQDGKYNL DFKNPAAAAS SIVPGSKLAE IYLEMLSKYP IVSIEDPFDQ
301  DDWAAWTAFN AKAGIQIVGD DLTVTNPERV QQ AIDKKACN A LLKVNQIG SVTESIKACK
361  MSRAAGWGVM VS HRSGETED STIADIVVGL RTGQIKGAP CRSERLAKYN QLLRIIEELG
421  SKAVYAGEHF RNPLYLEHHH HHH

```

Figura 15. Dominios, motivos y residuos catalíticos predichos para rEnoTs.

El dominio N-terminal de rEnoTs es compartido por la superfamilia de la enolasa y por otras enzimas con dominios estructurales similares, tales como D-Glucarato deshidratasas, muconato-lactonizantes, racemasas mandelato, deshidratasas D-galactonato, O-succinil benzoato sintasas, metil aspartato liasas, entre otras. Estas enzimas comparten una estructura de dos dominios conteniendo un dominio tapado (*capping domain*) y un dominio barril C-terminal. El dominio N-terminal forma parte del dominio tapado.

En contraste, el dominio C-terminal de la enolasa se pliega en forma de barril TIM, el cual es un dominio estructural muy conservado que consiste en ocho hélices alfa y ocho láminas beta paralelas que se alternan en el esqueleto de la proteína, que contiene un sitio de unión a metal. Entre las proteínas que contienen este dominio se incluyen a las del tipo D-Glucarato deshidratasas.

VII.1.7. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE rEnoTs

En base al modelamiento por homología se determinó la estructura tridimensional de rEnoTs, a partir de la topología de proteínas cristalizadas y disponibles en el PDB. De aproximadamente 80 enolasas cristalizadas la estructura proteica tridimensional con mayor similitud a rEnoTs fue la de código “2psn.1.A”, correspondiente a una enolasa alfa humana (PDB). De esta manera se utilizó al molde 2psn.1.A para generar el modelo tridimensional de rEnoTs (rEnoTs 3D), en donde cada rEnoTs es una subunidad del homodímero (Figura 16).

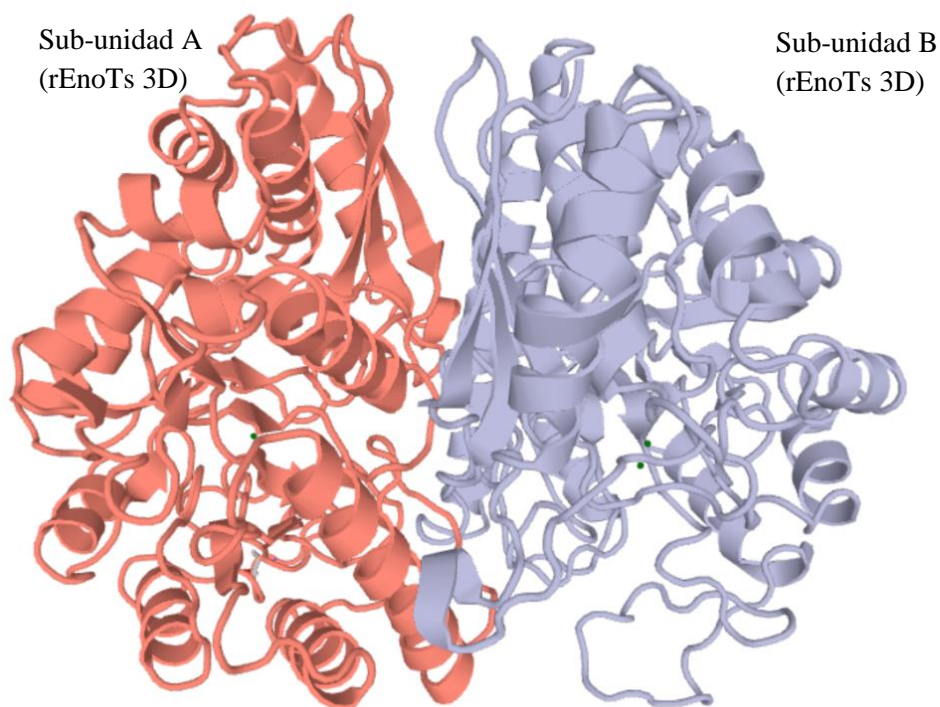


Figura 16. Modelo 3D de rEnoTs conformando un homodímero (SWISS-MODEL, Protein Viewer)

Con respecto a la enolasa alfa humana “2psn.1” (molde) esta fue cristalizada con una resolución de rayos X de 2.20 Å y cuenta con una estructura homodimérica

(cadena A y B). La cobertura del modelo rEnoTs con respecto a 2psn.1 fue de 0.97, cuyo rango abarcó desde el residuo 3 al 434 de un total 443 (rEnoTs). Por otra parte, la identidad entre las secuencias aminoacídicas de rEnoTs y 2psn.1 fue del 74.94%.

El Plot de Ramachandran, del caso general (90), para el modelo rEnoTs 3D se muestra en la Figura 17, donde se aprecia que prácticamente todos los residuos (cruces) se encuentran dentro de las zonas de conformaciones permitidas, salvo el caso de la Glicina (cuadrados) que tiene mayor libertad en sus ángulos diedros (Φ y ψ), debido a que su grupo R es un átomo de Hidrógeno.

En el análisis del sitio activo de rEnoTs 3D se pudo comprobar que los principales donadores y aceptores de protones fueron: His159, Glu168, Glu211, Lys345, His373 y Lys396, interactuando estrechamente con el sustrato 2-PGA en el centro catalítico de rEnoTs. A este nivel es notable la cercanía del residuo Ser41, indicando su rol fundamental en la catálisis enzimática (Figura 18).

El modelo rEnoTs 3D consta de 2 ligandos Mg^{+2} , uno conformacional y uno catalítico. El primer ligando Mg^{+2} (conformacional) se encuentra en contacto con los residuos Q167, D246, E295, D320, K345 y K396, siendo las interacciones metálicas más importantes con D246, E295 y D320 (distancia ≤ 2.5 Å). Por su lado, el segundo ligando Mg^{+2} (catalítico) se encuentra vinculado con los residuos S41, Q167, D320 y K345, siendo la interacción metálica más importante con S41 (Figura 19).

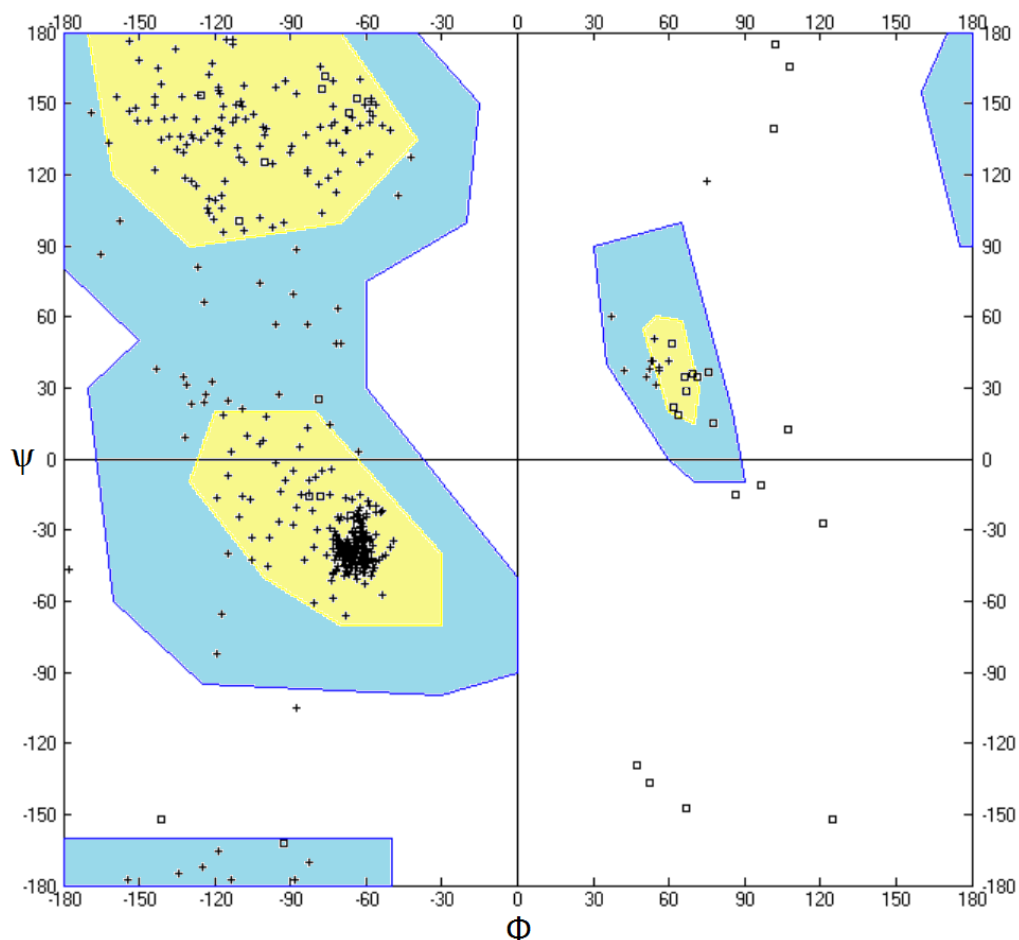


Figura 17. Plot de Ramachandran de rEnoTs 3D. Las áreas sombreadas de amarillo reflejan las conformaciones totalmente permitidas, en celeste las conformaciones de permisibilidad desfavorable y las áreas sin sombreadar muestran las conformaciones no permitidas.

El modelo rEnoTs 3D cuenta con una estructura secundaria donde se pueden apreciar hélices alfa, hojas Beta, giros β y γ y bucles tal y como se muestra en la Figura 20. El molde 2psn.1 cuenta con una conformación secundaria definida y anotada a partir de la cual se generó, por alineamiento, el mapa conformacional de estructuras secundarias de rEnoTs 3D que se muestra Figura 23b, donde además se muestran los residuos que interaccionan con el ion metálico Mg^{+2} .

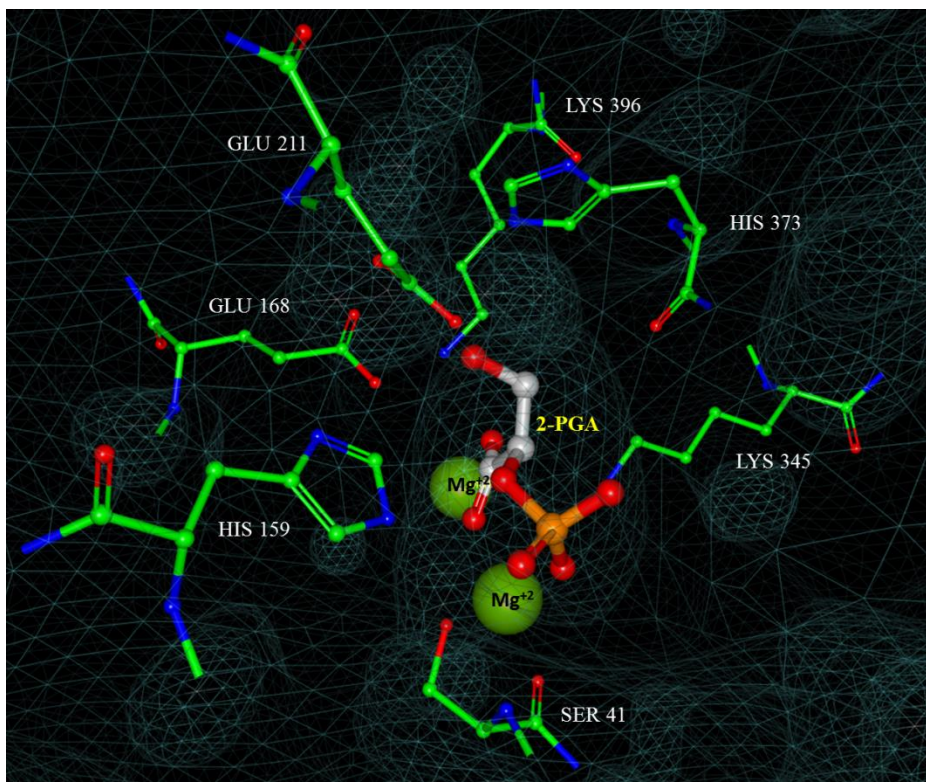


Figura 18. Modelamiento del sitio activo de rEnoTs 3D mediante Ligand ExplorerTM. Los principales donadores y aceptores de protones se muestran cerca al sustrato 2- PGA. Es notable la presencia de Ser41 en el centro catalítico.

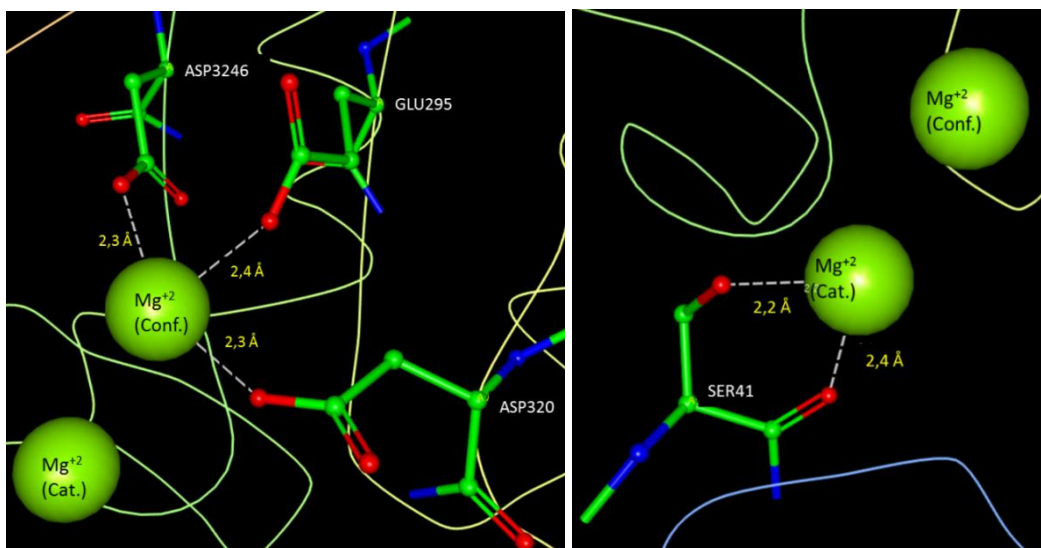


Figura 19. Interacciones metálicas de los iones Mg^{+2} con los residuos de rEnoTs en el sitio activo: Izquierda, interacciones de los residuos D246, E295 y D320 con el Mg^{+2} conformacional (Conf.). Derecha, interacción del residuo S41 con el Mg^{+2} catalítico (Cat.). En ambos casos se utilizó el Software Ligand ExplorerTM.

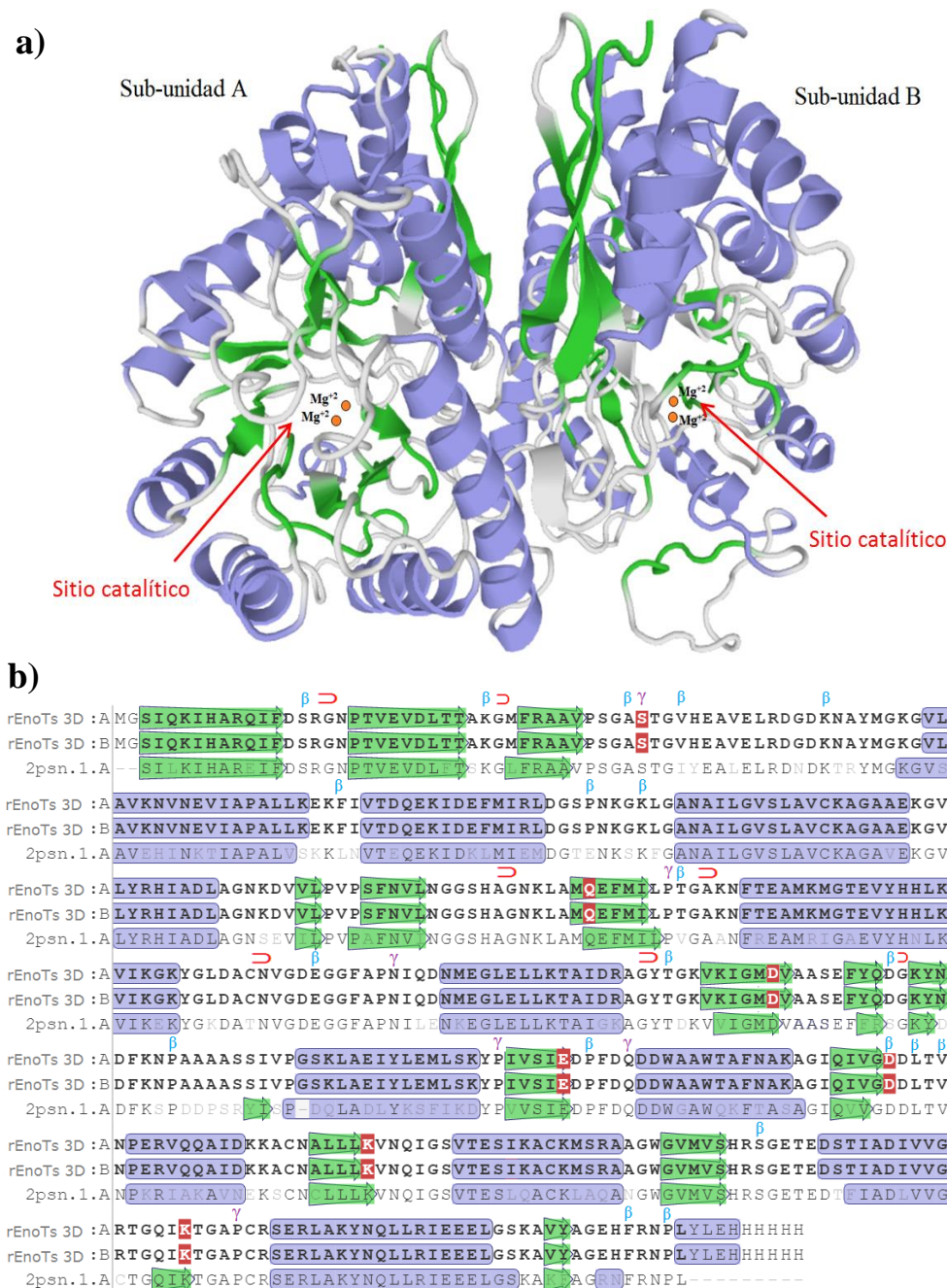


Figura 20. Modelo 3D de rEnoTs mostrando estructuras secundarias: a) Disposición espacial, en morado las hélices α , en verde las hojas β y los bucles y giros como hebras blancas. Nótese que las 2 subunidades adoptan una disposición antiparalela. Se indica el sitio catalítico. b) mapa de la estructura secundaria de rEnoTs 3D: en el alineamiento se aprecian las cadenas idénticas A y B de rEnoTs, además se observan las horquillas Beta (\Rightarrow), y los giros Beta (β) y Gamma (γ). Por su parte, enmarcados en rojo se muestran los residuos que interactúan con los iones Mg^{+2} .

VII.1.8. EVALUACIÓN *in silico* DE LA rEnoTs MUTANTE

La enolasa de *T. solium* amplificada con la *taq* polimerasa convencional conlleva a la generación de las mutaciones S41P y S250P en la proteína recombinante expresada, por lo que en adelante al producto de esta expresión se le denominara rEnoTs mutante. A continuación se muestra el análisis, por separado, de cada mutación:

La mutación S41P se produjo en una región de giro Beta (tipo I). Sin embargo al comparar los modelos 3D de rEnoTs y rEnoTs mutante aparentemente no se apreció una variación significativa en sus estructuras (Figura 21).

