

ELABORACIÓN DE UN TEST DE DIAGNÓSTICO PARA DETECCIÓN DEL PARÁSITO *TOXOCARA CANIS*

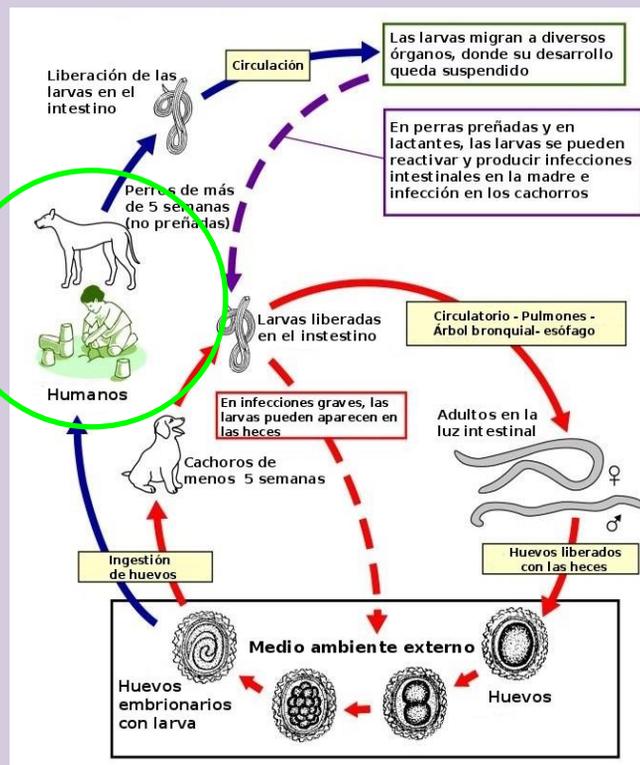
Diagnóstico de Toxocariasis

Producción de proteínas recombinantes específicas de *Toxocara*.

Purificación de proteínas

Elaboración de tiras de papel con gotas de proteínas para diagnóstico con sueros

Resultado: Diagnóstico en pacientes por presencia o no de larva de *Toxocara*



Lic. Soledad Echeverría

Tutora: Dra. Estela Castillo

Tribunal:

Dra. Verónica Fernández

Dr. Daniel DaRosa

Dra. Lucia Turell

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

Agradecimientos

A la ANII que me brindo la beca de Maestría gracias a la cual pude concentrarme únicamente en esta.

A CSIC que financio el proyecto en el que se basa mi tesis.

Quiero agradecer a Estela Castillo por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por enseñarme en estos años gran parte de lo que se. A mis compañeros de laboratorio por hacer más divertidas las jornadas. A Manuel, Marcelo, Mery por las bromas y charlas.

También Alicia que fue junto a Estela mi gran mentora, por enseñarme el mundo de las proteínas, que si bien ya no las quieres más me mostraste lo interesantes que son.

En fin Ana, Fernanda, Uriel, todos gracias por todo.

A Serrana y Gustavo que si bien no están más en el laboratorio supieron acompañarme en gran parte de mi viaje.

En especial quiero agradecer a mi familia, mis padres porque siempre me apoyaron y ayudaron en todo lo que me propuse hacer, mis hermanos porque a pesar de que no entendían de que les estaba hablando, se ponían felices por mis logros!

Y por ultimo pero no menos importante a Daniel (mi esposo) que me banco todo, si estaba de buen humor porque me salían las cosas festejaba con migo, o si estaba mal me consolaba. Leyó varias veces esta tesis, escucho mi presentación muchas veces y de mas. Y mi hija Flor por ser la luz de mis ojos la fuerza que siempre me hizo levantarme.

Solo quiero decirles a todos y cada uno GRACIAS!

Resumen

La toxocariasis es una zoonosis causada por *Toxocara canis* o *Toxocara cati*. Estos son parásitos helmintos que afectan a perros y gatos. Esta enfermedad es mayormente prevalente en países en desarrollo, pero también ha sido reportada como la parasitosis más común de Estados Unidos.