Al analizar más en detalle la mutación S41P se pudo apreciar una pequeña variación de los ángulos diedros Φ y ψ , siendo estos de -102.4° y 74.2° , para el caso de la SER41; y de -89.8° y 79.3° , para el caso de la PRO41 mutante, respectivamente (Figura 22). Como se mencionó anteriormente el aminoácido SER41 está íntimamente ligado al ion Mg^{+2} , ya que se producen interacciones metálicas entre el carbonilo de su esqueleto peptídico y el hidroxilo de su cadena lateral con el Mg^{+2} catalítico. Al producirse la mutación S41P se pierde la interacción metálica del hidroxilo con el Mg^{+2} ($d = 2.2 \text{ \AA}$), permaneciendo solo la del carbonilo ($d = 2.4 \text{ \AA}$), lo que afectaría a la funcionalidad de rEnoTs.

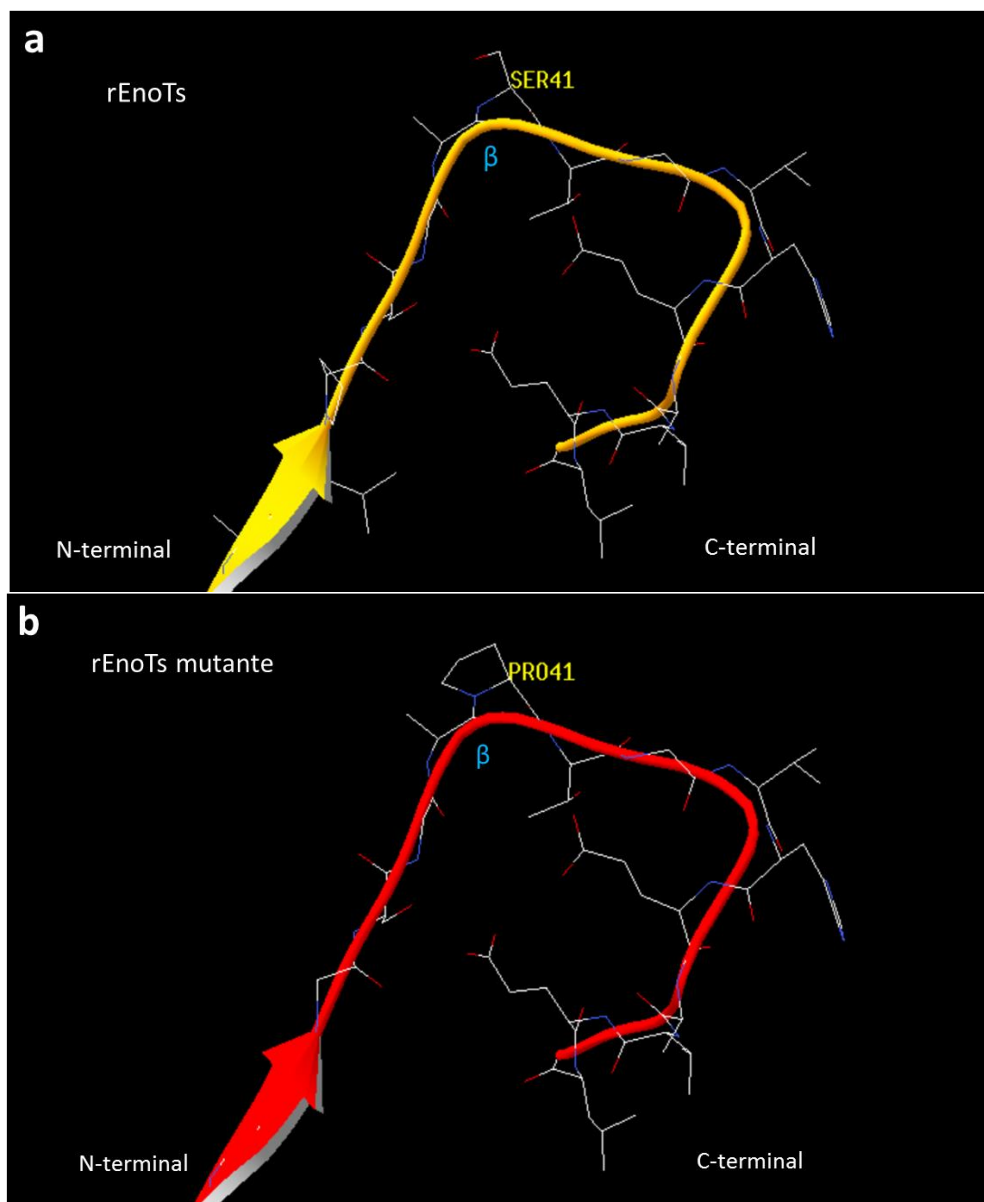


Figura 21. Región estructural de la mutación S41P: a) rEnoTs, con residuo SER41 original, b) rEnoTs mutante, con residuo PRO41 mutado.

Por último, la variación de los ángulos diedros Φ y ψ de la mutación S41P condujo a una ligera modificación estructural de rEnoTs mutante con respecto a rEnoTs, de manera que el bucle donde se encontraba SER41 tuvo un leve desplazamiento de 0.18 Å cuando se mutó por PRO41. Tal movimiento ocurrió a nivel del esqueleto polipeptídico (Figura 23).

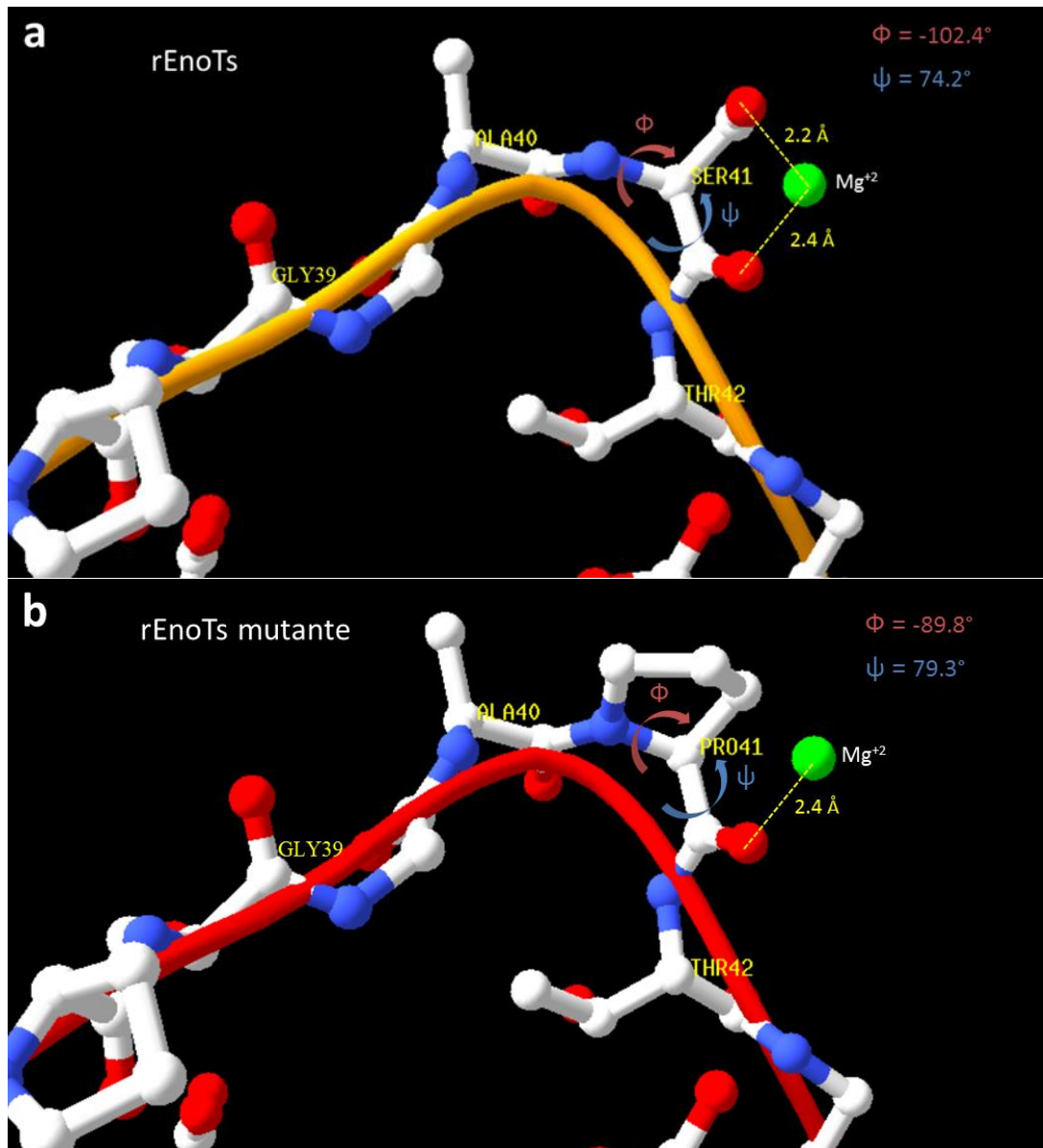


Figura 22. Variación en los ángulos diedros e interacciones metálicas de la mutación S41P. a) Interacción de Mg^{+2} con el C=O y OH de SER41; b) Interacción de Mg^{+2} con C=O de PRO41.

Por su parte la mutación S250P se produjo en una región situada entre dos hojas beta y que formaba un bucle. Aparentemente esta mutación no afectó la estructura tridimensional de rEnoTs puesto que no se observó una variación importante al comparar las estructuras de rEnoTs y rEnoTs mutante (figura 24).

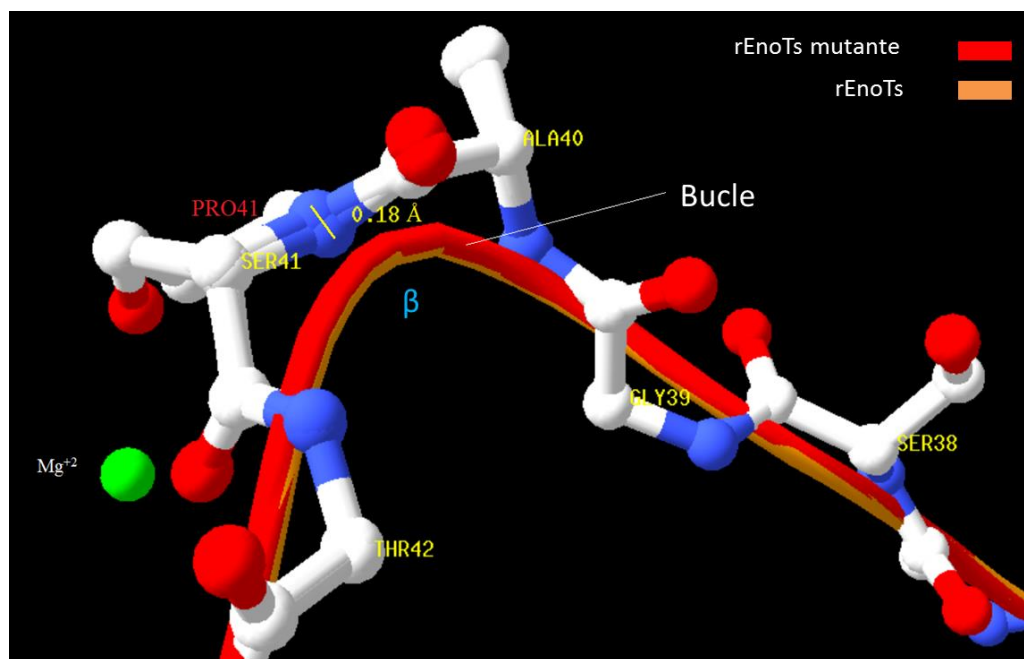


Figura 23. Desplazamiento del bucle de rEnoTs a nivel del esqueleto polipeptídico por la mutación S41P. Se ven los bucles sobrepuestos de rEnoTs (naranja) y rEnoTs mutante (rojo).

Al realizar el análisis estructural de la mutación S250P se observó que los ángulos diedros Φ y ψ en dicha posición experimentaron una ligera variación de -61.7° y -27.3° , (SER250) a -59.4° y -24.7° (PRO250), respectivamente. Adicionalmente se midieron las distancias atómicas entre los iones Mg^{+2} y los Oxígenos de los grupos C=O y OH de los residuos SER250 y PRO250 (solo C=O), involucrados en la mutación S250P. Se pudo determinar que las distancias atómicas estuvieron por encima del umbral de interacciones metálicas importantes ($d \leq 3.5 \text{ \AA}$), según el programa Ligand ExplorerTM (Figura 25). Estos datos nos sugieren que dichas interacciones metálicas son irrelevantes para la funcionalidad de rEnoTs.

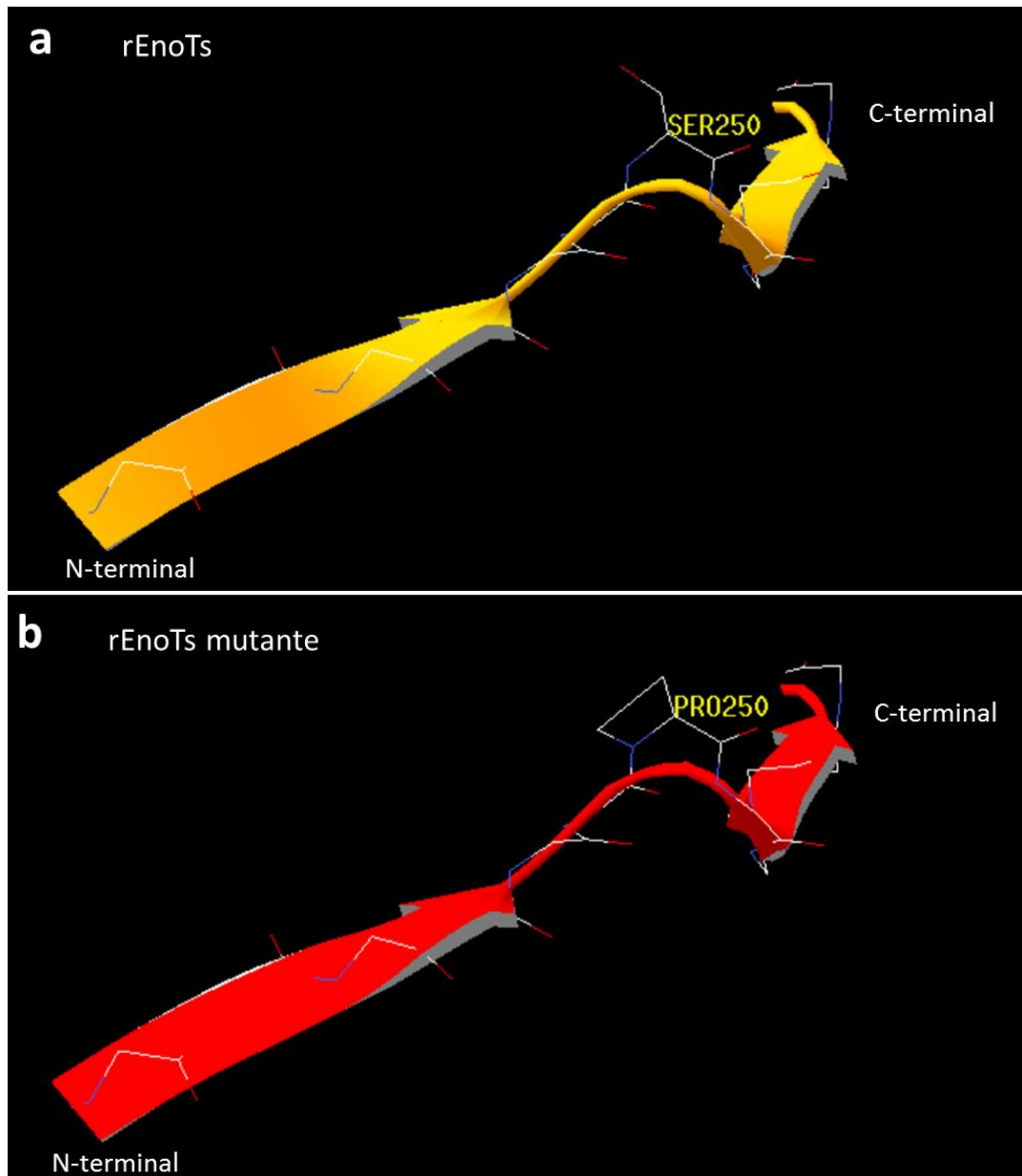


Figura 24. Panorama de la mutación S250P en la estructura secundaria tipo bucle: a) rEnoTs, con residuo SER250 original; b) rEnoTs mutante, con residuo PRO250 mutado.

Finalmente se observó una pequeña modificación estructural debido a la variación de los ángulos diedros Φ y ψ en la posición de la mutación S250P. Esto trajo como consecuencia que el bucle donde se originó dicha mutación se desplazara a penas en 0.16 Å a nivel del esqueleto polipeptídico (Figura 26).

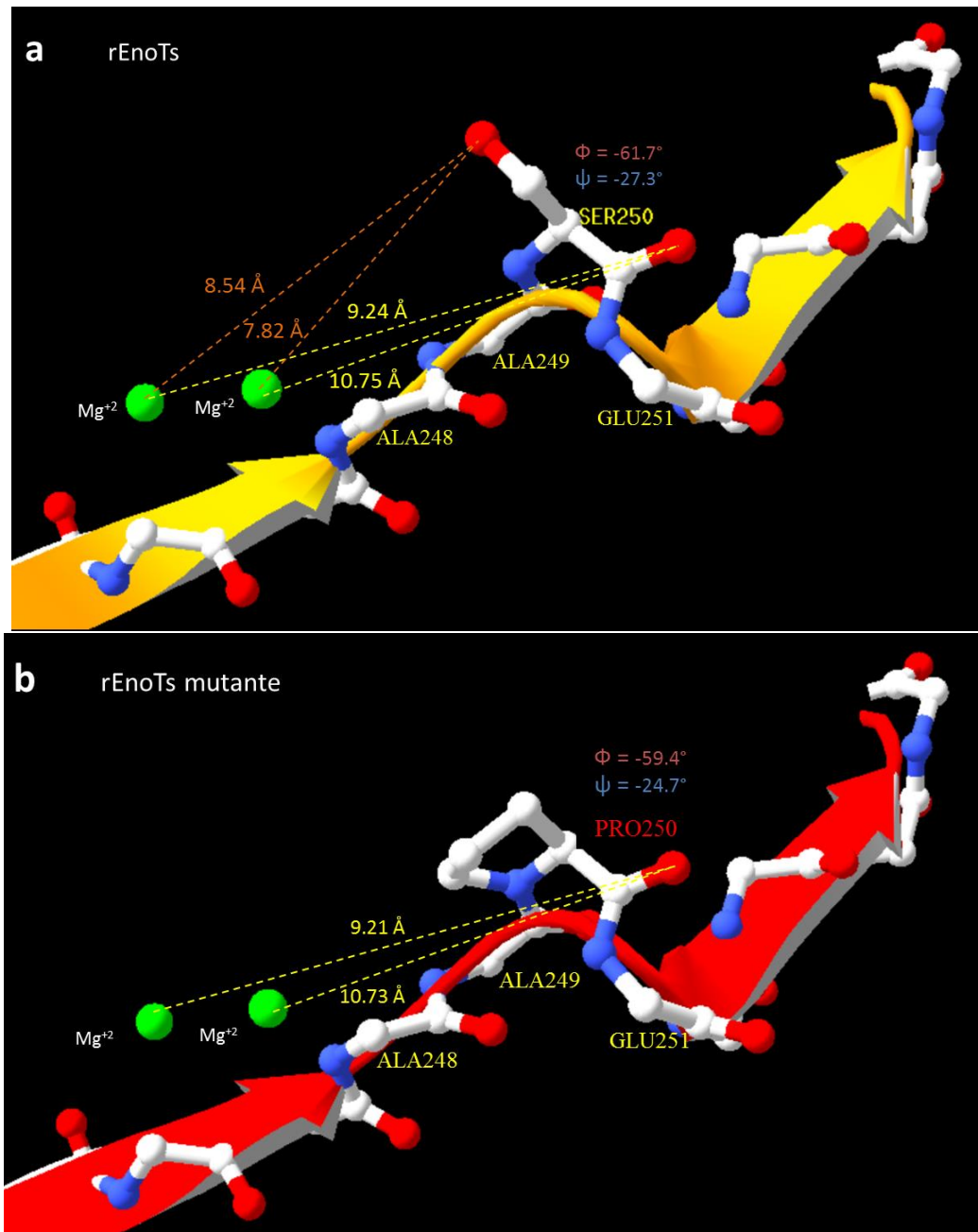


Figura 25. Variación en los ángulos diedros e interacciones metálicas de la mutación S250P. a) Medida de los ángulos diedros Φ y ψ y distancia de las interacciones metálicas entre los iones Mg⁺² con los grupos C=O y OH de SER250 en rEnoTs; b) Medida de los ángulos diedros Φ y ψ y distancia de las interacciones metálicas entre los iones Mg⁺² con el grupo C=O de PRO250 en rEnoTs mutante.

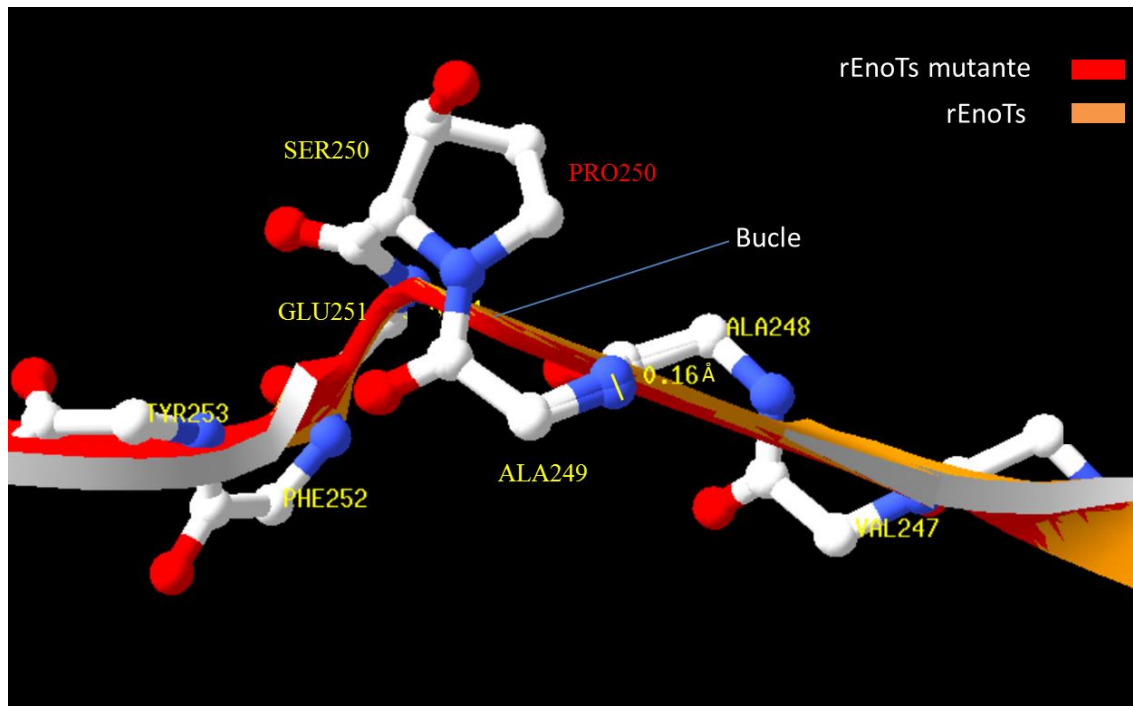


Figura 26. Desplazamiento del bucle de rEnoTs a nivel del esqueleto polipeptídico debido a la mutación S250P. Se muestran las estructuras secundarias sobrepuestas de rEnoTs (en naranja) y rEnoTs mutante (en rojo).

VII.1.9. PREDICCIÓN DE REGIONES TRANSMEMBRANA EN rEnoTs

Cuando se hizo la predicción de las regiones transmembrana de rEnoTs en el servidor TMpred se determinó que probablemente existe una hélice transmembrana de 18 residuos comprendida entre los residuos Gly105 y Ala122, con una puntuación de 813 considerada significativa por el servidor (superior a los 500). Con respecto a su topología, el centro de esta hélice transmembrana sería la Val115, teniendo una orientación preferente del segmento N-terminal hacia fuera de la membrana y el C-terminal hacia el interior. En la figura 27 se muestra la puntuación por residuo de rEnoTs y se comparan las orientaciones del segmento N-terminal. Por su parte, con el servidor TopPred 1.10 se determinó un segmento transmembrana putativo (puntuación 0.763) de 21 residuos, comprendido entre

Gly105 y Ala125. Asimismo se halló la topología que adoptaría rEnoTs de poseer esta región transmembrana: el primer segmento abarcaría desde el residuo 1 al 104 y sería extracelular, a continuación estaría el segmento transmembrana y por último el segmento citoplasmático entre los residuos 126 y 443 (Figura 28).

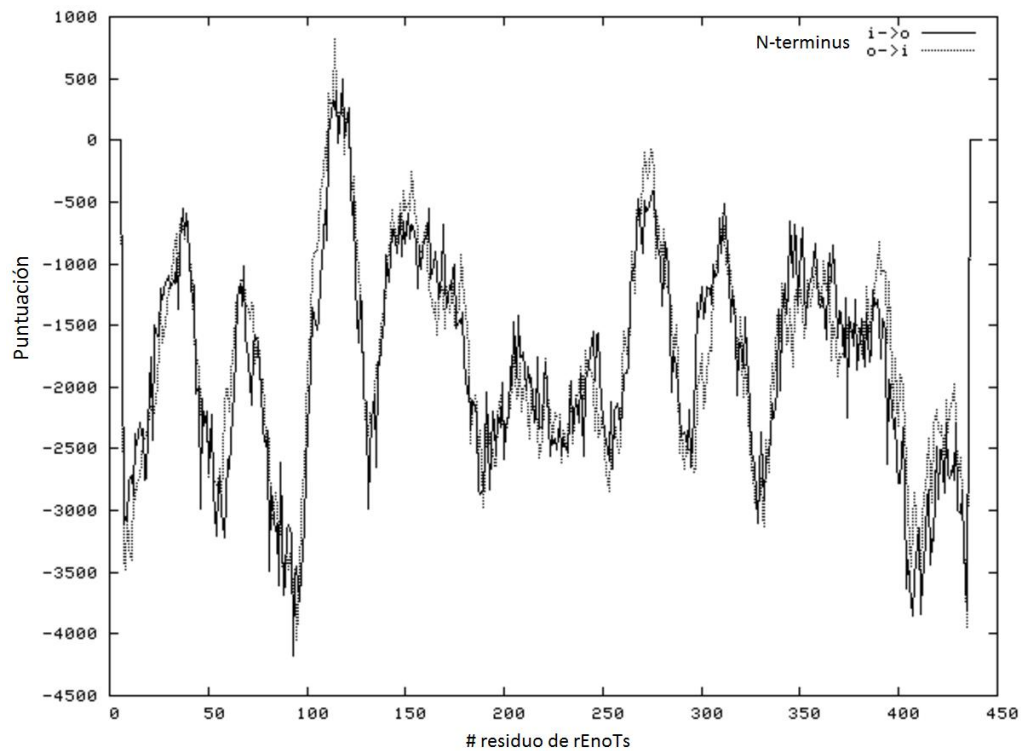


Figura 27. Resultados de la predicción de hélices transmembrana de rEnoTs por Tmpred. Se muestra la puntuación por residuo. Las líneas punteadas indican la orientación de fuera hacia dentro ($o > i$) y las líneas continuas de dentro hacia fuera ($i > o$) del N-terminal.

VII.1.10. PREDICCIÓN DE SEÑAL DE SECRECIÓN EN rEnoTs

Según la predicción del servidor SignalP versión 4.1 (91), rEnoTs no posee un péptido señal o señal de secreción en los primeros 70 residuos de su región N-terminal (zona más probable de ocurrencia), que puedan enviarla hacia una ruta de secreción (dentro de organelas, medio extracelular o hacia membranas celulares),

ya que su puntuación (0.10) fue inferior al umbral (0.45) de las proteínas con péptido señal.

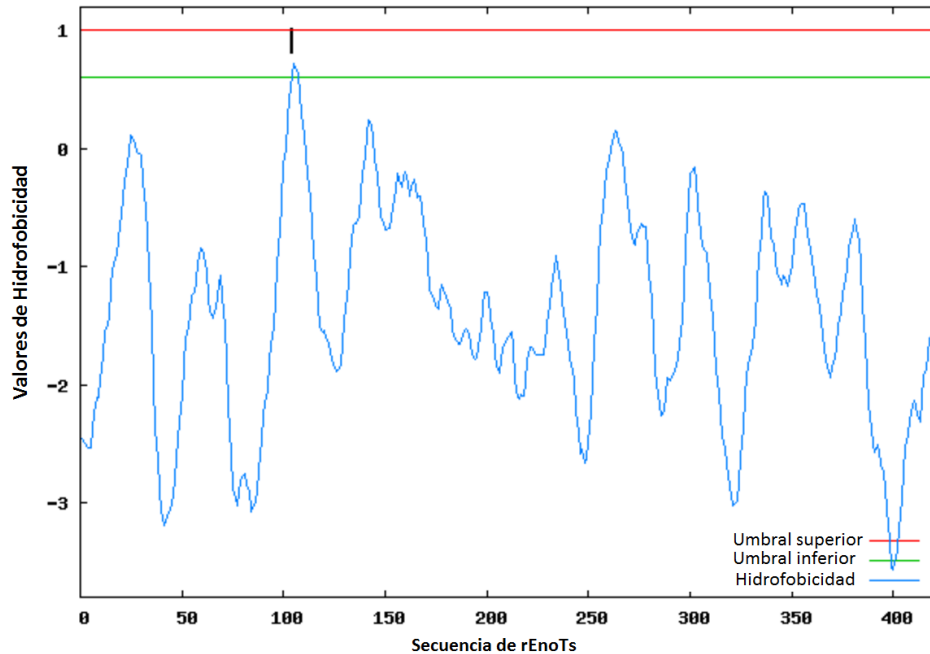


Figura 28. Predicción de segmento transmembrana de rEnoTs por TopPred 1.10. Se aprecian los valores de hidrofobicidad por cada residuo. La línea roja superior denota el umbral para segmentos transmembrana verdaderos, mientras que la línea verde inferior denota el umbral para segmentos transmembrana putativos.

VII.1.11. PREDICCIÓN DE EPÍTOPES DE CÉLULAS B EN rEnoTs

Los epítopes B lineales o continuos de rEnoTs fueron determinados por el servidor BepiPred 1.0 (92). Se encontraron un total de 19 conformaciones de epítopes B lineales a lo largo de toda la secuencia de rEnoTs, que van desde los 2 hasta los 18 residuos de longitud. Adicionalmente, se realizó la predicción de los epítopes B lineales de la enolasa alfa humana “2psn” con la finalidad de hacer una comparación entre los epítopes B lineales del parásito y el hospedero (Figura 29).

Se observaron algunas variaciones epitópicas en ciertas posiciones del alineamiento de rEnoTs y 2psn.

```

rEnoTs      MGSIQKI HARQIF DSRGNPTVEVDLITAKGMFRAAVPSGASTGVHEAVELRDGDKNAYMG
2psn       -MSILKIHAREIF DSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALELRDNDKTRYMG
          ** *****:***** **:*:*****:***:*** **  ***

rEnoTs      KGVLNAVKNVNEVIAPALLKEKFIVTDQEKIDEFMIRLDGSPNKGKLGANAILGVSIAVC
2psn       KGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLNVTEQEKIDKLMIEMDGTENKSKFGANAILGVSIAVC
          *** :*:.:*.:.*****:.*: **:*:***:.*:.*: **.*:*****

rEnoTs      KAGAAEKGV PLYRHIADLAGNKDVLVPSFNVNLGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAKNFT
2psn       KAGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPAFNVNLGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFR
          ****.*****:.*:.*:***:***:*****.*** **

rEnoTs      EAMKMGTEVYHHLKSVIKGYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMEGLELLKTAIDRAGYTGK
2psn       EAMRIGAEVYHNLKNVIKELYKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDK
          ***:.*:***.*.* ** ** ***** :* ***** :**** *

rEnoTs      VKIGMDVAASEFYQDGKYNLDFKNPAAAASSIVPGSKLAEIYLEMLSKYPIVSIEDPFDQ
2psn       VVIGMDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISP-DQIADLYKSFIKDYPVVSIEDPFDQ
          * *****:.*:***:***.* : * * .:***:* :.:.**:*:*****

rEnoTs      DDWAAWTAFAKAGIQIVGDDLTVTNPERVQQAIDKKACNALLKVNQIGSVTESIKACK
2psn       DDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLLLKVNQIGSVTESIQACK
          ***.* ** *.*****:*****:*: :*:.:*.*****:***

rEnoTs      MSRAAGWGMVSHRSGETEDSTIADIVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELG
2psn       LAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELG
          :.:* *****:***:*** *****

rEnoTs      SKAVYAGEHFRNPLYLEHHHHHH
2psn       SKAKFAGRNFRNPLAK-----
          *** :*:.*****

```

Figura 29. Comparación entre los epítopes B lineales de rEnoTs y la enolasa α humana “2psn”. Se muestra el alineamiento por Clustal Ω , en naranja claro se muestran los epítopes de rEnoTs y en naranja oscuro los de la enolasa α humana.

Por otro lado, los epítopes B conformacionales o discontinuos se predijeron mediante el servidor DiscoTope 2.0. (93). La puntuación final de cada residuo se calculó combinando su tendencia epitópica en su proximidad espacial y sus números de contactos (número de contactos entre el $C\alpha$ del residuo con los $C\alpha$ de otros residuos en un radio de 10\AA). El umbral de puntuación fue de -3.7, que involucra una sensibilidad de 0.47 y una especificidad de 0.75 para la detección de tales epítopes. Se pudieron determinar un total de 20 posibles residuos de

epítopes B conformacionales a lo largo de la secuencia de rEnoTs. De manera complementaria se realizó la predicción de los epítopes B conformacionales de la enolasa alfa humana “2psn”, con el objetivo de compararlos con los de rEnoTs (Figura 30). Se pudo apreciar que 2psn tuvo algunos más residuos de epítopes B conformacionales (32 en total) con respecto a rEnoTs.

En la figura 31 se aprecia el modelo dimérico de rEnoTs 3D donde se aprecia que existen epítopes B conformacionales que se encuentran conformados por residuos pertenecientes a distintas regiones de su secuencia, es decir que son discontinuos; por otro lado también existen los que están conformados por residuos continuos.

```

rEnoTs      MGSIQKI HARQIFDSRGNPTVEVDLTTAKGMFRAAVPSGASTGVHEAVELRDGDKNAYMG
2psn       -MSILKI HAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGLFRAAVPSGASTGIYEALERDNDKTRYMG
          ** *****:***** *::*:*****:***:*** ** . ***

rEnoTs      KGVLNAVKNVNEVIAPALLKEKFIVTDQEKIDEFMIRLDGSPNKGKLGANAILGVSLAVC
2psn       KGVSKAVEHINKTIAPALVSKKLVNTEQEKIDKLMIEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVC
          *** :*:::*.*****:.*: *::*****:***:***: **.*:*****

rEnoTs      KAGAAEKGVPLYRHIADLAGNKDVLPVPSFNVLNGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAKNFT
2psn       KAGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPAPFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFR
          **** .***** .:*:***:***:***** .** **

rEnoTs      EAMKMGTEVYHHLKSVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMEGLELLKTAIDRAGYTGK
2psn       EAMRIGAEVYHNLKNVIKEKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDK
          ***:.*:***.**.*** ** * ***** :* ***** :*** *

rEnoTs      VKIGMDVAASEFYQDGKYNLDFKNPAAAASSIVPGSKLAEIYLEMLSKYPIVSIEDPFDQ
2psn       VVIGMDVAASEFFRSGKYDLDFKSPDDPSRYISP-DQLADLYKSFIKDYPPVSIEDPFDQ
          * *****:.*:***:***.* : * * .:***:* .:..*:*:*****

rEnoTs      DDWAAWTAFNAKAGIQIVGDDLTVTNPERVQQAIDKKACNALLKVNQIGSVTESIKACK
2psn       DDWGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNEKSCNCLLLKVNQIGSVTESLQACK
          *** .** *.*.***:*****:.*: :*::*:*.* *****:***

rEnoTs      MSRAAGWGMVSHRSGETEDSTIADIVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEELG
2psn       LAQANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEEELG
          :::* *****:***:*** *****

rEnoTs      SKAVYAGEHFRNPLYLEHHHHHH
2psn       SKAKFAGRNFNRNPLAK-----
          *** :*.*.*****

```

Figura 30. Comparación de los epítopes B conformacionales de rEnoTs con los de 2psn (enolasa α humana). Se realizó el alineamiento por Clustal Ω . En amarillo se muestran los epítopes de rEnoTs y en verde los de la enolasa α humana.

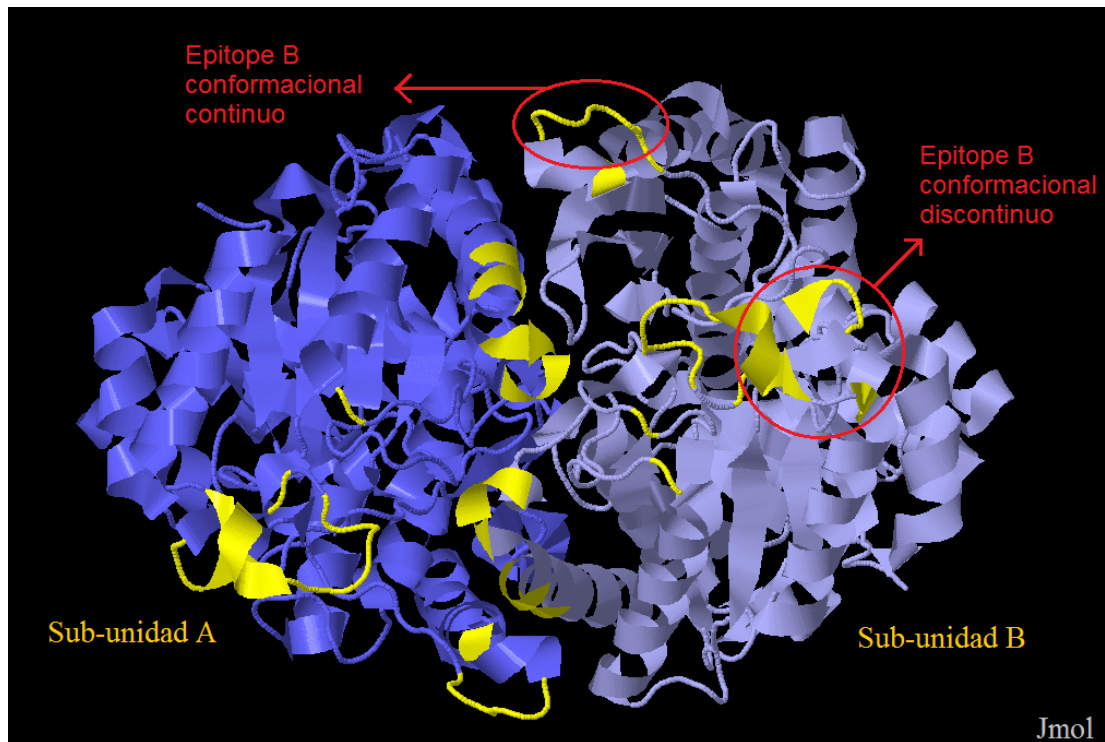


Figura 31. Epítopes B conformacionales del modelo dimérico de rEnoTs, predichos mediante DiscoTope 2.0. Se muestran en amarillo los epítopes B conformacionales, continuos (enmarcado en elipse) o discontinuos (enmarcado en círculo).

VII.2. OBTENCIÓN DE LA ENOLASA RECOMBINANTE DE *T. solium*

VII.2.1. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE ENOLASA DE *T. solium*

VII.2.1.1. Tamaño del amplicón de la enolasa madura de *T. solium*

Se determinó el tamaño del amplicón de la enolasa madura de *T. solium*, es decir el producto del PCR a partir del cDNA de la enolasa sin intrones (mRNA), mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 32). Para ello se corrió junto al amplicón el marcador de peso molecular “1 Kb plus DNA Ladder” de Invitrogen™. Por inspección visual se determinó que el tamaño aproximado

del amplicón era de 1350 pb, sin embargo para ser más exactos se utilizó el factor de migración de los ácidos nucleicos estándares del marcador, graficando el logaritmo de sus pesos moleculares vs la distancia recorrida por estos en el gel. De esta manera se generó una recta y por interpolación se determinó que el peso molecular (PM) del amplicón de la enolasa madura de *T. solium* fue de 1318 pb (Gráfica 1).

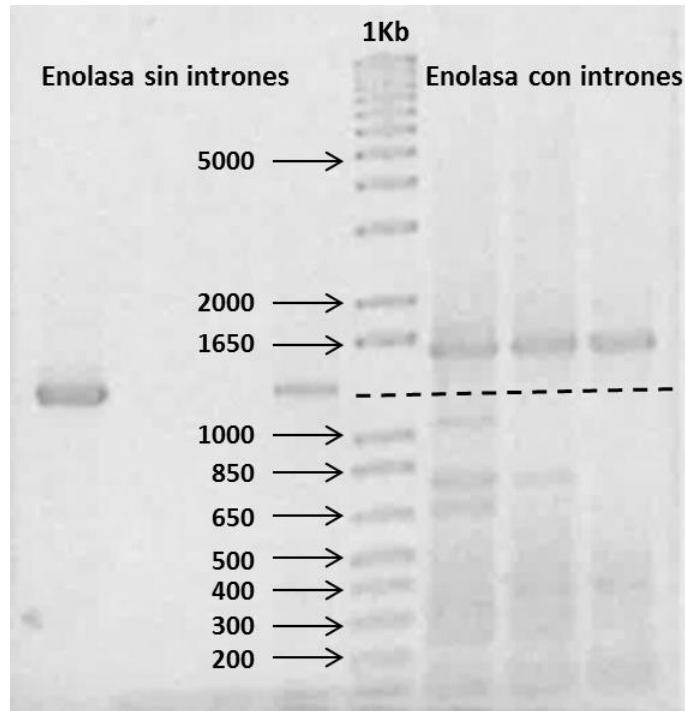
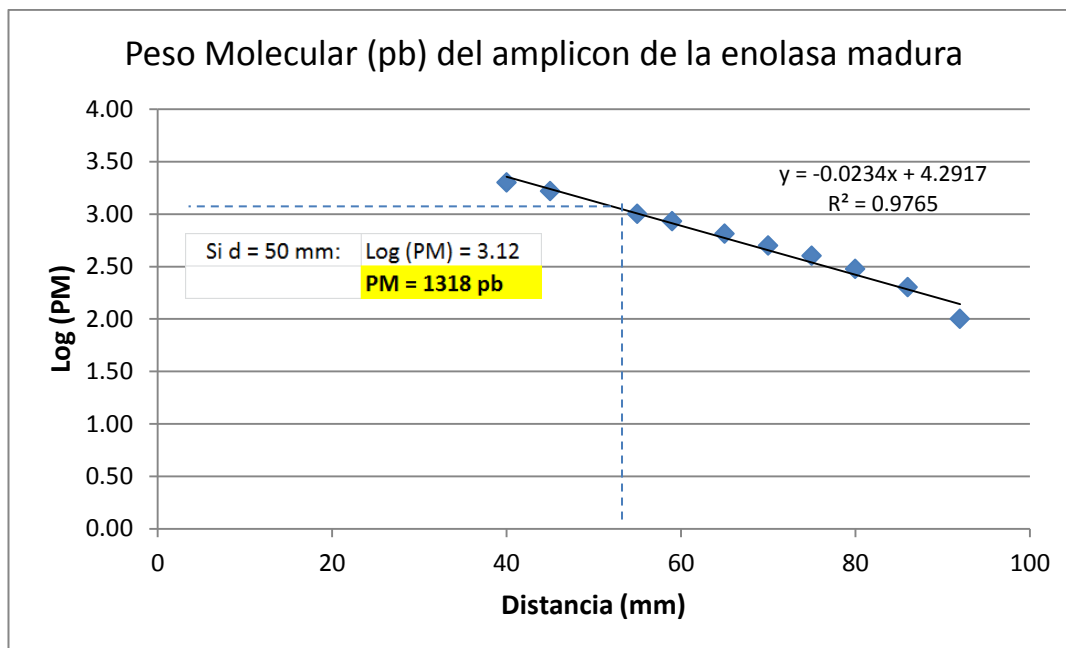


Figura 32. Electroforesis del amplicón de la enolasa de *T. solium* con y sin intrones. Se muestra el marcador de DNA 1 Kb plus, con sus pesos moleculares estándares. La línea punteada muestra el nivel del PM de la enolasa madura (sin intrones).



Gráfica 1. Determinación del peso molecular (PM) del amplicón de la enolasa madura de *T. solium* (sin intrones) de acuerdo a su factor de migración.

VII.2.1.2. Clonación del gen maduro de la enolasa de *T. solium* en *E. coli*

Luego de determinar el tamaño correcto del amplicón de la enolasa madura (EnoTs), se digirieron dichos amplicones y el pET-28a(+) con las enzimas *XhoI* y *NcoI*. Tras la digestión de EnoTs y pET-28a(+) se ligaron estos productos generándose el plásmido “pET-28a+EnoTs”, como se diagrama en la Figura 33.

Luego de generarse los plásmidos pET-28a+EnoTs, estos se transformaron por shock térmico a células competentes de *E. coli* cepa NovaBlue y se sembraron en placas de agar LB con kanamicina. En la placa solo crecieron las colonias transformantes puesto que el plásmido pET-28a+ les confiere resistencia kanamicina. Sin embargo las colonias de *E. coli* que crecieron en la placa podían ser transformantes de pET-28a+ o de pET-28a+EnoTs, por lo que se realizó un PCR colonia del gen de la enolasa de *T. solium* de varias colonias transformantes

para comprobar cuáles de ellas tenían el inserto EnoTs (Figura 34). Se observó que aproximadamente la mitad de las colonias transformantes contenían EnoTs. Posteriormente se hizo un repique de aquellas colonias transformantes de pET-28a+EnoTs para la extracción de sus plásmidos.

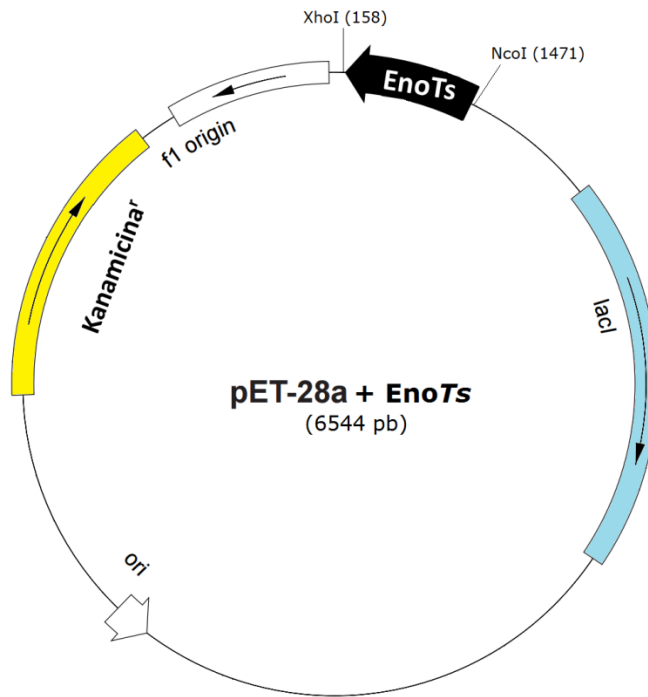


Figura 33. Diagrama del plásmido pET-28a+EnoTs generado tras la reacción de ligación de EnoTs con pET-28a(+). Este plásmido es de clonación y expresión

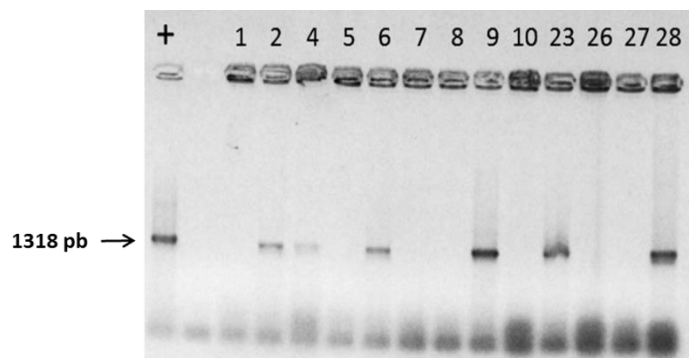


Figura 34. PCR del gen maduro EnoTs de las colonias transformantes de *E. coli* (resistentes a Kan). Control positivo de EnoTs (+). Cada número representa una colonia de *E. coli* diferente.

Para comprobar la inserción correcta del gen de la enolasa en el pET28a se realizaron digestiones con las enzimas *XhoI* y *NcoI* de los plásmidos pET-28a+EnoTs extraídos previamente. Se pudo apreciar que un 75% de los plásmidos pET-28a+EnoTs tenían los tamaños adecuados y el gen EnoTs insertado correctamente (Figura 35).

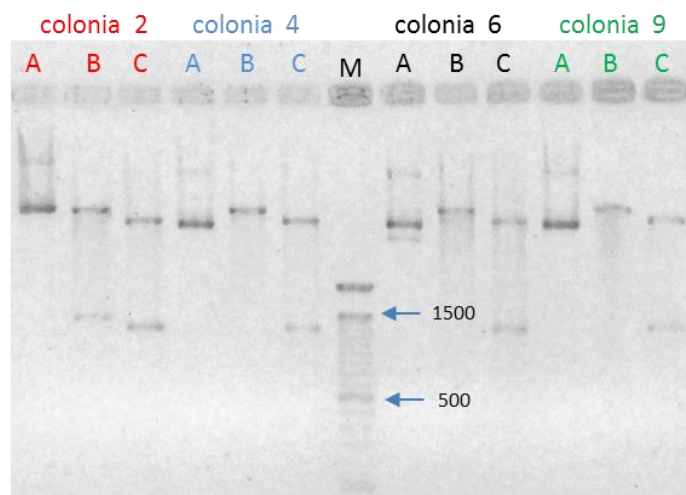


Figura 35. Digestión de plásmidos pET-28a+EnoTs provenientes de colonias transformantes de *E. coli*. A, sin digerir; B, digerido con *XhoI*; C, digerido con *XhoI* y *NcoI*; M: 100 bp DNA ladder (InvitrogenTM).

Los plásmidos pET-28a+EnoTs con la correcta inserción de EnoTs se secuenciaron y transformaron en células *E. coli* DE3 para expresar la enolasa.

VII.2.1.3. Transformación de células competentes *E. coli* cepas BL21 y Rosetta con los plásmidos recombinantes pET-28a+EnoTs

Una vez obtenidos, los plásmidos pET-28a+EnoTs se transformaron en células de *E. coli* de las cepas BL21 y Rosetta, obteniéndose colonias transformantes (Figura 36) a partir de las cuales se hicieron las subsiguientes expresiones.

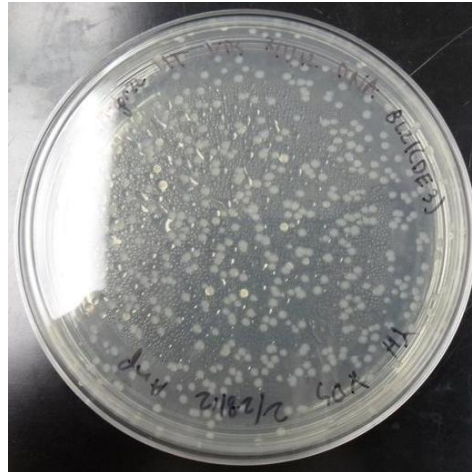


Figura 36. Colonias *E. coli* BL21 (DE3) transformantes de pET-28a+EnoTs

VII.2.1.4. Expresión de la enolasa recombinante de *T. solium*

A partir de las colonias transformantes con pET-28a+EnoTs se expresó la enolasa recombinante de *T. solium* (rEnoTs) a modo de prueba en un pequeño volumen (2.5 mL) de medio LB e inducida con 1mM de IPTG. La electroforesis de los extractos crudos de *E. coli* inducidos y sin inducir con IPTG para la expresión de rEnoTs se muestran en la Figura 37.

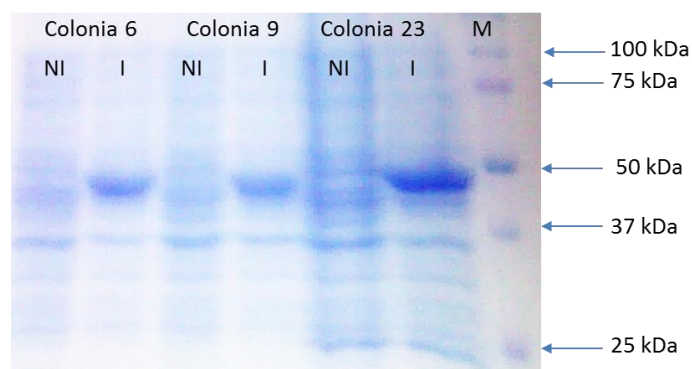


Figura 37. Electroforesis de los extractos de diferentes colonias de *E. coli* BL21 (DE3) inducida (I) y no inducida (NI) con IPTG para la expresión de rEnoTs. M, Dual Color Marker (BioRad).

Tras comprobar la expresión de rEnoTs en *E. coli* BL21 y Rosetta en un pequeño volumen de LB, se procedió con la expresión en mayor escala (500 mL), observándose un crecimiento bacteriano similar al de menor escala.

Luego de la expresión de rEnoTs se procedió a separar la fracción celular soluble e insoluble y se corrieron electroforéticamente, comprobándose que la rEnoTs se expresa básicamente a nivel citoplasmático, es decir que rEnoTs es una proteína recombinante soluble de un peso cercano a los 50 kDa (Figura 38).

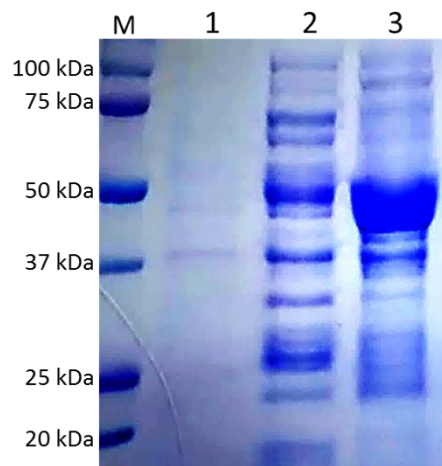


Figura 38. SDS PAGE 12% de las fracciones celulares de expresión de rEnoTs, clona 9. M: Dual Color marker, 1: no inducido, 2: fracción inducida insoluble, 3: fracción inducida soluble.

VII.2.2. PURIFICACIÓN Y CONCENTRACION DE rEnoTs

VII.2.2.1. Purificación de la enolasa recombinante mediante cromatografía de afinidad

Para purificar rEnoTs la fracción celular soluble se pasó a través de una columna de afinidad Ni-IDA. Tras la purificación se observó en el cromatograma que

rEnoTs caía a concentraciones de 100 y 300 mM de imidazol, observándose sus picos característicos (Figura 39). La rEnoTs de la clona 9 se obtuvo en un total de 10 fracciones de purificación (cada una de ellas de 5mL), 8 de 100 mM y 2 de 300 mM de imidazol. Al realizar un SDS PAGE 12% de las fracciones colectadas de 100 y 300 mM para comprobar la presencia de rEnoTs proveniente de la clona 9 se pudo determinar (por inspección visual) un alto grado de pureza en ambas fracciones, siendo la fracción de purificación de 300 mM la de mayor concentración (Figura 40).

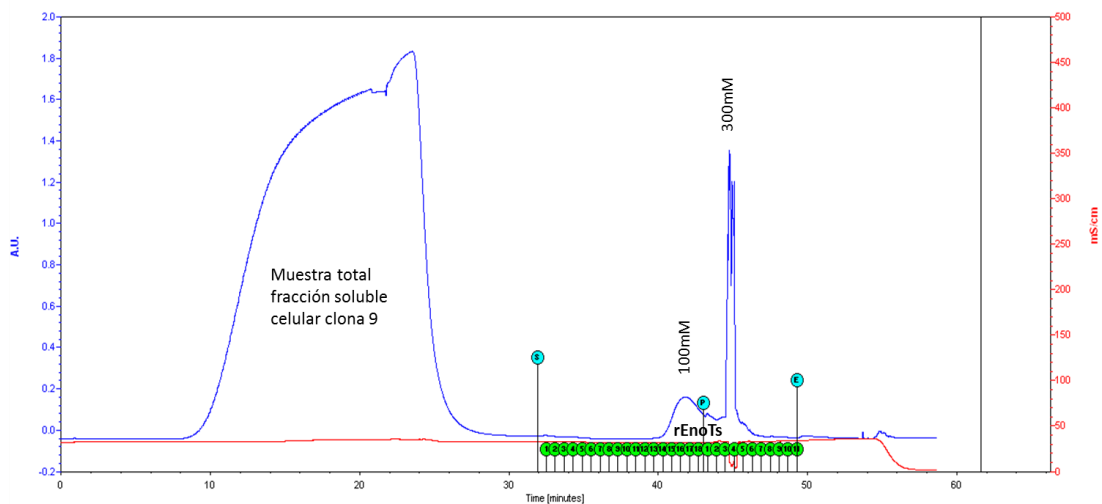


Figura 39. Cromatograma de la purificación de rEnoTs. Se muestran los picos característicos de la Absorbancia UV (A.U., línea azul) de rEnoTs clona 9 a 100 y 300 mM de imidazol. En rojo se aprecia la conductividad eléctrica constante.

VII.2.2.2. Concentración y cuantificación de la enolasa recombinante de *T. solium*

Las fracciones de purificación de 100 y 300 mM de imidazol se juntaron y se concentraron en Amicon®. Se obtuvo aproximadamente 10 mL de solución de

rEnoTs concentrada en Buffer PBS pH 7.4 y con 2.5 mM de imidazol. Se cuantificó la concentración de las rEnoTs provenientes de las clonas 6, 9 (sin mutaciones) y 23 (con mutaciones S41P y S250P), mediante el método Bradford, resultando concentraciones de 0.230, 0.960 y 0.470 mg/mL, respectivamente.

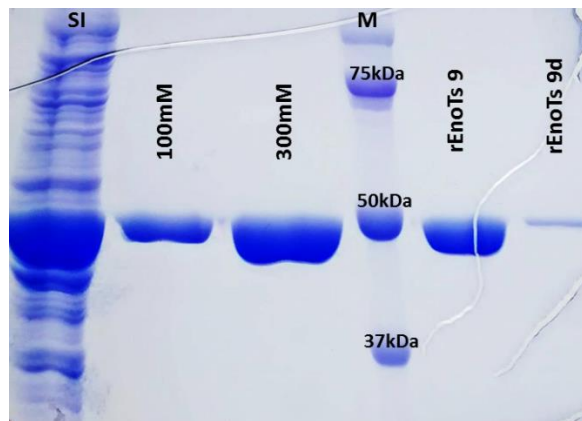


Figura 40. SDS PAGE 12% de las fracciones de purificación de rEnoTs clona 9. SI: fracción soluble inducida; M: dual color marker, se indica su banda de 50 kDa; 100 y 300 mM: concentración de imidazol de las fracciones de purificación; rEnoTs 9: rEnoTs clona 9 purificada y concentrada; rEnoTs 9d: rEnoTs 9 diluida 10 veces.

VII.2.2.2. Concentración y cuantificación de la enolasa recombinante de *T. solium*

Las fracciones de purificación de 100 y 300 mM de imidazol se juntaron y se concentraron en Amicon[®]. Se obtuvo aproximadamente 10 mL de solución de rEnoTs concentrada en Buffer PBS pH 7.4 y con 2.5 mM de imidazol. Se cuantificó la concentración de las rEnoTs provenientes de las clonas 6, 9 (sin mutaciones) y 23 (con mutaciones S41P y S250P), mediante el método Bradford, resultando concentraciones de 0.230, 0.960 y 0.470 mg/mL, respectivamente.

VII.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs

VII.3.1. CONDICIONES ÓPTIMAS DE ALMACENAMIENTO DE rEnoTs

En un principio se concentró a rEnoTs en buffer Tris-HCL 15mM pH 7.15, llevando al imidazol, contenido fracciones de purificación de rEnoTs, hasta una concentración final de 3mM y de esta manera se almaceno a -20°C. Sin embargo se pudo apreciar precipitación de rEnoTs cuando se descongelo esta solución. Por este motivo se decidió cambiar a buffer PBS pH 7.4 en los siguientes procesos de concentración y desalinización (disminución de la concentración de imidazol) evaluando distintas temperaturas de almacenamiento para cada fracción de imidazol donde se recuperó a rEnoTs. Tales condiciones se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de almacenamiento a corto plazo de rEnoTs en PBS pH 7.4

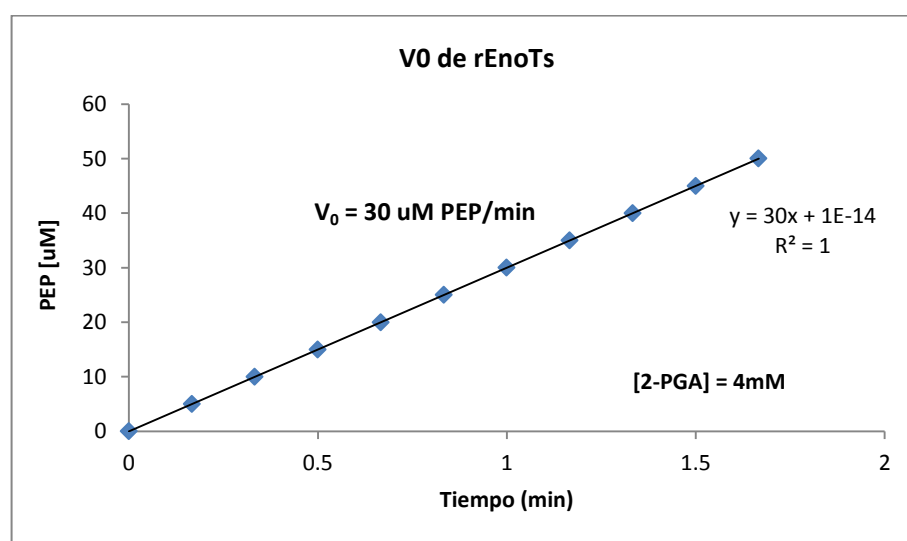
Método de desalinización	Fracción imidazol	Temperatura
AMICON	100mM (final: 5mM)	-70°C
		-20°C
		4°C
	300mM (final: 3mM)	-70°C
		-20°C
		4°C
DIALISIS	100mM	-70°C
		-20°C
		4°C

Se pudo apreciar que cuando se descongelaba la solución de rEnoTs (-20 o -70°C) esta se precipitaba en parte, por lo que su concentración disminuía a lo largo del tiempo de análisis. Por su parte en el tratamiento de 4°C hubo ausencia de precipitación visible. En cuanto al método de desalinización se optó por la ultra centrifugación en AMICON® puesto que en la diálisis no era posible estimar la

concentración de imidazol residual. Cuando se comparó la conservación de la concentración de rEnoTs en las fracciones de 100mM y 300mM en los primeros 45 días, se observó una ligera ventaja de la primera sobre la segunda. De esta manera se determinó que las mejores condiciones de almacenamiento a corto plazo de rEnoTs son a 4°C en buffer PBS pH 7.4 a partir de las fracciones de 100mM de imidazol concentradas por AMICON®. Los siguientes ensayos de actividad enzimática se realizaron con rEnoTs proveniente de la clona 9.

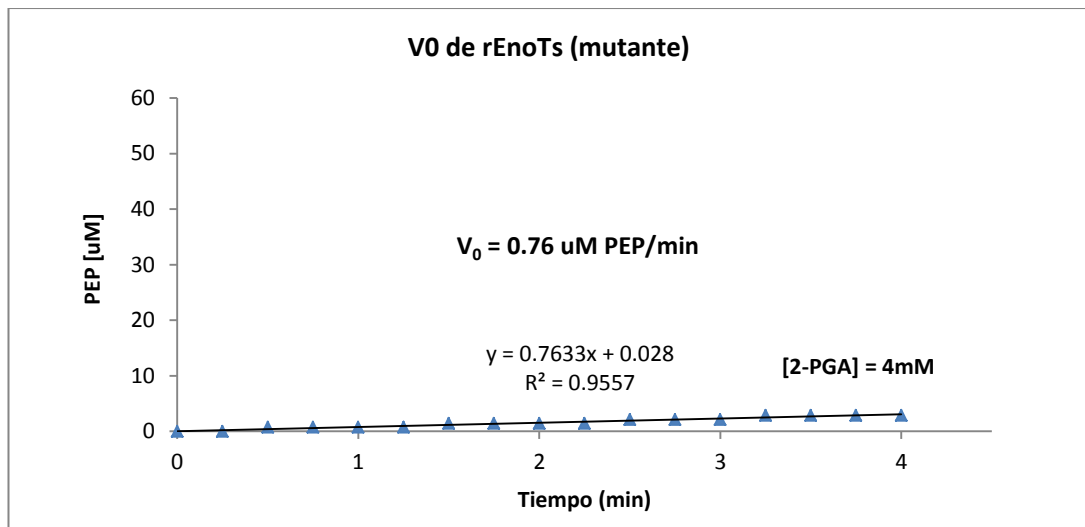
VII.3.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs

Para determinar la actividad enzimática de rEnoTs se realizó una curva de la concentración de PEP (uM) por unidad de tiempo (minutos), en condiciones saturantes de sustrato ([2-PGA] = 4mM). La pendiente de la Gráfica 2 equivale a la velocidad inicial (V_0), que fue de 30 uM PEP/min. Por su parte, la actividad enzimática específica de rEnoTs fue de 60 U/mg, y se determinó en base a la cantidad de proteína utilizada en la reacción. Cada punto representa el promedio de dos mediciones.



Gráfica 2. Actividad enzimática de rEnoTs en saturación de sustrato ([PGA] = 4mM).

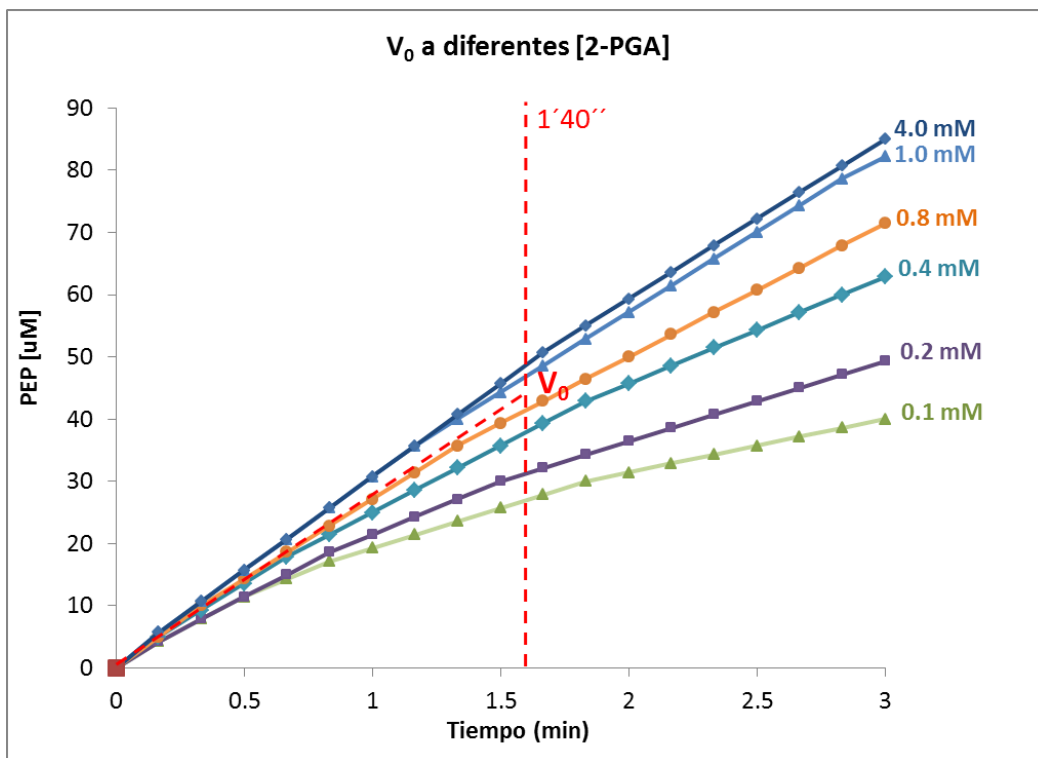
Adicionalmente, se calcularon estas mismas variables para el caso de rEnoTs mutante (proveniente de la clona 23, con S41P y S250P), obteniéndose una V_0 de 0.76 $\mu\text{M PEP}/\text{min}$, mientras que la actividad enzimática específica fue de 0.38 U/mg (Gráfica 3).



Gráfica 3. Actividad enzimática de rEnoTs mutante en saturación de sustrato ($[\text{PGA}] = 4\text{mM}$).

VII.3.3. MEDICIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Se variaron las concentraciones del sustrato (2-PGA), de 0.1 a 4.0 mM , y se hallaron sus velocidades iniciales (V_0) respectivas. Los datos de la cinética enzimática se tomaron hasta el minuto con cuarenta segundos ($1' 40''$) ya que en ese lapso de tiempo la pendiente (V_0) se mantenía relativamente constante para las distintas condiciones de concentración de 2-PGA (Gráfica 4).

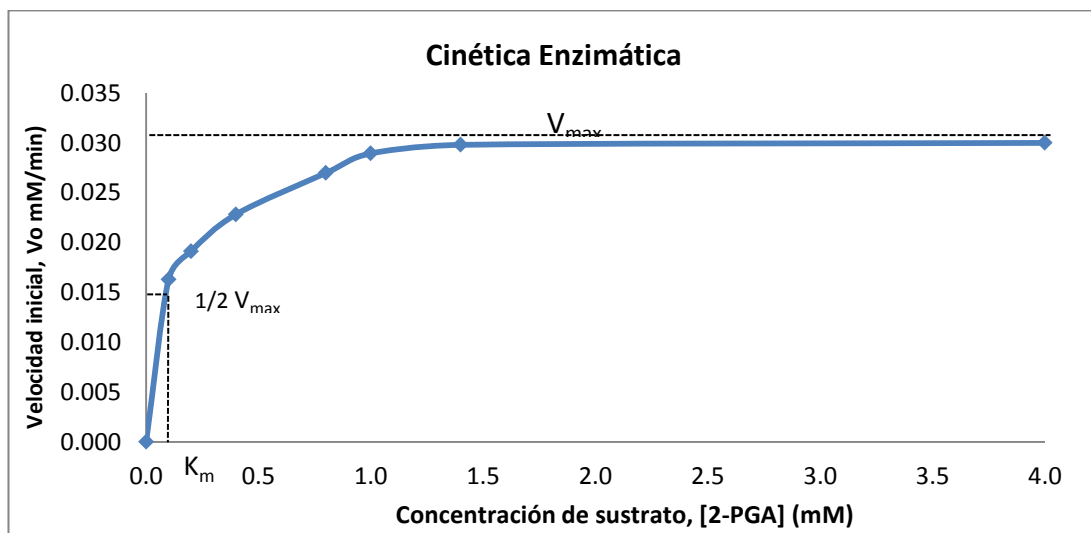


Gráfica 4. Velocidad inicial (V_0) de reacción de rEnoTs a diferentes concentraciones de 2-PGA. La línea roja denota el punto óptimo para tomar las diferentes V_0 .

En base al cálculo de las velocidades iniciales (V_0) para cada concentración de sustrato [0.1 - 4.0 mM] se hallaron los siguientes datos, los cuales servirán de base para los gráficos posteriores:

[2-PGA] (mM)	V_0 (mM.min ⁻¹)	$V_0/[2-PGA]$ (min ⁻¹)	1/[2-PGA] (mM ⁻¹)	1/ V_0 (min.mM ⁻¹)
0.0000	0.0000	---	---	---
0.1000	0.0163	0.1629	10.0000	61.4024
0.2000	0.0191	0.0957	5.0000	52.2739
0.4000	0.0228	0.0571	2.5000	43.8001
0.8000	0.0270	0.0337	1.2500	37.0645
1.0000	0.0289	0.0289	1.0000	34.5447
1.4000	0.0298	0.0213	0.7143	33.5514
4.0000	0.0300	0.0075	0.2500	33.3333

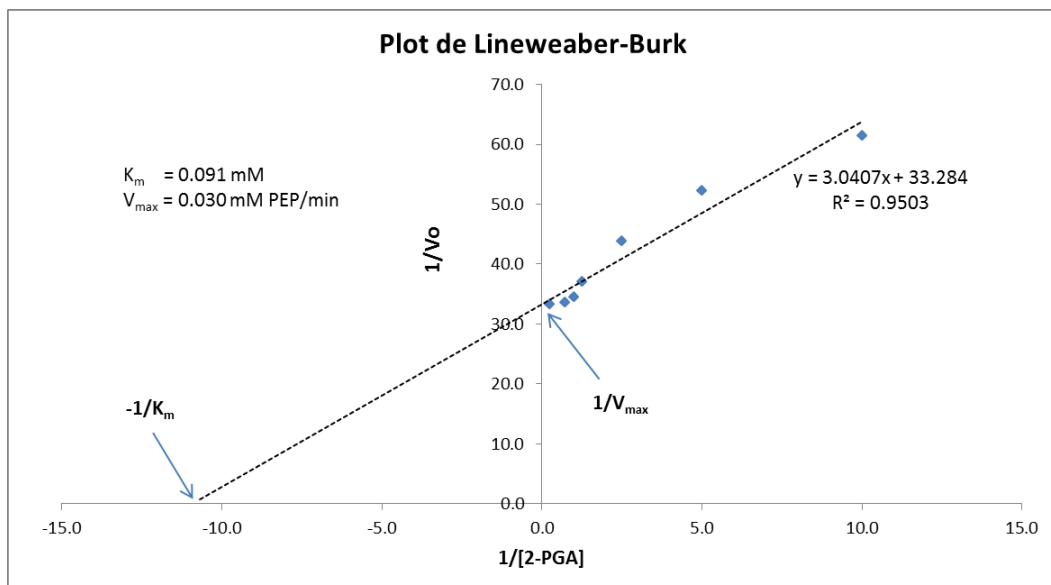
Se graficaron las velocidades iniciales V_0 respecto a sus concentraciones de sustrato 2-PGA. De esta manera se pudo determinar que rEnoTs sigue una típica cinética de Michaelis-Menten (Gráfica 5).



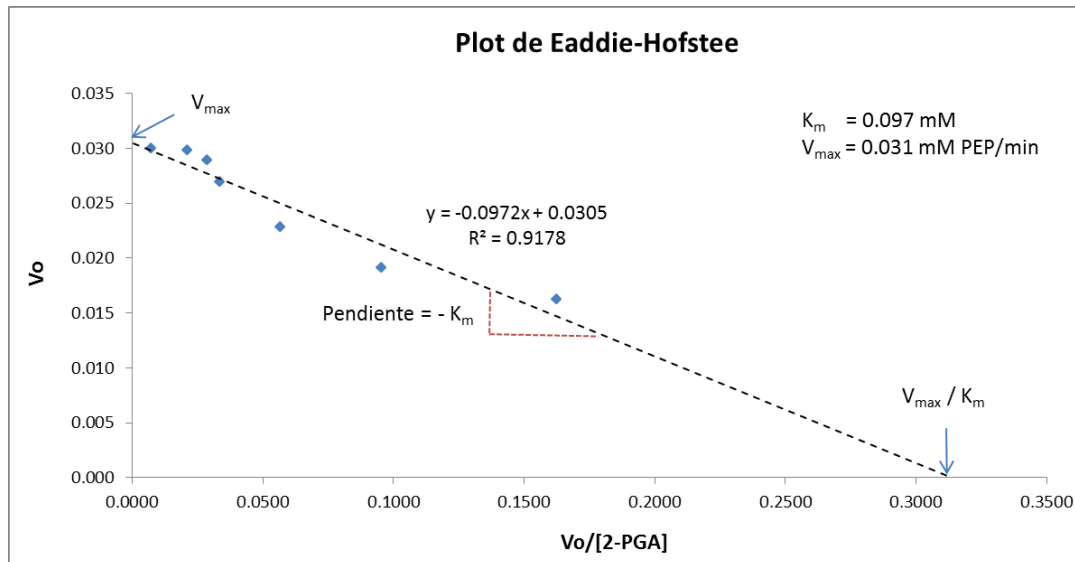
Gráfica 5. Cinética enzimática Michaeliana de rEnoTs. K_m representa la concentración del sustrato 2-PGA con la cual se ha alcanzado una velocidad de reacción enzimática igual a la mitad de la velocidad máxima (V_{max}).

El diagrama de Lineweaver-Burk en base a las inversas de V_0 y 2-PGA (Gráfica 6) sirvió para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} que resultaron ser de 0.091 mM y 0.030 mM PEP / min, respectivamente.

Para complementar, se calcularon el K_m y V_{max} en base al Plot de Eadie-Hofstee (Gráfica 7). De la gráfica se determinó que el K_m fue de 0.097 mM, mientras que la V_{max} resultó ser de 0.031 mM PEP / min.



Gráfica 6. Plot de Lineweaver-Burk. Se muestra la ecuación de la recta y R^2 . La intercepción con el eje Y representa a $1/V_{max}$ y la prolongación de la curva hasta el eje X representa a $-1/K_m$.



Gráfica 7. Plot de Eadie-Hofstee. Se muestra la ecuación de la recta y R^2 . La intercepción con el eje Y representa a V_{max} , mientras que la pendiente de la curva representa a $-K_m$.

Los siguientes parámetros cinéticos fueron calculados a partir de los datos generados por la gráfica de Lineweaver-Burk, es decir $K_m = 0.091$ mM y $V_{max} = 0.030$ mM PEP / min, puesto que su índice de correlación fue mayor ($R^2 = 0.9503$). Considerando que la concentración de rEnoTs ([rEnoTs]) en 1mL (volumen de la reacción) fue igual a 10^{-2} uM, se calculó la constante catalítica k_{cat} o número de recambio a partir del cociente de $V_{max}/ [rEnoTs]$, resultando ser de $3004.447 \text{ min}^{-1}$ o 50.074 s^{-1} . Finalmente, conocidos los parámetros k_{cat} y K_m se pudo evaluar la eficiencia catalítica de rEnoTs mediante que el cociente k_{cat}/K_m que resulto ser de $5.503 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En general, tanto la actividad enzimática como los parámetros cinéticos calculados para rEnoTs son comparables con las de distintas enolasas listadas en la tabla 2.

VII.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs

VII.4.1. RECONOCIMIENTO DE rEnoTs POR LOS SUEROS PRE Y POST-INMUNE DE CONEJO

Mediante el ensayo de Inmunoblot o Western Blot se pudo determinar la reactividad del suero de conejo post inmune con la enolasa recombinante de *T. solium*. En la figura 41 se puede observar el reconocimiento de rEnoTs (banda de aproximadamente 47 kDa) por parte los anticuerpos policlonales generados en el animal inmunizado luego de las 4 dosis de esta proteína.

En el ensayo de Inmunoblot se evaluaron diferentes cantidades de rEnoTs, que variaron desde los 200 ng hasta los 12.5 ng de proteína por pocillo, siendo 50 ng la cantidad mínima de proteína que pudo ser detectada por el suero del conejo

inmunizado para las condiciones dadas. Por otro lado, se observó que no existe reconocimiento de rEnoTs por el suero del animal no inmunizado.

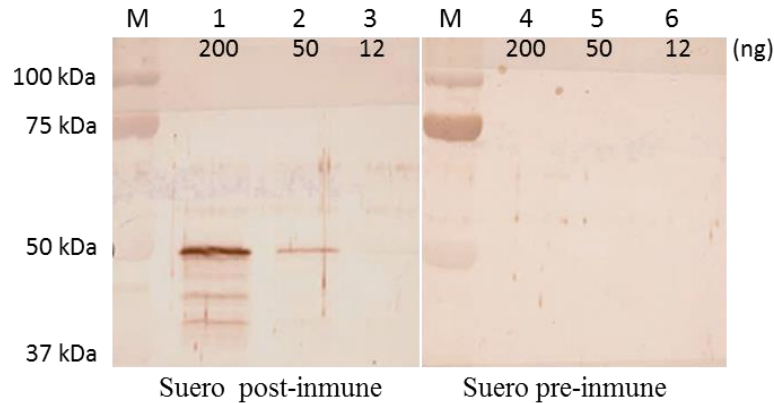


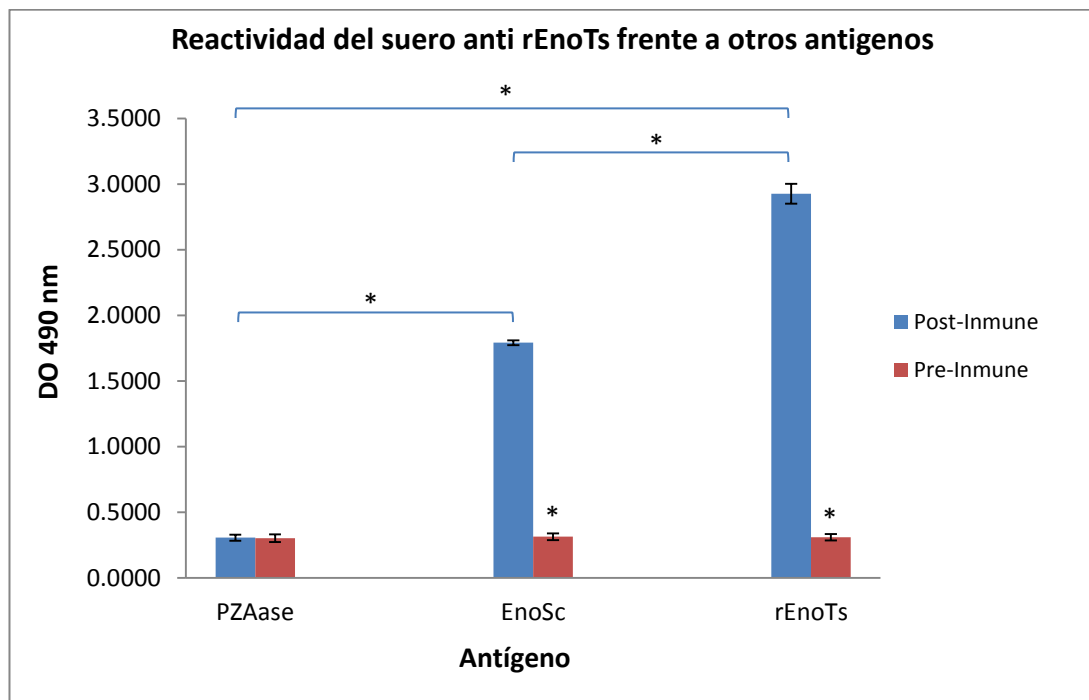
Figura 41. Ensayo de Western Blot de rEnoTs. M: marcador Dual Color (BIORAD); Pozos 1, 2 y 3: diferentes cantidades de rEnoTs en nanogramos (ng) incubadas con suero de conejo inmunizado con rEnoTs (Dilución: 1/500); Pozos 4, 5, y 6: el mismo arreglo previo incubado con suero de conejo no inmunizado (Dilución: 1/500).

De esta manera se pudo determinar que rEnoTs es una proteína inmunogénica capaz de levantar una respuesta inmune humoral en el conejo luego de su aplicación sistemática en 4 dosis repetitivas.

VII.4.2. REACTIVIDAD DEL SUERO ANTI-rEnoTs FRENTE A OTROS ANTÍGENOS

Al evaluar la reactividad de los anticuerpos policlonales de conejo anti-rEnoTs (suero Post-inmune) frente a la pirazinamidasa de *M. tuberculosis* (PZAase) y la enolasa nativa de *S. cerevisiae* (EnoSc) en comparación con rEnoTs se encontró una clara diferencia en el reconocimiento. Siendo el reconocimiento del suero anti-rEnoTs fuerte para rEnoTs, moderado para EnoSc y leve o nulo para PZAase.

Se hallaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre el reconocimiento de PZAase con EnoSc y rEnoTs, y de EnoSc en comparación con rEnoTs (Gráfica 8). Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre el reconocimiento de los sueros Pre y Post-inmune por los antígenos rEnoTs y EnoSc pero no por PZAase.



Gráfica 8. Reactividad de los anticuerpos policlonales de conejo anti rEnoTs (Post-inmune) frente a tres antígenos diferentes en comparación con el suero Pre-inmune. Se muestran las desviaciones estándar en cada grupo. Los asteriscos sobre las barras denotan diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre el reconocimiento de los grupos Pre y Post-inmune por su antígeno. Adicionalmente, se muestran las diferencias significativas entre el reconocimiento de los antígenos por el suero Post-inmune mediante asteriscos sobre líneas horizontales. PZAase, pirazinamidasas recombinantes de *M. tuberculosis*; EnoSc, enolasa nativa de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich®); rEnoTs, enolasa recombinante de *T. solium*. La Densidad Óptica (DO) del lector de ELISA fue 490 nm y la temperatura 23.3°C.

VII.4.3. LOCALIZACIÓN DE LA ENOLASA NATIVA EN CISTICERCOS

Los anticuerpos anti rEnoTs generados en el conejo inmunizado reaccionaron con el control positivo, que en este caso fue rEnoTs expresada en *E. coli* (fracción entera), y no con el control negativo de BSA (300 ng), por lo que se deduce que los anticuerpos generados en conejo son específicos para rEnoTs. La ausencia de anticuerpos anti rEnoTs en el suero del conejo pre inmune se pudo evidenciar por la falta de reacción con las distintas muestras (figura 42). Por otro lado, los anticuerpos anti rEnoTs pudieron reconocer a la enolasa nativa del cisticerco de *T. solium* en las diferentes fracciones evaluadas, como un banda de aproximadamente 47 kDa, cuyo tamaño coincidió con el de rEnoTs expresada en *E. coli*, confirmando su especificidad. Según estos resultados la enolasa nativa del cisticerco de *T. solium* se estaría expresando a nivel de citosol y membrana celular; y a nivel del fluido vesicular, como productos de excreción y secreción.

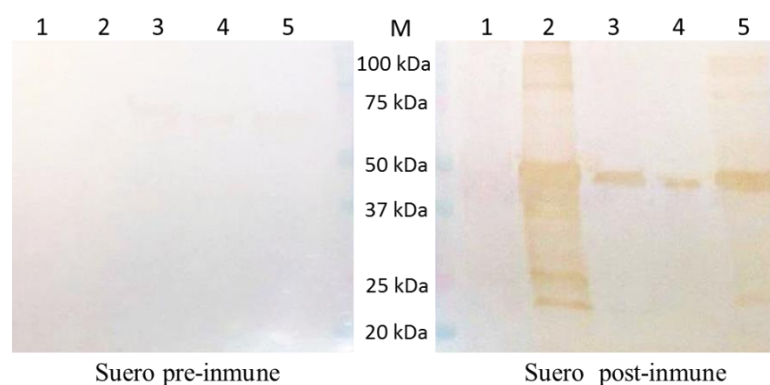


Figura 42. Localización de la enolasa nativa en cisticercos de *T. solium*. 1: BSA (300 ng). 2: rEnoTs expresada en *E. coli* sin purificar. 3: Sobrenadante de extracto de cisticerco de *T. solium* luego del sonicado y centrifugado (Fracción celular soluble). 4: Pellet de extracto de cisticerco (resuspendido en Urea 8M) luego del sonicado y centrifugado (Fracción celular insoluble). 5: Fluido de cisticerco. M: Dual Color Marker.

VII.5. EVALUACIÓN DE rEnoTs EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA

VII.5.1. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE INMUNOBLOT DE rEnoTs CON SUEROS HUMANOS.

VII.5.1.1. Ensayo de inmunoblot N°01

Mediante este ensayo se comprobó la reproducibilidad del ensayo de inmunoblot en nuestro laboratorio, siguiendo el protocolo (con ciertas modificaciones) del INCN. Por otro lado se comprobó el reconocimiento del antígeno rEnoTs por el *pool* (+) de sueros de pacientes con neurocisticercosis.

VII.5.1.2. Ensayo de inmunoblot N°02

Con este ensayo se determinó que las soluciones de BSA al 3% y leche en polvo al 5% (marca Gloria) en PBS Tween-20 (0.3%) son igual de efectivas para bloquear las membranas de nitrocelulosa transferidas con rEnoTs. No se observó ruido de fondo.

VII.5.1.3. Ensayo de inmunoblot N°03

En esta prueba se optimizó el reconocimiento del antígeno rEnoTs por los sueros de humanos con NCC, lo que se vio reflejado en una banda específica más nítida. Este resultado también puede haber estado influenciado por el mayor tiempo de exposición al anticuerpo secundario conjugado. Cuando se compararon las diluciones se observó que la dilución de 1:4000 producía una reactividad muy baja (bandas tenues), mientras que la de 1:1000 y 1:500 resultaron ser adecuadas.

VII.5.1.4. Ensayo de inmunoblot N°04

Mediante este ensayo se determinó que se da un mejor reconocimiento de rEnoTs por los anticuerpos del suero de pacientes con NCC cuando ésta se encuentra desnaturalizada por acción del agente caotrópico DTT. Asimismo se observó que el hervir la solución de rEnoTs con el buffer de carga Sample 2X, contribuye a su desnaturalización (Figura 43)

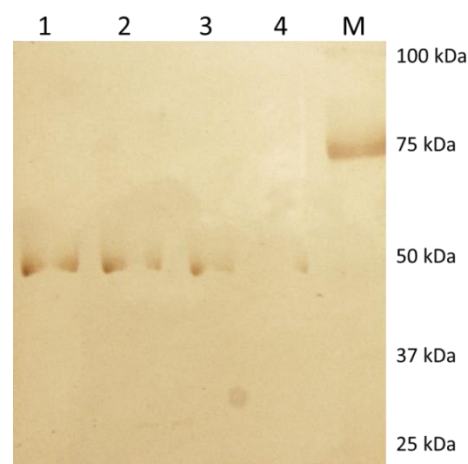


Figura 43. Ensayo de inmunoblot de rEnoTs (250ng) con un *pool* de sueros positivos de NCC (dilución 1:1000). Línea 1: antígeno hervido y con DTT; línea 2: antígeno con DTT; línea 3: antígeno hervido; y línea 4: antígeno sin tratamiento. M: Dual Color Marker (BioRad).

VII.5.1.5. Ensayo de inmunoblot N°05

En este ensayo adicional se pudo apreciar una electroforesis más uniforme en el PAGE desnaturalante respecto al PAGE no desnaturalante, lo que se manifestó en una mejor transferencia de rEnoTs. Como se aprecia en la Figura 44, rEnoTs se encuentra como una banda más definida en el PAGE desnaturalante, mientras que en su contraparte se aprecia unas bandas difusas correspondientes a rEnoTs

además de ruido de fondo. Es de notar que el patrón de migración de rEnoTs varía entre ambas condiciones.

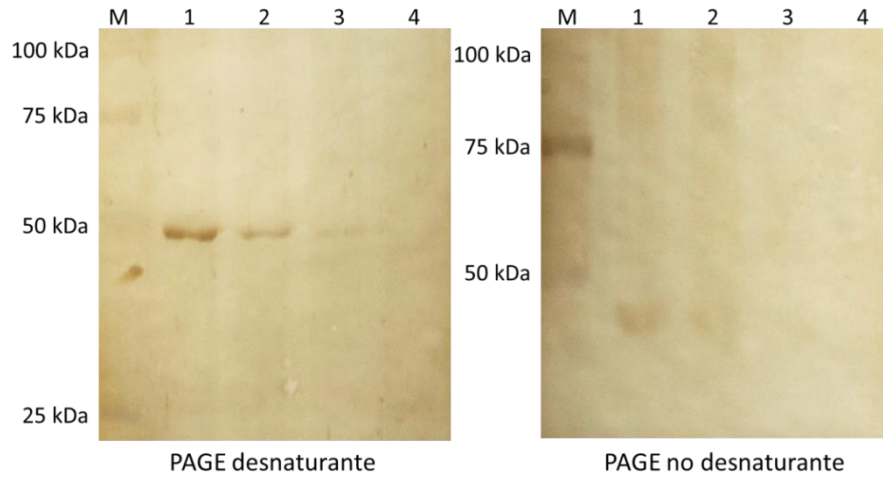


Figura 44. Ensayo de inmunoblot de rEnoTs con un *pool* de sueros positivos de NCC en condiciones desnaturalantes y no desnaturalantes. Línea 1: 250 ng de rEnoTs; línea 2: 125 ng de rEnoTs; línea 3: 62.5 ng de rEnoTs; y línea 4: 31.25 ng de rEnoTs. M: Dual Color Marker (BioRad).

Luego de evaluar los ensayos previos se optó por seguir con las condiciones del ensayo N°03 (dilución de los sueros 1:500) para los ensayos posteriores con las tiras inmunocromatográficas. La figura 45 muestra el ensayo de inmunoblot con sueros humanos positivos de NCC estandarizado para rEnoTs, se aprecia que el límite de detección (LOD) de los anticuerpos es de 62.5 ng de rEnoTs bajo estas condiciones.

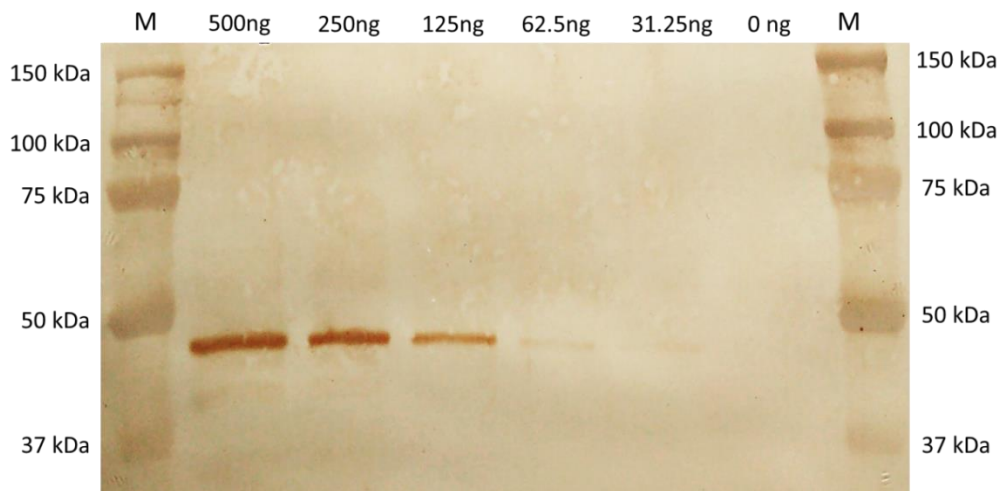


Figura 45. Inmunoblot de rEnoTs estandarizado con un *pool* de sueros positivos de NCC. Se evalúan distintas cantidades de rEnoTs (en nanogramos). M: Dual Color Marker (BioRad).

VII.5.2. EVALUACIÓN DE TIRAS INMUNOCROMATOGRÁFICAS CON rEnoTs PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA

VII.5.2.1. Ensayo piloto de inmunodiagnóstico de NCC con sueros de pacientes peruanos

Tras evaluar distintas cantidades de antígeno se optó por trabajar con 125 ng de rEnoTs, puesto que el reconocimiento de rEnoTs por los sueros positivos fue óptimo. En estas condiciones se halló que todos los sueros positivos de neurocisticercosis reconocieron al antígeno, resultando en una alta sensibilidad de 100% (10 de 10; IC: 95% [100%]). Por otro lado, se evidenció una apreciable reacción cruzada debido a que la mayoría de sueros negativos de neurocisticercosis reaccionaron con rEnoTs, es decir fueron falsos positivos, resultando en una baja especificidad de 35% (7 de 20; IC: 95% [15.06% - 54.94%]).

Asimismo, se pudo apreciar un reconocimiento diferencial por el antígeno, que se tradujo como bandas de distinta intensidad (Figura 46).



Figura 46. Western Blot de tiras inmunocromatográficas con rEnoTs (125 ng) enfrentadas a sueros de pacientes con NCC (+) y sin NCC (-). La presencia de la banda parda revela el reconocimiento de rEnoTs por los anticuerpos del suero.

VII.5.2.2. Evaluación del inmunodiagnóstico de NCC con sueros peruanos y extranjeros

En este ensayo se evaluaron 250, 125, 62.5 y 31.25 ng de rEnoTs. Al comparar el reconocimiento del *pool* de sueros de pacientes peruanos positivos de NCC con el de los sueros de individuos extranjeros sanos por rEnoTs no se apreció reacción alguna de estos últimos (0/2) para cualquiera de las cantidades evaluadas del antígeno, resultando ser negativos para esta prueba (Figura 47).

Al igual que en el caso anterior, se determinó que utilizando 125 ng de rEnoTs se obtiene una mejor resolución del ensayo.

VII.5.2.3. Prueba de reacción cruzada con otra cestodiasis

La prueba de reacción cruzada con un suero de hidatidosis dio positiva, es decir que rEnoTs está siendo reconocida como antígeno por los anticuerpos generados en el suero de un paciente con hidatidosis. Para este caso, al igual que en el anterior, el LOD de rEnoTs resulto ser de 62.5 ng. Para hacer la comparación en esta prueba se utilizó como control negativo el suero de un paciente sano que en el ensayo anterior no había reaccionado con rEnoTs, mientras que el control positivo fue el *pool* de sueros de pacientes peruanos positivos de NCC (Figura 48).

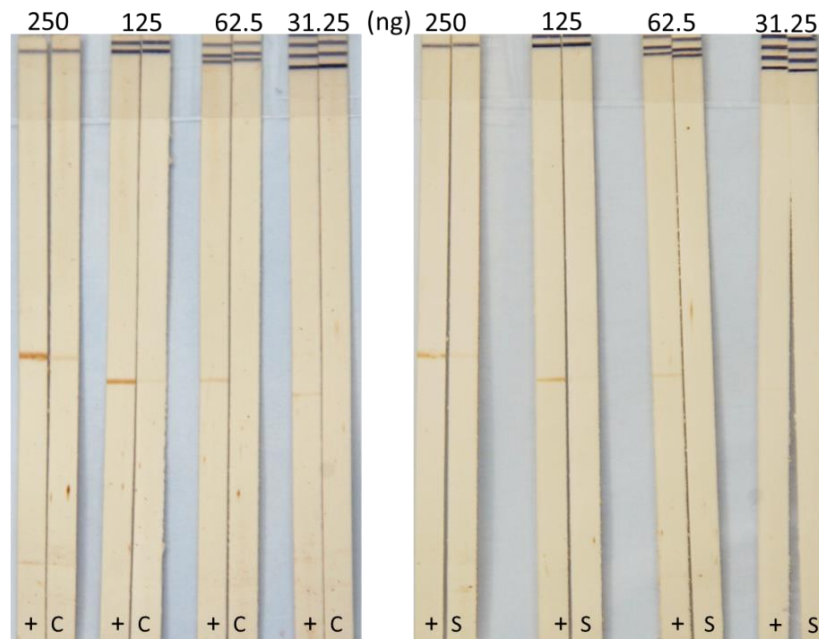


Figura 47. Western Blot de tiras inmunocromatográficas con diferentes cantidades de rEnoTs (250, 125, 62.5 y 31.25 ng) enfrentadas a un *pool* de sueros de pacientes peruanos positivos de NCC (+) y sueros individuales de voluntarios extranjeros sanos (S y C).

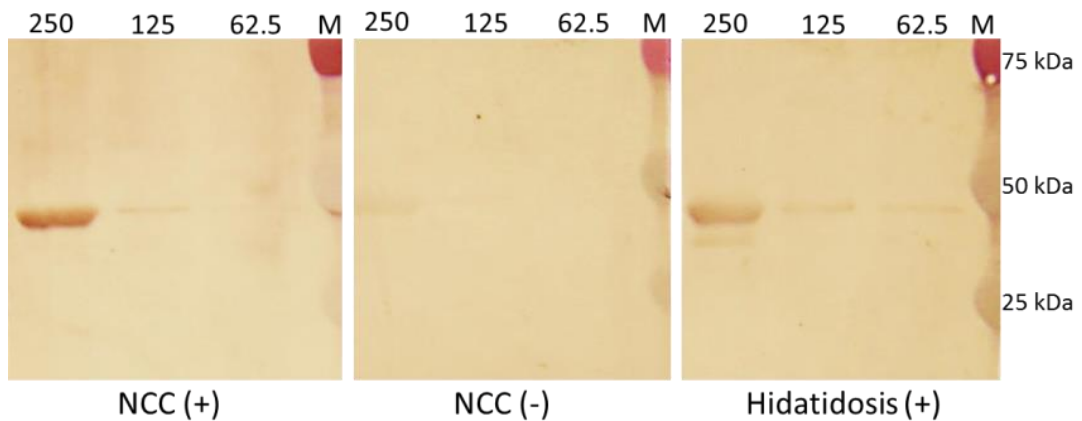


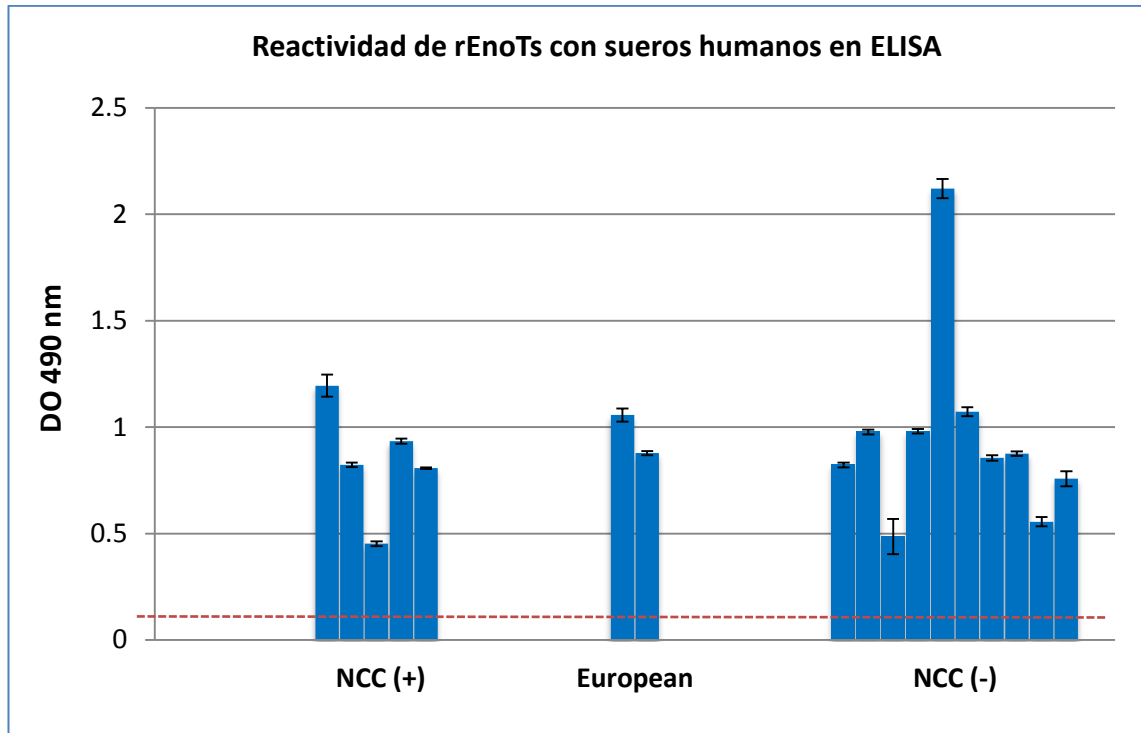
Figura 48. Prueba de reacción cruzada de rEnoTs con hidatidosis. NCC (+), *pool* de sueros positivos de NCC; NCC (-), suero no reactivo de un paciente peruano sano; Hidatidosis (+), suero de un paciente con hidatidosis. Se muestran las cantidades de rEnoTs evaluadas (en nanogramos). M: Dual Color Marker (BioRad).

VII.5.3. RECONOCIMIENTO DE rEnoTs SIN DESNATURALIZAR POR SUEROS HUMANOS MEDIANTE ELISA

Se observó que los sueros humanos de los tres grupos (NCC +, NCC – y europeos) reconocieron al antígeno rEnoTs sin desnaturalizar en el ensayo de ELISA. Todas las reacciones fueron positivas considerando que superaron el límite de detección ($Cut-off = 0.1$) calculado como el promedio de los pocillos blancos (Gráfica 9).

Cuando se realizaron las pruebas de hipótesis t de Student para comparar las medias (de a pares) de los grupos, no se hallaron diferencias significativas entre ninguno de ellos ($P > 0.05$).

El patrón de reconocimiento de los grupos de sueros humanos por rEnoTs en el ensayo de ELISA fue distinto al de la prueba de Western Blot.



Gráfica 9. Reactividad de distintos grupos de sueros humanos frente a la enolasa recombinante de *T. solium* expresada en *E. coli* (rEnoTs). NCC (+): sueros humanos positivos en el LLGP-EITB, NCC (-): sueros humanos negativos en el LLGP-EITB, European: sueros de individuos europeos sin antecedentes de cestodiasis. Cada barra representa el promedio de la reactividad de un suero individual con su respectiva desviación estándar. La línea punteada es el límite para la reacción positiva (Cut-Off = 0.1). No existen diferencias significativas entre las medias de los tres grupos ($P > 0.05$). La Densidad Óptica (DO) del lector de ELISA fue 490 nm y la temperatura 23.9°C.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se obtuvo por primera vez a la enolasa recombinante del metacestodo de *T. solium* (rEnoTs), se le caracterizó enzimáticamente y se le evaluó como antígeno de inmunodiagnóstico de neurocisticercosis humana. Además, rEnoTs mostró actividad enzimática, inmunogenicidad y propiedades antigénicas para el diagnóstico de neurocisticercosis humana.

La enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa) es una importante enzima multifuncional que participa en la glucólisis y que además desempeña papeles importantes en el espacio intracelular y extracelular, tales como la regulación transcripcional, la apoptosis, el crecimiento, motilidad celular y funciones estructurales (94, 73). Adicionalmente, la enolasa es un factor de invasión tisular común en muchos patógenos, por su unión al sistema plasmina/plasminógeno (12), es ubicua y altamente conservada en muchas especies (procariotas y eucariotas) (57, 9). Estudios recientes han reportado enolasas recombinantes de otros ténidos como *Taenia pisiformis* (95), *Taenia multiceps* (96) y *Taenia asiatica* (49), pero no en *Taenia solium*.

VIII.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA ENOLASA DE *T. solium*

El modelamiento por homología confirmó el subtipo al que pertenece rEnoTs puesto que la estructura proteica cristalizada más afín a rEnoTs fue la enolasa humana del tipo alfa (PDB: 2psn) cuyo porcentaje de identidad a rEnoTs fue similar al obtenido con ENO1.

La interrogante sobre si la enolasa se manifiesta como un monómero, dímero u octámero a nivel de superficie celular no se ha esclarecido. Por lo general las alfa

enolasas eucariontes han sido caracterizadas como dímeros (57), en contraste ciertas eubacterias como *Bacillus subtilis*, *Thermotoga maritima* y *Zymomonas mobilis* expresan su alfa enolasa en forma de octámero (97, 98, 99). En el caso de *Streptococcus pneumoniae* se ha determinado que su alfa enolasa se puede estar expresando en forma de octámero a nivel de membrana celular o citoplasma, manteniendo la estructura dimérica fundamental para la actividad en 4 grupos (55). Se ha manifestado que la actividad glucolítica de la enolasa a nivel de superficie celular no es trascendente, debido a que en este nivel su función principal es la de ser receptor de plasminógeno (75, 55), por lo que pueden exponer determinantes antigénicos distintos a su contraparte funcional. En contraposición, se ha propuesto que la enolasa de la bacteria *Borrelia burgdorferi* se expresa a nivel de superficie celular y mantiene su actividad catalítica (100). Por otro lado, en el caso de la enolasa alfa humana se ha sugerido que es importante que se mantenga la conformación dimérica (necesaria para su actividad glucolítica) a nivel de superficie puesto que dicha conformación facilita la exposición de un segundo motivo de unión a plasminógeno (101).

El análisis filogenético de la enolasa alfa de *T. solium* mostró claramente que ésta forma parte del grupo monofilético de los platelmintos (*T. asiatica*, *E. granulosus*, *F. hepatica*, *C. sinensis*, *S. japonicum* y *S. bovis*), cuyo nodo se sustenta robustamente por una probabilidad de ocurrencia de 0.91, teniendo mayor similitud con las enolasas de los cestodos *T. asiatica* y *E. granulosus*. Por otra parte, el porcentaje de identidad respecto a las secuencias aminoacídicas de las demás enolasas evaluadas vario entre 45.1 – 98.6%, rango que coincide con el reportado por Pancholi (57), el cual estuvo entre 40 – 90%.

El modelamiento estructural de rEnoTs predijo una conformación homodimérica con sitios de unión a Mg^{+2} en el sitio activo, estas involucraron las interacciones entre los residuos D246, D320 y E295 con el Mg^{+2} conformacional, mientras que el residuo S41 con el Mg^{+2} catalítico. Esta última interacción es muy importante para la actividad catalítica de la enolasa de *T. solium* (102), puesto que se comprobó que la mutación S41P en rEnoTs causó la pérdida de su actividad.

Los estudios del Plot de Ramachandran de la Prolina que se encuentran disponibles en el servidor Kinemage (<http://kinemage.biochem.duke.edu/>), han ayudado a determinar zonas de permisividad de los ángulos diedros Φ y ψ bien definidos (103). Si bien la mutación S41P de rEnoTs involucra un cambio de permisibilidad desfavorable de -102.4° a -89.8° a nivel del ángulo Φ , no llega a desestabilizar la estructura proteica por encontrarse en una región de bucle o giro con mayor grado de libertad. En consecuencia, la marcada disminución de la funcionalidad hallada en rEnoTs mutante es atribuida a la pérdida de la interacción metálica del hidroxilo (presente en la Serina pero no en la Prolina) con el Mg^{+2} catalítico, lo que impediría el cierre del sitio activo (57).

Además de su localización citoplasmática, donde desempeña su rol funcional principal, ya sea como dímero u octámero, (104, 55), la enolasa también se expresa a nivel de membrana plasmática, por algún mecanismo desconocido subyacente (9), donde participa en diversos procesos de interacción con sus receptores, como la migración celular, invasión tisular, respuesta inmune y activación del sistema plasminógeno/plasmina del hospedero (105, 106).

No está claro como la enolasa es exportada hacia la superficie celular. La ausencia de péptido señal, corroborada en nuestro estudio, indica que la enolasa no pasa a través del retículo endoplásmico, no obstante se ha sugerido que la enolasa ingresa a la ruta secretoria clásica a través de un mecanismo no identificado (107, 73). Del mismo modo se requiere verificar si otros mecanismos como la posesión de dominios hidrofóbicos, acetilación postranscripcional o la fosforilación juegan un rol en la asociación a membrana o en la expresión superficial de la enolasa citoplasmática (108, 109). En el presente estudio se encontró que rEnoTs posee una región transmembrana probable de 21 aminoácidos (¹⁰⁵GKLGANAILGVSLAVCKAGAA¹²⁵), aunque de baja puntuación, siendo el dominio N terminal (Met¹ – Lys¹⁰⁴) extracelular y el dominio C terminal (Glu¹²⁶ – His⁴⁴³) citoplasmático.

Dadas estas características de rEnoTs sería difícil ubicarla en el sistema de clasificación de proteínas transmembrana clásico (Tipo I, II, III y IV). Las proteínas de membrana del tipo 1 tienen el extremo N terminal hacia el exterior de la membrana, mientras que el C terminal hacia el interior; todo contrario ocurre en las del tipo 2 (67), por lo que rEnoTs sería del tipo I siguiendo esta clasificación. Por otro lado, aunque la mayor parte de las proteínas unidas a la membrana de tipo I tienen péptidos señal, la mayoría del tipo II son dirigidas a la vía secretora por su primer dominio transmembrana, que se asemeja bioquímicamente una secuencia o péptido de señalización, excepto que no se escinde (110), tal y como sucede con rEnoTs. Por lo tanto rEnoTs presenta características de proteína transmembrana del tipo I y II.

Interesantemente, Gan *et al.* (9) encontraron en la enolasa de *E. granulosus* la misma región transmembrana reportada acá, la cual es conservada en enolasas de unión a membrana de otros parásitos que han sido confirmadas. Tales evidencias soportan la idea de que la enolasa alfa de *T. solium* se expresa además sobre la superficie celular.

La secuencia ³⁴²LLLKVNQIGSVTES₃₅₅ de rEnoTs es acorde con la firma proteica de la enolasa:³⁴²[LIVTMS]-[LIVP]-[LIV]-[KQ]-x-[ND]-Q-[INV]-[GA]-[ST]-[LIVM]-[STL]-[DERKAQG]-[STA]₃₅₅ previamente reportada (<http://prosite.expasy.org/PS00164>). Del mismo modo, los residuos del sitio activo y del motivo catalítico, ³⁷²SHRSGETED₃₈₀ (95, 96) se encuentran conservados en la secuencia de rEnoTs.

Típicamente la unión de la enolasa al plasminógeno se da por medio de la interacción entre los dominios Kringle del plasminógeno con los residuos de Lisina ubicados en el extremo C terminal de la secuencia de las α enolasas eucariotas y procariotas (53, 111, 72). En el caso de la enolasa de *T. solium* se localizó a los residuos de carga positiva Lys₄₂₂ y Arg₄₃₁ en su extremo C terminal. Cabe resaltar que las de 6 Histidinas extras que posee rEnoTs en su extremo C terminal no fueron consideradas en la predicción de unión al plasminógeno, puesto que al tratarse de residuos de carga positiva parcializarían los resultados (112).

Alternativamente, un segundo motivo interno de unión a plasminógeno ha sido reportado para enolasas de distintos organismos, muchas de las cuales no cuentan con residuos de Lisina en su extremo C terminal (75, 101, 113), y cuyo núcleo

central comprende entre 7 y 9 residuos, localizados en un *loop* superficial la proteína, de alta afinidad por el plasminógeno (55). En el presente estudio se determinó en base a reportes previos de trematodos (10, 114, 66) que rEnoTs posee una región interna de unión a plasminógeno de 24 residuos (₂₃₉GKVKIGMDVAASEFYQDGKYNLDF₂₆₂), siendo la mayoría de su secuencia conservada cuando se le comparo con platelmintos cercanos (Anexo 3). Se apreció que el núcleo de esta secuencia consta de 7 residuos (₂₅₂FYQDGKY₂₅₈) de polaridad y cargas características de este motivo central (55). Adicionalmente, cuando se realizó el modelamiento por homología de rEnoTs (Swiss-PdbViewer 4.1.0) se pudo comprobar que dicho núcleo de unión a plasminógeno se encuentra altamente expuesto sobre la superficie de rEnoTs. Estos datos sugieren que la enolasa de *T. solium* es una proteína de unión firme a plasminógeno.

El alineamiento de las enolasas de humano, cerdo y *T. solium* mostró la existencia de regiones variables, las cuales pueden ser explotadas como antígenos de inmunodiagnóstico de NCC, ya que pueden generar anticuerpos específicos contra el parásito. Aquellos epítopes B predichos que estuvieron presentes en rEnoTs pero no en la enolasa alfa humana “2psn” serán probablemente útiles para el inmunodiagnóstico de NCC, puesto que se podrán generar anticuerpos específicos contra ellos. Todo lo contrario sucede con aquellos epítopes compartidos entre rEnoTs y 2psn, donde se supone ha habido una selección clonal negativa por parte de las células B humanas hacia esos epítopes, al reconocer lo propio, y por lo tanto no se espera que generen anticuerpos (115).

VIII.2. OBTENCIÓN DE LA ENOLASA RECOMBINANTE DE *T. solium*

El producto clonado, confirmado por secuenciamiento Sanger (Macrogen USA), fue idéntico al gen codante, sin los dos intrones, de la enolasa del genoma de *T. solium*, por lo tanto se comprobó que la proteína expresada en *E. coli* provino del metacestodo de *T. solium* y no del cerdo hospedero. Es de notar que el gen de enolasa de *T. asiatica* posee su único intron al inicio de su secuencia (116), mientras que la enolasa de *T. solium* posee dos intrones en el medio de su secuencia, similar a la de *E. granulosus*.

Del análisis comparativo con enolasas humanas (isoenzimas ENO1, ENO2 y ENO3) y otras adicionales de *T. solium* (anotadas en el GeneDB) se determinó que existe un mayor grado de homología (75%) entre la secuencia aminoacídica de nuestra enolasa y la de ENO1 con respecto a las otras 2 isoenzimas (ENO2 y ENO3). En consecuencia, la enolasa de *T. solium* obtenida en el presente estudio fue considerada como una alfa enolasa.

En este estudio el mRNA se extrajo a partir de los cisticercos, lo que quiere decir que este nivel se está expresando la enolasa alfa de *T. solium*. En la mayoría de reportes sobre la expresión de la enolasa a nivel de superficie celular se mencionan enolasas del tipo alfa (57, 87, 55). Posiblemente la enolasa alfa de *T. solium* se esté expresando sobre la superficie del metacestodo y, por ende, exponiéndose al reconocimiento del sistema inmune de su hospedero, por lo que sería un potencial antígeno de inmunodiagnóstico.

VIII.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE rEnoTs

El hallazgo de la actividad enzimática de rEnoTs nos garantiza, al menos en teoría, la conformación nativa de su sitio catalítico. Esta proteína aparentemente no necesita modificaciones postraduccionales, como la glicosilación (117), para el mantenimiento de su actividad, al haber sido expresada en un sistema bacteriano.

La rEnoTs obtenida en el presente estudio tuvo un mejor rendimiento a corto plazo en buffer PBS pH 7.4, sin embargo también se pudo apreciar actividad cuando se le recupero en buffer Tris-HCL 15mM pH 7.15. Si bien estos buffers son adecuados para la actividad catalítica de la enolasa (118), para aun almacenamiento a largo plazo se pueden considerar la opción de un buffer que contenga glicerol o liofilizarla (51).

La actividad enzimática y parámetros cinéticos calculados para de rEnoTs resultaron ser comparables con los de enolasas de otras especies (Tabla 2). La enolasa recombinante de *T. solium* exhibió actividad enzimática mediante la hidrolisis del sustrato específico 2-PGA a PEP. Su actividad enzimática específica (60 U/mg) fue superior en comparación a otras enolasas helmínticas previamente reportadas: *C. sinensis* (36.5 ± 0.3 U/mg), *S. japonicum* (35.8 ± 2.0 U/mg), *T. multiceps* (46.91 U/mg) y *T. pisiformis* (30.71 ± 2.2 U/mg) (114, 66, 96, 95).

La constante de afinidad (K_m) de rEnoTs por 2-PGA fue de 0,091 mM a pH 7.4, siendo similar a la de *S. cerevisiae* ($K_m = 0,07$ mM, pH: 7.4), utilizada como control positivo en la reacción enzimática (65). Además se encontró en el rango reportado para otros platelmintos como *Schistosoma japonicum* ($K_m = 0,53$ mM,

pH: 6.8 - 7.1), *T. pisiformis* ($K_m = 0,77$ mM, pH: 7.2) y *Clonorchis sinensis* ($K_m = 0,05$ mM, pH: 7,0- 8,0) (66, 95, 114).

Por otra parte, la k_{cat} de rEnoTs ($3004.447 \text{ min}^{-1}$) es comparable con la de otros organismos como *E. coli* ($13\ 200 \text{ min}^{-1}$), *S. cerevisiae* ($17\ 600 \text{ min}^{-1}$), *Oryctolagus cuniculus* ($8\ 000 \text{ min}^{-1}$), *Rattus norvegicus* ($7\ 900 \text{ min}^{-1}$), *Candida albicans* ($4\ 200 \text{ min}^{-1}$) y *Trypanosoma cruzi* ($4\ 766 \text{ min}^{-1}$) (68, 69, 70). Adicionalmente, la eficiencia catalítica de rEnoTs ($5503 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) está lejos del límite controlado por difusión (entre 10^8 y $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), como sí sucede con otras enzimas, tales como catalasa ($4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) o fumarasa ($1,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (119), por lo tanto, rEnoTs no es una enzima altamente eficaz.

Resulta interesante apreciar que rEnoTs mutante (S41P + S250P) solo conservo un 0.6% (0.38 U/mg) de la actividad original de rEnoTs (60.0 U/mg) respecto a la conversión del 2-PGA a PEP. Si bien el residuo Ser₂₅₀ pertenece a un bucle catalítico que se desplaza para asegurar el sitio activo de la enolasa una vez unido el sustrato (55), este no posee una interacción electrostática importante con el sustrato o los iones Mg^{+2} debido a su distancia ($> 9 \text{ \AA}$), reportada por cristalografía, por lo que su mutación Pro₂₅₀ no se considera importante. En consecuencia, el decaimiento de la actividad enzimática de rEnoTs mutante recae sobre la sustitución Pro₄₁ por Ser₄₁, considerado un residuo trascendental para el cierre del sitio activo (57)

Al calcular los parámetros cinéticos a partir del Plot de Eadie-Hofstee, estos variaron ligeramente ($K_m = 0.097$ mM; $V_{max} = 0.031$ mM PEP / min; $k_{cat} = 3050 \text{ min}^{-1}$; y $k_{cat}/K_m = 5.230 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dichas variaciones posiblemente se deban a

que el Plot de Lineweaver-Burk trabaja con las inversas de las mediciones en las cuales al haber errores experimentales mínimos conllevan a grandes errores en el diagrama. Otra observación acerca del Plot de Lineweaver-Burk es que se aglutinan los datos al inicio del diagrama, los cuales corresponden a grandes concentraciones del sustrato, de modo que al hacer la linealización de los puntos, ésta resultara más influenciada por los datos correspondientes a concentraciones bajas de sustrato (120). En contraparte, al hacer la linealización mediante el método de Eadie-Hofstee se asigna igual peso a todos los puntos de la gráfica, por lo que sería un diagrama más parejo. Sin embargo, la ordenada y la abscisa del Plot de Eadie-Hofstee, es decir V_0 y $V_0 / [2\text{-PGA}]$, respectivamente, no son variables independientes, ya que ambas dependen de la velocidad, por lo que un error en ésta afectará a ambas (121). Debido a los posibles errores experimentales, lo más adecuado hubiera sido utilizar el Plot de Eadie-Hofstee para determinar los parámetros cinéticos de rEnoTs, sin embargo su índice de correlación fue bajo ($R^2 = 0.9178$) en comparación con el de Lineweaver-Burk ($R^2 = 0.9503$).

La determinación de la actividad enzimática de la enolasa recombinante de *Taenia solium* además de darnos un conocimiento académico sobre su comportamiento bioquímico, abre la posibilidad a múltiples aplicaciones, como por ejemplo la búsqueda de inhibidores selectivos de actividad o utilizarla como blanco terapéutico de drogas antiparasitarias específicas (9, 122).

VIII.4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE rEnoTs

Se pudo determinar que rEnoTs es una proteína inmunogénica capaz de levantar una respuesta inmune humoral (IgG) específica en el animal inmunizado. Al evaluar mediante ELISA la reactividad del suero anti rEnoTs frente a otros

antígenos y se pudo determinar que los anticuerpos generados en el conejo inmunizado con rEnoTs reaccionaron en parte con la enolasa comercial de *S. cerevisiae*, sin embargo no reaccionaron contra la pirazinamidasa (PZAase) recombinante de *M. tuberculosis*, que es un antígeno completamente diferente a la enolasa de *T. solium*, encontrándose diferencias significativas entre los grupos ($P \leq 0.05$) evaluados. Tales evidencias sugieren que los anticuerpos policlonales anti rEnoTs son específicos para los determinantes antigénicos de rEnoTs, pudiendo dar reacciones cruzadas con epítopes compartidos por especies homólogas.

La enolasa ha sido utilizada como antígeno inmunoprotector en diversos ensayos de vacunación en animales contra *C. albicans*, *P. falciparum*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus sobrinus*, *S. japonicum* y *T. pisiformis* antígeno (123, 124, 125, 126, 66, 95). Nuestros resultados junto con estos reportes previos colocan a rEnoTs como un potencial candidato vacunal para cisticercosis en modelos animales.

Complementariamente, se evaluó la presencia de la enolasa nativa de *T. solium* en las diferentes secciones del cisticerco con ayuda de los anticuerpos policlonales de conejo anti-rEnoTs y se determinó su ubicuidad en el metacestodo, localizándose tanto en el fluido vesicular como en la fracciones celulares (membranas y citosol). Por otro lado, la enolasa ha sido reportada como producto de excreción–secreción en otros helmintos (127, 128). De acuerdo a nuestros resultados, aparentemente se está dando una mayor expresión de la enolasa en el fluido vesicular, respecto a la fracción celular. Por lo tanto, se colige que la enolasa tiene una amplia distribución e importancia en el cisticerco de *T. solium*, expresándose en grandes

cantidades a nivel de fluido vesicular como producto de excreción/secreción, similar a otros platelmintos (129).

VIII.5. EVALUACIÓN DE rEnoTs EN EL INMUNODIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA

Existen varios trabajos que reportan a la enolasa como un antígeno candidato vacunal novedoso debido a su rol en la activación del plasminógeno sobre la superficie celular (125, 130, 95), mecanismo común que utilizan distintos patógenos para cruzar la barrera tisular del hospedero (12). No obstante, su uso como potencial candidato para detectar anticuerpos específicos en pacientes con cisticercosis no es bien conocido. Las proteínas de superficie celular, de excreción y secreción (E/S) que poseen epítopes inmunogénicos deben de ser consideradas como antígenos potenciales de inmunodiagnóstico, puesto que se encuentran altamente expuestas al sistema inmune del hospedero. En los platelmintos la glicólisis ocurre principalmente a nivel de tegumento, donde la enolasa ha sido confirmada por diferentes estudios (49, 9, 105, 131), mientras que otros trabajos han reportado a la enolasa en los productos de E/S de trematodos (129, 127). Como antecedente, la enolasa ha sido usada en el diagnóstico de malaria causada por *P. falciparum* y *P. vivax* en el sureste asiático (21). Mientras que Wang *et al.* (50) utilizó una enolasa recombinante de *E. granulosus* para el inmunodiagnóstico de Equinococosis humana mediante ELISA.

En el presente trabajo se evaluó a la enolasa recombinante de *T. solium* expresada en *E. coli* (rEnoTs) mediante la prueba de Western Blot (en condiciones desnaturalizantes), encontrándose reacción cruzada con sueros de pacientes negativos para neurocisticercosis, posiblemente debido a la alta prevalencia de

otros parásitos intestinales y helmintos (4). Sin embargo, no hubo reactividad cruzada con sueros de individuos europeos sanos (sin antecedentes de cestodiasis), lo que sugiere que rEnoTs podría utilizarse en escenarios con baja prevalencia de parásitos.

En general se apreció un mejor reconocimiento de rEnoTs por los sueros peruanos con respecto a los sueros de individuos extranjeros sanos. Al ser el Western Blot una prueba cualitativa para el diagnóstico de NCC, es decir que se basa en la presencia/ausencia de banda para determinar la positividad o negatividad, solo se pueden hacer estimaciones poco precisas sobre el grado de reconocimiento por el antígeno de acuerdo a la intensidad de banda (16). En este sentido se determinó que solo un 35% de los sueros negativos de NCC no reconocen a la secuencia desnaturalizada de rEnoTs (ausencia por completo de la banda de 47 kDa), siendo el 70% falsos positivos; En contraparte, hubo un reconocimiento del 100% de los sueros positivos de NCC por rEnoTs. Estos resultados sugieren una alta sensibilidad pero baja especificidad de rEnoTs para la detección de NCC en la población peruana.

Por otro lado, ninguno de los sueros de individuos europeos, reacciono con rEnoTs; incluso evaluando cantidades superiores de antígeno (250 ng) que en la prueba estandarizada. Al parecer existe una reacción cruzada implícita de rEnoTs con los anticuerpos generados contra otros antígenos (enolasas o proteínas estructuralmente similares) de parásitos y/o patógenos locales. En consecuencia, el factor entorno es muy importante puesto que en los países europeos existe una erradicación casi completa de la mayoría de “enfermedades olvidadas”,

perteneciendo a este grupo las parasitosis helmínticas (24), por lo que los resultados presentados acá se justifican.

Una posible explicación para la reacción cruzada es el alto grado de conservación de la secuencia de rEnoTs respecto a otras enolasas (57), por ende los anticuerpos generados contra sus epítopes B lineales y/o conformacionales podrán ser exclusivos o no para la secuencia de *T. solium*. Si bien pueden existir anticuerpos exclusivos de rEnoTs en los pacientes con NCC y estar ausentes en individuos sin la enfermedad, estos atributos van a ser enmascarados en la reacción cruzada por los anticuerpos generados contra epítopes comunes de otros antígenos (132).

Adicionalmente, se evaluó el reconocimiento de rEnoTs por los sueros humanos (NCC +, NCC – y europeos) en condiciones no desnaturantes mediante un ensayo de ELISA. Se pudo determinar que todos los sueros sin excepción, incluyendo los europeos, reconocieron a rEnoTs. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos ($p > 0.05$). Esta prueba sirvió para confirmar la reacción cruzada de los epítopes, básicamente conformacionales, de rEnoTs con sueros de pacientes negativos de NCC.

Los resultados hallados en la prueba piloto de rEnoTs, no son promisorios para su utilización en el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis humana, no obstante, podría utilizarse como un test rápido para el descarte de Neurocisticercosis; es decir, si no reacciona en el Western Blot, se descarta la enfermedad y si reacciona se pasa a una segunda etapa de evaluación para confirmar la enfermedad, ya que podría tratarse de un falso positivo. Sin embargo, se requiere de una muestra mayor para validar este hallazgo.

La búsqueda de antígenos con potencial aplicación en el inmunodiagnóstico debe proseguir con la meta de detectar el 100% de los casos. Prácticamente todas las pruebas serológicas para la detección de neurocisticercosis han reducido su sensibilidad en el escenario de que el paciente posea un único quiste, o estos se encuentren calcificados (5, 20). Posiblemente esto se deba a una carga infecciosa baja y por lo tanto, la estimulación antigénica es menor, obteniéndose una respuesta de anticuerpos limitada (20). Solo un estudio, el cual utiliza proteínas recombinantes y sintéticas (LLGP) unidas a perlas fluorescentes como antígenos, ha reportado mejoras para la detección de casos asociados a lesión única (hasta 92% de sensibilidad), no obstante se encuentra en proceso de optimización (133).

Las diferentes funciones de la enolasa se deben a su localización subcelular específica, organizada por medio de diferentes modificaciones postraduccionales (9). Las modificaciones postraduccionales proteicas, como la acetilación, fosforilación, metilación, y carbonilación son mecanismos comunes e importantes de la regulación de la función proteica y controlan en gran medida los eventos de señalización celular que dirigen funciones biológicas (73). La glicosilación es una modificación postraduccional recurrente en las proteínas, y ha sido reportada en la enolasa de excreción y secreción de *Schistosoma bovis* (128). Si bien la enolasa es una enzima que no requiere de la glicosilación para el mantenimiento de su actividad enzimática (117), tal modificación ha sido reportada como influyente en la respuesta de anticuerpos contra *E. caproni* en ratón (127). En tal sentido, no se puede descartar la posibilidad de que estas modificaciones postraduccionales afecten las propiedades antigénicas y/o inmunogénicas de la enolasa de *T. solium*, por lo que su expresión en un sistema eucariota es necesaria.

Como secuela de los resultados aquí presentados se debería de investigar la utilidad de la enolasa recombinante de *T solium* como candidato vacunal de cisticercosis porcina. Debido a la reacción cruzada que puede generar la enolasa en su hospedero (134, 135), como método alternativo se podrían seleccionar ciertos epítopes especie-específicos para el diseño de vacunas basadas en la enolasa.

Finalmente, las investigaciones sobre esta proteína multifacética deben ampliarse, explorando sus distintas funciones y aplicaciones en diversos campos.

IX. CONCLUSIONES

1. Se expresó satisfactoriamente a la enolasa recombinante de *T. solium* a partir de un sistema procarionte.
2. La enolasa de *T. solium* es una proteína conservada que posee dominios potenciales de unión a plasminógeno y transmembrana.
3. Se demostró la actividad enzimática de la enolasa recombinante de *T. solium* y se determinaron sus parámetros cinéticos. Asimismo, se encontró que la mutación S41P causa la pérdida de su actividad.
4. La enolasa recombinante de *T. solium* es una proteína inmunogénica.
5. La enolasa recombinante de *T. solium* es inespecífica para el inmunodiagnóstico de neurocisticercosis en pacientes peruanos.

X. RECOMENDACIONES

1. En un posterior estudio evaluar a la enolasa recombinante de *T. solium* como candidato vacunal de cisticercosis porcina.
2. Evaluar la capacidad de unión a plasminógeno de la enolasa recombinante de *T. solium* previa escisión de las Histidinas del dominio C-terminal.
3. Expresar a la enolasa de *T. solium* en un sistema eucariótico y caracterizarla enzimáticamente para comparar sus parámetros cinéticos con la enolasa expresada en *E. coli*.
4. Evaluar la capacidad de la enolasa de *T. solium* expresada en un sistema eucariótico para el inmunodiagnóstico de NCC humana.
5. Tras realizar la prueba piloto del inmunodiagnóstico de NCC humana con la enolasa recombinante de *T. solium* se debería de aumentar el tamaño de la muestra en futuras evaluaciones con la finalidad de tener una mayor robustez.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García, H. H., A. E. González, and R. H. Gilman. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2003, 16:411–419.
2. Botero D, Restrepo M. *Parasitosis humanas*. Quinta Edición. Medellín, Colombia. Corporación para Investigaciones Biológicas, 2012:467.
3. Gemmell, M. A., Z. Matyas, Z. Pawlowski, and E. J. L. Soulsby. Guidelines for surveillance, prevention and control of taeniasis/cysticercosis. 1983. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
4. García H, González A, Rodríguez S, Gonzalez G, Tsang V y Gilman R. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2010; 27(4): 592-97.
5. Wilson, M., R. T. Bryant, J. A. Fried, D. A. Ware, P. M. Schantz, et al. “Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis”, *Journal of Infectious Diseases* 1991, 164(5):1007-1009.
6. Esquivel-Velazquez, Ostoa-Saloma P., Morales-Montor J., R. Hernandez-Bello, and Larralde C. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis: Ways to Focus on the Challenge *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2011, Article ID 516042, 11 p.
7. Vivona S, Gardy JL, Ramachandran S, Brinkman FS, Raghava GP, Flower DR, Filippini F Computer-aided biotechnology: from immunoinformatics to reverse vaccinology. *Trends Biotechnol* (2008) 26:190–200
8. Ferrer E, González LM, Martinez-Escribano JA, González-Barderas ME, Cortez MM, et al. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa

Taenia saginata oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol Res*, 2007, 101: 517–525.

9. Gan W, Zhao G, Xu H, Wu W, Du W, Huang J, et al. Reverse vaccinology approach identify an *Echinococcus granulosus* tegumental membrane protein enolase as vaccine candidate. *Parasitol Res*. 2010; 106 (4):873-82.
10. Bernal D, de la Rubia JE, Carrasco-Abad AM, Toledo R, Mas-Coma S, Marcilla A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS letters*. 2004; 563(1-3):203-6.
11. Marcilla, A., Pérez-García, A., Espert, A., Bernal, D., et al. *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. 2007, *Exp. Parasitol*. 117, 57–64.
12. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106 Suppl 1:85-90.
13. Montano SM, Villaran MV, Ylquimiche L, Figueroa JJ, Rodriguez S, Bautista CT, et al. Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. *Neurology*. 2005; 65(2): 229-33.
14. Escalante H, Miranda E, Lorca M, Verástegui M, Torres R. La técnica de Western blot con antígenos de fluido vesicular de *Cysticercus cellulosae* para el diagnóstico de la cisticercosis. *Bol Per Parasitol*. 1995; 11:26-31.
15. Gutiérrez-Quiroz, M. Diagnóstico inmunológico de la cisticercosis. En: Flisser, A. y Malagón, F. (Eds.) *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México* Edit. Limusa. México. 1989, 175 -178.

16. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of infectious diseases*. 1989; 159(1):50-9.
17. García HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, *et al.* Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. The Cysticercosis Working Group in Peru (Clinical Studies Coordination Board). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994, 50:152–157.
18. Rajshekhar V, Oommen A. Utility of the cysticercus immunoblot in a patient with an atypical solitary cerebral cysticercus granuloma. *Neurol. India*, 2003, 49:75–77.
19. Lee YM, Handali S, Hancock K, Pattabhi S, Kovalenko VA, Levin A, *et al.* Serologic diagnosis of human *Taenia solium* cysticercosis by using recombinant and synthetic antigens in Quick-ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011, 84:587–593.
20. Noh J, Rodriguez S, Lee Y, Handali S, González A, Gilman R, *et al.* Recombinant Protein- and Synthetic Peptide-Based Immunoblot Test for Diagnosis of Neurocysticercosis. *J. Clin. Microbiol.* 2014, 52(5):1429.
21. Sato K, Kano S, Matsumoto Y, Glanarongran R, Krudsood S, Looareesuwan S, *et al.* Application of yeast enolase as antigen for immunodiagnosis of malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000, 31 (Suppl. 1): 79-84.
22. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sanchez-Flores A, Brooks KL, *et al.* The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature.* 2013; 496(7443):57-63.
23. Huang J, Huang Y, Wu X, Du W, Yu X, Hu X. Identification, expression, characterization, and immunolocalization of lactate dehydrogenase from *Taenia asiatica*. *Parasitol Res.* 2009, 104:287–293

24. WHO/FAO/OIE. Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis. 2005.
25. Laclette J.P., Shoemaker C.B., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., Bing D. & Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.*, 1992, 148, 124-128.
26. Yoshino, K. "On the evacuation of eggs from detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on the structure of its eggs", *Taiwan Igakkai Zasshi* (1934), 33:47-58.
27. Larralde, Carlos y Aline S. de Aluja. *Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud.* Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la Salud. Primera Edición, 2006.
28. Mazzotti, L., A. Dávalos y R. Martínez-Marañón, "Infecciones experimentales por *Cysticercus cellulosae* en diferentes especies de mamíferos", *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.* 1965, 25:151-162.
29. Smyth, J. *The Physiology of Cestodes*, Oliver and Boyd, Edimburgo, 1969 p. 279.
30. Pajuelo MJ, Eguiluz M, Dahlstrom E, Requena D, Guzman F, Ramirez M, et al. Identification and Characterization of Microsatellite Markers Derived from the Whole Genome Analysis of *Taenia solium*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(12):e0004316.
31. Carpio A. & Hauser W.A. Prognosis for seizure recurrence in patients with newly diagnosed neurocysticercosis. *Neurology*, 2002. 59, 1730-1734.
32. Estañol Vidal, Jairo Díaz Granados y Teresa Corona Vásquez. Integridad de la barrera hematoencefálica y síntesis intratecal de IgG en cisticercosis cerebral parenquimatosa y subaracnoidea. *Rev Invest Clin.* 1989, Vol 41: 327-330. Mexico.

33. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases (2013)
34. Nicoletti A, Bartoloni A, Sofia V, Bartalesi F, Chavez JR, Osinaga R, et al. Epilepsy and neurocysticercosis in rural Bolivia: a population-based survey. *Epilepsia* 2005; 46:1127-32.
35. Schenone H, Ramírez R, Rojas A. Aspectos epidemiológicos de la neurocysticercosis en América Latina. *Bol Chil Parasitol* 1973; 28:61-72.
36. García HH, Araoz R, Gilman RH, Valdez J, González AE, Gavidia C, et al. Increased prevalence of cysticercosis and taeniasis among professional fried pork vendors and the general population of a village in the Peruvian highlands. Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59(6):902.
37. Díaz F, García HH, Gilman RH, Gonzales AE, Castro M, Tsang VC, et al. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Epidemiol.* 1992; 135(8):875-82.
38. Bern C, García HH, Evans C, González AE, Verastegui M, Tsang VC, et al. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 1999; 29(5):1203-9.
39. Rajkotia Y, Lescano AG, Gilman RH, Cornejo C, García HH. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(8): 840-6.
40. Zimic, M., Pajuelo, M., Rueda, D., Lopez, C., Arana, Y., et al. Utility of a protein fraction with cathepsin L-Like activity purified from cysticercus fluid of *Taenia solium* in the diagnosis of human cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009, 80, 964–970.

41. Agudelo P, Botero D, Palacio LG. Evaluación del método ELISA de punto para el diagnóstico de la cisticercosis humana y para estimar valores de prevalencia en una región endémica en Colombia. *Biomédica* 2005; 25:488-95.
42. Piña R, Gutierrez AH, Gilman RH, Rueda D, Sifuentes C, Flores M, et al. A dot-ELISA using a partially purified cathepsin-L-like protein fraction from *Taenia solium* cysticerci, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 2011; 105(4):311-8.
43. Garcia HH, Parkhouse RM, Gilman RH, Montenegro T, Bernal T, Martinez SM, et al. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94:673-6.
44. Castillo Y, Rodriguez S, García HH, Brandt J, Van Hui A, Silva M, et al. Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80:379-83.
45. Mayta H, Gilman RH, Prendergast E, Castillo JP, Tinoco YO, García HH, et al. Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J Clin Microbiol*, 2008; 46:286-9.
46. Fox JL and Klass M. Antigens Produced by Recombinant DNA Technology. *CLIN.CHEM.*35/9. 1989, 1838-1842.
47. Lightowers MW, Flisser A, Gauci CG, Heath DD, Jensen O, Rolfe R. vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol Today*. 2000; 16 (5):191-6.
48. Sciutto, E., Rosas, G., Hernández, M., Morales, J., Cruz-Revilla, C., Toledo, et al. Improvement of the synthetic tripeptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. 2007b, *Vaccine* 25, 1368–1378

49. Du WY, Dai JL, Huang J, Hu XC, Xu J, Yu XB, et al. Prokaryotic expression, identification and histo-localization of the *Taenia asiatica* enolase gene. *Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi* = Chinese journal of parasitology & parasitic diseases. 2009; 27(6):458-62.
50. Wang Ying, Zhang Jing, Yuan Zhong-Ying, Zhou He-Jun, et al. Cloning expression and immunodiagnostic evaluation of enolase from *Echinococcus granulosus*. *Chin J Schisto Control* 2012, Vol. 24, No. 5.
51. Wold F. Enolase. In: Boyer PD, editor. *The Enzymes*. 1 ed. New York: Academic Press; 1971. p. 499-538.
52. Brewer JM, Glover CV, Holland MJ, Lebioda L. Enzymatic function of loop movement in enolase: preparation and some properties of H159N, H159A, H159F, and N207A enolases. *J Protein Chem*. 2003 May; 22(4):353-61.
53. Miles L. A., Dahlberg C. M., Plescia J., Felez J., Kato K. and Plow E. F. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolases as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 1991, 30: 1682–1691
54. Marangos P. J., Zis A. P., Clark R. L. and Goodwin F. K. Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res*. 1978, 150: 117–133
55. Ehinger S, Schubert WD, Bergmann S, Hammerschmidt S, Heinz DW. Plasmin(ogen)-binding alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evolution of plasmin(ogen)-binding sites. *J Mol Biol* 2004 343: 997-1005.
56. Kato K., Asai R., Shimizu A., Suzuki F. and Ariyoshi Y. Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clin. Chim. Acta*. 1983, 127: 353–363

57. Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. Cellular and molecular life sciences: CMLS. 2001; 58(7):902-20.
58. Brewer J. M. Specificity and mechanism of action of metal ions in yeast enolase. FEBS Lett. 1985, 182: 8–14
59. Brewer J. M. and Ellis P. D. ³¹P-NMR studies of the effect of various metals on substrate binding to yeast enolase. J. Inorg. Biochem. 1983, 18: 71–82
60. Peshavaria M, Day IN. "Molecular structure of the human muscle-specific enolase gene (ENO3)". Biochem J. 1991, 275 (Pt 2): 427–33.
61. Zhang E., Brewer J. M., Minor W., Carreira L. A. and Lebioda L. Mechanism of enolase: the crystal structure of asymmetric dimer enolase-2-phospho-D-glycerate/enolasephosphoenolpyruvate at 2.0 Å resolution. Biochemistry. 1997, 36: 12526–12534
62. Thompson TB, Meganathan R, Gerlt JA. Evolution of enzymatic activity in the enolase superfamily: structure of o-succinylbenzoate synthase from Escherichia coli in complex with Mg²⁺ and o-succinylbenzoate. 2000 Sep 5; 39(35):10662-76.
63. Nguyen T. & Thompson K. Mechanism of enolase converting 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate, illustrated via ChemDraw 10.0. Wikipedia, 2008.
64. Hüther FJ, Psarros N, Duschner H. "Isolation, characterization, and inhibition kinetics of enolase from Streptococcus rattus FA-1". Infect Immun. 1990, 58 (4): 1043–7.
65. Bergmyer, HU. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd ed., vol. I, ed., Academic Press (New York, 1974), p. 449.
66. Yang J, Qiu C, Xia Y, Yao L, Fu Z, Yuan C, et al. Molecular cloning and functional characterization of Schistosoma japonicum enolase which is

highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitol Res.* 2010; 107(3):667-77.

67. Nelson DL and Cox M. Lehninger, Principios de bioquímica. Quinta edición. 2009, Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
68. Albe KR, Butler MH, Wright BE. Cellular concentrations of Enzymes and Their Substrates, *Journal of Theoretical Biology J. theor. Biol.* (1990) 143, 163-195.
69. Kustrzeba-Wójcicka y Golczak. Enolase from candida albicans, purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 2000, 126: 109 -120.
70. Domingo M. Ubicación subcelular, purificación, caracterización y estudios de interacción proteínas-proteínas de la enolasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (2004). Tesis de Licenciatura. Universidad de los Andes. Merida, 2004.
71. Lottenberg R, Minning-Wenz D, Boyle MD. Capturing host plasminogen: a common mechanism for invasive pathogens? *Trends in microbiology.* 1994;2(1):20-4.
72. Derbise A, Song YP, Parikh S, Fischetti VA, Pancholi V. Role of the C-terminal lysine residues of streptococcal surface enolase in Glu- and Lys-plasminogen-binding activities of group A streptococci. *Infect Immun.* 2004; 72(1):94-105.
73. Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A, and Lopez-Alemanly R. α -Enolase, a Multifunctional Protein: Its Role on Pathophysiological Situations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2012, Article ID 156795, 12 p.
74. Carneiro CR, Postol E, Nomizo R, Reis LF, Brentani RR. Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 2004; 6(6):604-8.

75. Bergmann S, Wild D, Diekmann O, Frank R, Bracht D, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* (2003) 49 (2), 411–423.
76. Jong A, Chen S, Stins M, Kim K, Tuan T, Huang S. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* (2003), 52, 615–622.
77. Maldonado J, Marina C, Puig J, Maizo Z, Avilan L. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Experimental and molecular pathology*. 2006; 80(3):289-94.
78. Jolodar A, Fischer P, Bergmann S, Büttner D, Hammerschmidt S, Brattig N. Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. *Biochimica et Biophysica Acta* 1627 (2003) 111–120.
79. Nakada, T., Nagano, I., Wu, Z., Takahashi, Y. Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis*. *Parasitology Research* 2005. 96, 354–360.
80. La Torre-Escudero E, Manzano-Roman R, et al. Cloning and characterization of plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. *Veterinary Parasitology* 173. 2010 76 – 84.
81. Felsenstein J. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 2004.
82. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.

83. The Recombinant Protein (TRP) Handbook: Protein Amplification and Simple Purification, Amersham Biosciences, 2002, 18-1142-75, pp. 41–58.
84. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72:248-254.
85. Wold, F. & Ballou, C.E. Studies on the enzyme enolase I. Equilibrium studies. *J. Biol. Chem.* 1957, 227, 301–312.
86. Pal-Bhowmick I, Sadagopan K, Vora HK, Sehgal A, Sharma S, Jarori GK Cloning, over-expression, purification and characterization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Eur J Biochem*, 2004. 271:4845–4854
87. Dzierszinski F, Mortuaire M, Dendouga N. Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Mol Biol* 2001 309:1017–1027.
88. Ingle, J. D. J.; Crouch, S. R. *Spectrochemical Analysis*. New Jersey: 1988 Prentice Hall.
89. Segel IH. *Biochemical Calculations. How to Solve Mathematical problems in General Biochemistry*. 1976, 2nd ed., John Wiley & Sons.
90. Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V. "Stereochemistry of polypeptide chain configurations". *Journal of Molecular Biology*. 1963 7: 95–9.
91. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011 29;8(10):785-6.
92. Larsen JE, Lund O, Nielsen M: Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res*, 2006. 2:2.

93. Kringelum JV, et al. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLoS Comput. Biol.* 2012; 8:e1002829.
94. Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in biochemical sciences.* 2005;30(3):142-50.
95. Zhang S, Guo A, Zhu X, You Y, Hou J, Wang Q, et al. Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacestode. *Acta Trop.* 2015; 144:31-40.
96. Li WH, Qu ZG, Zhang NZ, Yue L, Jia WZ, Luo JX, et al. Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. *Research in veterinary science.* 2015; 102:53-8.
97. Brown, C. K., Kuhlman, P. L., Mattingly, S., Slates, K., Calie, P. J. & Farrar, W. W. A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *J. Protein Chem.* 1998, 17, 855–866.
98. Schurig, H., Rutkat, K., Rachel, R. & Jaenicke, R. Octameric enolase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification, characterization, and image processing. *Protein Sci.* 1995 4, 228–236.
99. Pawluk, A., Scopes, R. K. & Griffiths-Smith, K. Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase. *Biochem. J.* 238, 1986, 275–281.
100. Veloso Nogueira Sarah, Smith Alexis A., Jin-Hong Qin, and Utpal Pal. A Surface Enolase Participates in *Borrelia burgdorferi*-Plasminogen Interaction and Contributes to Pathogen Survival within Feeding Ticks. *American Society for Microbiology. Infection and Immunity.* 2012, Volume 80 Number 1, p. 82–90

101. Kang H. J., Jung S. K., Kim S. J, and Chung S. J., “Structure of human α -enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme,” *Acta Crystallographica D*, vol. 64, no. 6, pp. 651– 657, 2008.
102. Wedekind J. E., Poyner R. R., Reed G. H. and Rayment I. Chelation of serine 39 to Mg^{2+} latches a gate at the active site of enolase: structure of the bis (Mg^{2+}) complex of yeast enolase and the intermediate analog phosphonoacetohydroxamate at 2.1-Å resolution. *Biochemistry* 1994 33: 9333–9342
103. Chen, V. B., Davis, I. W. and Richardson, D. C. (2009), KING (Kinemage, Next Generation): A versatile interactive molecular and scientific visualization program. *Protein Science*, 18: 2403–2409. doi:10.1002/pro.250
104. Keller A, Peltzer J, Carpentier G, Horvath I, Olah J, Duchesnay A, et al. Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2007; 1770(6):919-26.
105. Ramajo-Hernandez A, Perez-Sanchez R, Ramajo-Martin V, Oleaga A. Schistosoma bovis: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Exp Parasitol*. 2007;115 (1):83-91.
106. Plow EF, Das R. Enolase-1 as a plasminogen receptor. *Blood*. 2009; 113(22):5371-2.
107. López-Villar E, Monteoliva L, Larsen MR, Sachon E, Shabaz M, et al. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface. 2006, *Proteomics* 6 (Suppl. 1): S107-118.
108. Heijne G. von, Liljestrom P, Mikus P, Andersson H, and T. Ny T. “The efficiency of the uncleaved secretion signal in the plasminogen activator inhibitor type 2 protein can be enhanced by point mutations that increase its hydrophobicity,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 23, pp. 15240–15243, 1991.

109. Bottalico L. A., Kendrick N. C., Keller A., Li Y. and Tabas I. Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in a α -enolase isoform. *Arterioscl. Thromb.* 1993, 13: 264–275
110. Lemire I, Lazure C, Crine P & Boileau G. Secretion of a type II integral membrane protein induced by mutation of the transmembrane segment. *Biochem. J.* 1997 322, 335 - 342
111. Pancholi, V., and Fischetti, V.A. α -enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem*, 1998 273: 14503–14515.
112. Jones AL, Hulett MD, Altin JG, Hogg P, Parish CR. Plasminogen is tethered with high affinity to the cell surface by the plasma protein, histidine-rich glycoprotein. *J Biol Chem.* 2004 Sep 10; 279(37):38267-76. Epub 2004 Jun 25.
113. Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin (ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40: 2001 1273–1287.
114. Wang X, Chen W, Hu F, et al. *Clonorchis sinensis* enolase: identification and biochemical characterization of glycolytic enzyme from excretory/secretory products. *Molecular and Biochemical Parasitology* 177 (2011) 135-142.
115. Abbas AK., Lichtman AH. & Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. Ed. ELSEVIER 7ma Edición. 2012 Barcelona - España.
116. Huang Y, Huang J, Hu X, Xu J, Cao K, et al. Structure and characteristics of gene and protein of enolase from *Taenia asiatica*. (2008) *J Sun Yat-Sen University (Med Sci)* 29:575–580

117. Angiolella L, Micocci MM, D'Alessio S, Girolamo A, Maras B, Cassone A. Identification of major glucan-associated cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fluconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jun;46(6):1688-94.
118. Carrillo Ibarra N. Mecanismo de desnaturalización térmica de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para optar el grado de Maestro en ciencias en biomedicina molecular. Instituto Politécnico Nacional. México, 2009.
119. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science*, p. 166, W. H. Freeman and Company, 1999. New York.
120. Fjellstedt TA, Schlesselman JJ. "A simple statistical method for use in kinetic analysis based on Lineweaver-Burk plot". *Analytical Biochemistry*, 1977, volume 80, Issue 1, Pages 224–238. Maryland, USA.
121. Dowd J, Douglas S. A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations. *The Journal of Biological Chemistry* 1964, Vol. 240, No. 2, USA.
122. da Silva Giotto MT, Hannaert V, Vertommen D, de AS Navarro MV, Rider et al. The crystal structure of *Trypanosoma brucei* enolase: visualisation of the inhibitory metal binding site III and potential as target for selective, irreversible inhibition. *J Mol Biol* 2003 331:653–665
123. Montagnoli, C., S. Sandini, A. Bacci, L. Romani, and R. La Valle. Immunogenicity and protective effect of recombinant enolase of *Candida albicans* in a murine model of systemic candidiasis. *Med. Mycol.* 2004, 42:319–324
124. Pal-Bhowmick I, Mehta M, Coppens I, Sharma S, Jarori GK. Protective properties and surface localization of *Plasmodium falciparum* enolase. *Infect Immun* 2007, 75: 5500-5508.

125. Zhang A, Chen B, Mu X, Li R, Zheng P, Zhao Y, et al. Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vaccine*. 2009; 27(9):1348-53.
126. Dinis M, Tavares D, Veiga-Malta I, Fonseca AJ, Andrade EB, et al. Oral therapeutic vaccination with *Streptococcus sobrinus* recombinant enolase confers protection against dental caries in rats. *J Infect Dis* 2009, 199: 116-123.
127. Sotillo J, Valero L, M. Sánchez Del Pino, B. Fried, J. G. Esteban, A. Marcilla & R. Toledo. Identification of antigenic proteins from *Echinostoma caproni* (Trematoda) recognized by mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasite Immunology*, 2008, 30, 271–279.
128. Ramajo-Hernández A, Oleaga A, Ramajo-Martín V & Pérez-Sánchez R. Carbohydrate profiling and protein identification of tegumental and excreted/secreted proteins of adult *Schistosoma bovis* worms. *Vet Parasitol* 2006; 144: 45–60.
129. Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Hernández, A., Ramajo-Martín, V., Oleaga, A. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms. *Proteomics* 2006, 6, 226–236.
130. Chen N, Yuan ZG, Xu MJ, Zhou DH, Zhang XX, Zhang YZ, et al. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine*. 2012; 30(23):3478-82.
131. Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, et al. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.* 2010, 40, 543–554.
132. Espíndola NM, De Gaspari EN, Nakamura PM, Vaz AJ. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. *Vet Parasitol.* 2000 May 17;89(4):321-6.

133. Handali S, Moss D, McAuliffe IT, Noh J, Lee Y-M, et al. Development of a Luminex based assay for detection of antibodies against *Taenia solium* cysts and adult worms, p 19. 60th Annu. Meet. 2011, Am. Soc. Trop. Med. Hyg. American Society of Tropical Medicine & Hygiene, Philadelphia, PA.
134. Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P. Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol* 2000, 27:109–115.
135. Lundberg K1, Kinloch A, Fisher BA, Wegner N, Wait R, Charles P, Mikuls TR, Venables PJ. Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(10):3009-19.
136. Brutto, OH del, Rajshekhar V, White AC, Tsang VCW, Nash TE, et al. Proposed diagnostic criteria for Neurocysticercosis. *Neurology* 2001; 57:177-83.
137. White C.A., Robinson P., Kuhn R. in Freedman DO (ed): Immunopathogenetic Aspects of Disease Induced by Helminth Parasites. *Chem Immunol.* Basel, Karger, 1997, vol 66, pp 209–230
138. Sciutto, E., Chavarria, A., Fragoso, G., Fleury, A., Larralde, C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunology*, 2007a, 29, 621–636
139. Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G & Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 2005; 116: 271–278.

XII. ANEXOS

ANEXO I. Preparación de buffers para el ensayo Western Blot:

Buffer PBS pH 7.4:

Para la preparación del buffer PBS se produjeron las siguientes soluciones:

Solución A:	Solución B:
NaH ₂ PO ₄ 5,52g	Na ₂ HPO ₄ 22,72g
NaCl 35,04g	NaCl 140,16g
Se disolvió en 4L de H ₂ O destilada	Se disolvió en 4L de H ₂ O destilada

Luego se combinaron para producir el buffer PBS:

Solución A	520ml
Solución B	800ml
H ₂ O destilada	2680ml

Para 4L, luego se midió el pH 7.4 utilizando la solución A para calibrar.

DAB Stock (3, 3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride dehydrate 97%):

Se pesó 13g de DAB en polvo y se diluyó en 250 ml de buffer PBS.

Solución de revelado DAB (Sustrato):

Se preparó instantáneamente al momento del revelado.

PBS	10 ml	50 ml
DAB stock	200 µl	1000 µl
Peróxido de hidrógeno	2,5 µl	12,5 µl

El descarte de la solución DAB se realizó con lejía.

Solución de bloqueo:

Se preparó instantáneamente para bloquear.

Leche descremada en polvo	5g
O alternativamente BSA	3g
PBS	100 ml

ANEXO II. Porcentaje de identidad entre la enolasa de *T. solium* y de otras especies

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: Cryptosporidium parvum	100.00	63.80	63.06	58.82	60.00	57.51	58.03	62.81	59.67	58.84	60.51	59.07	60.70	60.70	60.00	63.02	63.49	59.86	59.67	60.14	60.14	60.00	59.95	62.06	52.22	48.02	47.07
2: Toxoplasma gondii	63.80	100.00	66.22	56.91	58.78	58.20	56.88	61.82	62.18	60.19	63.95	62.79	63.02	63.02	62.56	64.19	65.35	62.82	61.72	63.34	63.34	63.57	64.34	63.64	53.50	48.02	49.18
3: Plasmodium falciparum	63.06	66.22	100.00	59.72	62.30	62.67	61.33	68.93	64.27	65.97	67.91	68.21	67.29	68.21	65.66	68.45	68.21	68.59	66.13	65.89	65.89	63.89	64.10	65.27	49.88	50.47	52.10
4: Leishmania	58.82	56.91	59.72	100.00	79.49	60.05	62.59	60.24	60.05	57.78	59.34	59.34	59.57	60.05	58.16	60.76	60.76	59.95	61.23	62.17	62.41	60.05	61.14	62.32	51.67	49.29	49.76
5: Trypanosoma cruzi	60.00	58.78	62.30	79.49	100.00	59.34	59.76	59.76	60.28	58.49	62.88	62.41	62.17	61.70	61.47	62.41	62.41	61.36	62.17	62.65	62.88	59.81	61.37	60.90	51.91	48.81	49.52
6: Saccharomyces cerevisiae	57.51	58.20	62.67	60.05	59.34	100.00	77.57	59.49	65.51	64.58	64.04	61.66	61.89	63.05	60.51	62.36	63.28	62.73	66.20	66.67	66.90	63.97	65.12	64.19	50.94	49.07	50.94
7: Candida albicans	58.03	56.88	61.33	62.59	59.76	77.57	100.00	63.45	66.28	64.43	63.43	63.13	62.90	63.36	61.06	63.82	65.21	63.28	66.97	66.51	66.97	64.29	66.82	66.82	53.38	50.35	51.28
8: Arabidopsis thaliana	62.81	61.82	68.93	60.24	59.76	59.49	63.45	100.00	69.53	70.53	71.33	71.93	71.46	73.32	67.05	70.53	70.77	71.23	71.16	70.23	70.47	70.07	71.10	72.03	53.27	50.12	50.12
9: Drosophila melanogaster	59.67	62.18	64.27	60.05	60.28	65.51	66.28	69.53	100.00	78.06	71.76	72.45	73.38	72.69	70.83	71.99	72.45	70.21	71.36	70.67	70.90	72.52	71.93	71.93	53.77	46.01	48.11
10: Homarus gammarus	58.84	60.19	65.97	57.78	58.49	64.58	64.43	70.53	78.06	100.00	72.22	70.83	71.30	72.22	68.52	70.83	72.69	70.97	70.21	69.28	69.52	71.82	69.37	70.07	51.18	47.42	48.35
11: Salmo salar	60.51	63.95	67.91	59.34	62.88	64.04	63.43	71.33	71.76	72.22	100.00	86.57	85.65	86.81	78.94	81.71	84.03	73.15	71.99	71.76	71.99	72.69	71.86	72.79	53.90	47.06	49.88
12: Mus musculus	59.07	62.79	68.21	59.34	62.41	61.66	63.13	71.93	72.45	70.83	86.57	100.00	95.16	94.70	82.49	84.79	85.48	73.38	72.92	73.15	73.38	72.98	72.56	72.79	52.83	47.07	51.06
13: Bos taurus	60.70	63.02	67.29	59.57	62.17	61.89	62.90	71.46	73.38	71.30	85.65	95.16	100.00	95.62	82.03	85.71	86.18	73.15	72.45	73.15	73.38	72.98	71.63	72.09	52.83	47.07	50.82
14: Homo sapiens	60.70	63.02	68.21	60.05	61.70	63.05	63.36	73.32	72.69	72.22	86.81	94.70	95.62	100.00	82.26	85.71	86.87	74.07	74.77	74.54	74.77	74.36	73.02	74.19	52.83	47.07	50.59
15: Gallus gallus	60.00	62.56	65.66	58.16	61.47	60.51	61.06	67.05	70.83	68.52	78.94	82.49	82.03	82.26	100.00	85.94	86.18	70.14	70.60	70.83	71.53	69.52	68.60	70.70	54.25	46.60	48.94
16: Python bivittatus	63.02	64.19	68.45	60.76	62.41	62.36	63.82	70.53	71.99	70.83	81.71	84.79	85.71	85.71	85.94	100.00	91.71	73.38	72.45	73.61	73.61	72.06	71.40	73.26	54.48	47.78	50.35
17: Xenopus laevis	63.49	65.35	68.21	60.76	62.41	63.28	65.21	70.77	72.45	72.69	84.03	85.48	86.18	86.87	86.18	91.71	100.00	73.84	72.69	73.15	73.15	72.06	71.86	73.26	54.95	48.24	49.88
18: Trichinella spiralis	59.86	62.82	68.59	59.95	61.36	62.73	63.28	71.23	70.21	70.97	73.15	73.38	73.15	74.07	70.14	73.38	73.84	100.00	72.98	72.98	73.44	72.52	72.62	71.69	53.54	47.89	48.35
19: Echinococcus granulosus	59.67	61.72	66.13	61.23	62.17	66.20	66.97	71.16	71.36	70.21	71.99	72.92	72.45	74.77	70.60	72.45	72.69	72.98	100.00	94.00	94.69	75.06	77.73	76.10	51.18	49.53	51.18
20: Taenia asiatica	60.14	63.34	65.89	62.17	62.65	66.67	66.51	70.23	70.67	69.28	71.76	73.15	73.15	74.54	70.83	73.61	73.15	72.98	94.00	100.00	98.61	73.90	77.26	75.17	51.42	49.30	50.94
21: Taenia solium	60.14	63.34	65.89	62.41	62.88	66.90	66.97	70.47	70.90	69.52	71.99	73.38	73.38	74.77	71.53	73.61	73.15	73.44	94.69	98.61	100.00	74.36	77.73	76.10	51.89	49.30	50.47
22: Schistosoma bovis	60.00	63.57	63.89	60.05	59.81	63.97	64.29	70.07	72.52	71.82	72.69	72.98	72.98	74.36	69.52	72.06	72.06	72.52	75.06	73.90	74.36	100.00	80.05	78.65	52.47	48.71	52.47
23: Fasciola hepatica	59.95	64.34	64.10	61.14	61.37	65.12	66.82	71.10	71.93	69.37	71.86	72.56	71.63	73.02	68.60	71.40	71.86	72.62	77.73	77.26	77.73	80.05	100.00	82.83	53.08	48.58	52.37
24: Clonorchis sinensis	62.06	63.64	65.27	62.32	60.90	64.19	66.82	72.03	71.93	70.07	72.79	72.79	72.09	74.19	70.70	73.26	73.26	71.69	76.10	75.17	76.10	78.65	82.83	100.00	54.27	47.41	52.61
25: Escherichia coli	52.22	53.50	49.88	51.67	51.91	50.94	53.38	53.27	53.77	51.18	53.90	52.83	52.83	52.83	54.25	54.48	54.95	53.54	51.18	51.42	51.89	52.47	53.08	54.27	100.00	59.11	57.51
26: Streptococcus pneumoniae	48.02	48.02	50.47	49.29	48.81	49.07	50.35	50.12	46.01	47.42	47.06	47.07	47.07	47.07	46.60	47.78	48.24	47.89	49.53	49.30	49.30	48.71	48.58	47.41	59.11	100.00	61.34
27: Mycoplasma canis	47.07	49.18	52.10	49.76	49.52	50.94	51.28	50.12	48.11	48.35	49.88	51.06	50.82	50.59	48.94	50.35	49.88	48.35	51.18	50.94	50.47	52.47	52.37	52.61	57.51	61.34	100.00

Matriz del porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas de 27 especies de enolasas mediante el método Clustal.

ANEXO IV. Sistemática de *T. solium*

Las principales características taxonómicas del género *Taenia* se resumen en el siguiente recuadro:

Phylum Plathyhelminthes
Cuerpo delicado, dorso ventralmente aplanado, acelomados, simetría bilateral, triploblasticos, sistema excretor protonefridial.
Clase Cestoda
Endoparásitos, falta de sistema digestivo, cuerpo exterior cubierto de un tegumento sincitial con microtricos cubiertos de glicocalix.
Subclase Eucestoda
Adultos con órganos especializados de adhesión anterior o escólex, cuerpo alargado o estróbilo conformado por proglótidos, hermafroditas con ciclo de vida indirecto.
Orden Cyclophyllidea
Escólex con cuatro ventosas musculares y un rostelo generalmente armado con ganchos, el estróbilo conformado de proglótidos en varios estadios de desarrollo, cada proglótido separado de una segmentación externa. Los huevos son redondos, no operculados y contienen oncósferas no ciliadas y ganchudas (una por huevo)
Familia Taeniidae
Los adultos habitan en el intestino delgado de los carnívoros y humanos, mamíferos con hospederos intermediarios, los genitales desapareados en cada proglótido con un poro genital lateral irregularmente alternado, huevos con bloques estriados y endurecidos radialmente (Embrióforo), estadio larval o metacestodo como un cisticerco, cenuro, hidátide o estrobilocercus.
Genero <i>Taenia</i>
Cuerpo alargado en forma de cinta, llegando a medir la forma adulta varios metros de longitud, su metacestodo es el cisticerco.

*Tomado de WHO, 2005 (24).

ANEXO V. Criterios diagnósticos de neurocisticercosis humana

De la convención del año 2000 en Lima (136), se tienen los siguientes criterios:

Criterios absolutos

- Demostración histológica de los parásitos.
- Visualización del parásito en el fondo de ojo.
- Lesiones quísticas que muestren el escólex en TAC o RM.

Criterios mayores

- Lesiones sugestivas de NCC en neuroimágenes.
- Pruebas inmunológicas positivas por inmunoblot.
- Rayos X simple con imágenes calcificadas en muslo o pantorrillas.

Criterios menores

- Nódulos subcutáneos (sin confirmación histológica)
- A los rayos X calcificaciones punteadas en tejidos blandos o intracerebrales.
- Manifestaciones clínicas sugestivas de NCC; desaparición de lesiones intracraneales luego de tratamiento antihelmíntico.

Criterios epidemiológicos

- Haber vivido en zonas endémicas.
- Viajes frecuentes a zonas endémicas.
- Contacto familiar con personas con teniasis por *T. solium*.

Grados de certeza

- Diagnóstico definitivo: Un criterio absoluto; o dos criterios mayores; o un criterio mayor con dos menores y uno epidemiológico.
- Diagnóstico probable: un criterio mayor mas dos menores; o un criterio mayor, uno menor y uno epidemiológico; o tres criterios menores más uno epidemiológico.
- Diagnóstico posible: un criterio mayor; o dos criterios menores; o un criterio menor más uno epidemiológico.

ANEXO VI. Respuesta inmunológica en la cisticercosis humana

Antígenos parasitarios que modulan la respuesta inmune del hospedero

En el siguiente recuadro se hace un resumen de los principales antígenos moduladores de la respuesta inmune del hospedero en la cisticercosis.

Antígeno parasitario	Peso Molecular	Efecto en el hospedero
Antígeno B	95 kD	Organización de células inflamatorias e inhibición de la vía clásica del complemento
Teniaestatina	20 kD	Inhibición del complemento. Interfiere con la quimiotaxis y agregación de los granulocitos. Inhibe la proliferación linfocitaria y la producción de IL-1 e IL-2.
Catepsina-L y otras cisteín proteasas	29/45 kD	Degradación de IgG del hospedero y evasión de la respuesta inmunitaria
GST y otras enzimas detoxificadoras	27/64 kD	Detoxificación de los intermediarios reactivos de oxígeno
Glicoproteínas lectinas	13-50 kD	Adherencia tisular del cisticerco, modulación de células inflamatorias y consumo e interferencia del complemento
Péptidos GK1, KETc1 y KETc12	—	Incremento de la respuesta humoral IgG, posible inmunomodulación de la respuesta celular TH1/TH2
Otros antígenos parasitarios no definidos	—	Descenso en la actividad de los macrófagos, disminución de la proliferación linfocitaria, descenso de la producción de IL-2 e IFN γ (TH1). Incremento de la producción de IL-4 e IL-10 (TH2).

*Adaptado de “Immunopathogenetic aspects of disease induced by helminth parasites” (137).

Respuesta inmunológica en la fisiopatología de la neurocisticercosis humana

Las infecciones por *Taenia* están vinculadas a niveles elevados de citoquinas TH2 (Linfocitos T helper clase 2) que a su vez se asocian con inmunoglobulinas del tipo IgG1 e IgE. Se han reportado niveles elevados de otras citoquinas TH2, como la IL-6, IL-4 e IL-10, tanto en suero como células del vaso. Por su parte, la infección activa por cisticercosis está asociada con la supresión de la respuesta inflamatoria y por tanto del perfil de citoquinas TH1 (LT helper clase 1). Asimismo se ha observado que los productos de E/S del parásito están vinculados con la disminución de la producción de IL-1 e IL-2. Una vez que el parásito muere o empieza a degenerarse, ocurre un cambio del perfil de citoquinas, de manera que empiezan a producirse IFN γ , IL-2, IL-12 e IL-6, como se ha observado en *T. crassiceps* (137). Por lo tanto, mientras los parásitos sean viables inducirán un patrón de citoquinas TH2 y suprimirán la respuesta TH1. Por el contrario, una vez que mueren los metacestodos, el perfil de citoquinas predominante es el TH1 (inflamatorio).

Los antígenos parasitarios juegan un papel determinante en el tipo de respuesta inmunológica específica inducida. Tal respuesta está estrechamente ligada a las propiedades y características antigénicas. Así por ejemplo los antígenos expresados por el cisticerco pueden ser de origen proteico, glicoproteico o lipídico (138). Por otro lado, mientras algunos antígenos se expresan en cualquier estadio del parásito, otros son específicos de cada fase (por ejemplo TSOL18 se expresa meramente en la larva oncosfera). Ante esta diversidad antigénica es de esperarse una respuesta inmunológica compleja en el hospedero.

La respuesta inmunológica a la neurocisticercosis (NCC) va a depender si ésta es sintomática o asintomática. Con respecto a la neurocisticercosis asintomática calcificada se caracteriza por presentar una respuesta específica de citoquinas del perfil TH2 (IL4, IL5, IL13 e IL12), así como niveles altos de IgG4 específica. En cambio los pacientes con neurocisticercosis sintomática, con múltiples quistes y en estadios mixtos, van a presentar niveles bajos de proliferación linfocitaria específica y sin producción de citoquinas (139). Vale la pena recalcar que la inmunodepresión en estos pacientes se presenta en ausencia de tratamiento antiparasitario, por lo que se postula que tal inmunodepresión específica se manifiesta para controlar la extensión de la inflamación en el SNC. Sin embargo, a nivel local la respuesta inmunológica varia, ya que en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes se han detectado niveles incrementados de citoquinas inflamatorias IL-5 e IL-6 y de la citoquina inmunosupresora IL-10, que estaría regulando el proceso inflamatorio en esa cavidad (139). En la neurocisticercosis humana se ha determinado que mientras el cisticerco este vivo se genera una supresión de la respuesta inmune, pero cuando el parásito muere se produce una fuerte reacción inflamatoria. La interface hospedero-parásito ha sido estudiada experimentalmente en cisticercosis porcina. En este sentido, se ha determinado que los metacestodos conviven en armonía con el huésped, separados por una cápsula con pocos elementos inflamatorios. Sin embargo, cuando se rompen los mecanismos de esta relación simbiótica, ya sea por tratamiento antiparasitario o por senescencia, se afecta la biología parasitaria por lo que el huésped emprende la destrucción del cisticerco.

ANEXO VII. Vacunación contra la cisticercosis porcina

En los últimos años se ha adoptado la vacunación de los cerdos como medida preventiva de la cisticercosis porcina, utilizándose para ello antígenos parasitarios provenientes de diversas fuentes que van desde extractos totales de oncósferas o de cisticercos, del fluido vesicular, antígenos semipurificados y recombinantes, péptidos sintéticos y antígenos provenientes de especies cercanas como *T. crassiceps*, *T. saginata* y *T. ovis*. En el siguiente recuadro se muestran los antígenos protectores hallados contra cisticercosis porcina.

Fuente	Eficiencia de protección (% experimental)	Antígeno
Extracto total	82.1	Extracto crudo
(De cisticerco)	53.1-58.2	Extracto de metacestodo <i>T. crassiceps</i>
(De oncósferas)	91.7-96.7	Antígenos nativos de oncósfera
Antígenos purificados	94.7	Antígenos de excreción y secreción
(De cisticerco)	64.5	Antígenos de escólex de cisticerco
	91.7-92.1	Antígenos de 45 a 242 kDa
Antígenos recombinantes y sintéticos	0-94	Péptido sintético GK-1
	100	TSOL18 y TSOL45
	95.1	ETc1, KETc12, GK1 y KETc7
	85-91	pcDNA3-cC1 y GST-cC1

*Modificado de Larralde *et al.* (27).