Los más afectados por esta enfermedad son los niños, por estar más expuestos al contacto con tierra o arena contaminada durante el juego.

El Uruguay presenta una prevalencia alta, e incluso sus niveles han llegado a ser alarmantes, en sectores vulnerables de la población. La falta de higiene pública, y la dificultad en el diagnóstico de la toxocariasis, hacen de esta una enfermedad difícil de erradicar. Es una enfermedad de difícil diagnóstico dado que los signos y síntomas que presentan no son específicos de la misma.

El diagnóstico de la toxocariasis se basa en un conjunto de datos clínicos y datos de laboratorio. El test de elección para el diagnóstico es el ELISA, habiéndose desarrollado varios diferentes a lo largo de la historia. Estos test suelen usar antígenos crudos de excreción secreción. A pesar de la búsqueda de mejora la especificidad y sensibilidad del test, aún no se ha podido desarrollar uno que sea capaz de eliminar las reacciones cruzadas con otras parasitosis, siendo esto de gran importancia en zonas donde el poli parasitismo es endémico. La producción de test de ELISA donde se utilizan como antígenos proteínas de Excreción-secreción de *T. canis* obtenidas de forma recombinante han disminuido las reacciones cruzadas con otros parásitos, haciendo que la utilización de estas en el desarrollo de un futuros test sea prometedora.

En esta tesis nos propusimos contribuir al diagnostico de la Toxocariasis en el país diseñando herramientas inmunológicas y moleculares.

Se decidió realizar un test de ELISA basado en dos proteínas que se encuentran en los productos de excreción- secreción de *T. canis*. Las proteínas elegidas fueran TES-26 y TES-120.

Estas fueron producidas en forma recombinante en *Escherichia coli* y purificadas por cromatografía de afinidad. La reacción serológica se evaluó mediante inmunoblot y ELISA. Tiendo en cuenta que no existe una prueba de referencia se observo el comportamiento de los antígenos en comparación con la prueba de rutina para el inmunodiagnóstico de la toxocariasis.

En cuanto a la elaboración de técnicas moleculares se diseñaron cebadores específicos de genes usados habitualmente para detección de *T. canis* en suelo. Estos cebadores fueron usados para realizar PCR sobre moldes de ADN genómico obtenido a partir de sueros de pacientes.

Las dos proteínas se produjeron con un rendimiento de 3.3mg/L de medio de cultivo para TES-26 y 2.4mg/L de medio de cultivo para TES-120.

Se analizaron 16 de sueros facilitados por el Dpto. de Parasitología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, por inmunoblot, ELISA con proteínas recombinantes y ELISA comercial.

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

En comparación con el ELISA comercial, nuestras proteínas mostraron un mayor número de positivos. Los resultados revelan que es posible el uso de estas proteínas recombinantes para el diagnóstico tanto por ELISA como por inmunoblot.

En cuanto al PCR en dos de los sueros de pacientes analizados se obtuvo amplificación de banda del tamaño esperado, con dos diferentes pares de cebadores, uno de ellos amplifica parte del ITS-2 de *T. canis* y el otro un fragmento del gen para la proteína COX1.

Los resultados son alentadores aunque necesitamos un mayor número de muestras de pacientes, para realizar un buen tratamiento estadístico. También sería bueno que los sueros fueran frescos y contar con pacientes diagnosticados con otras parasitosis. Este material sería necesario no solo para el inmunodiagnóstico sino también para las técnicas moleculares. Un mayor número de muestras nos permitiría determinar la sensibilidad y la especificidad de estos test.

Índice

<u>Agradecimientos</u>	1
<u>Resumen</u>	2
<u>Índice</u>	4
<u>Introducción</u>	6
El parásito: <i>Toxocara canis</i>	6
La enfermedad toxocariasis:	8
Diagnóstico de la toxocariasis:	12
<i>Proteínas TES como antígenos:</i>	<i>15</i>
<i>Los anticuerpos involucrados en el desarrollo del test:</i>	<i>18</i>
<i>Diagnóstico molecular:</i>	<i>19</i>
Objetivos:	21
<i>Objetivos específicos:</i>	<i>21</i>
<u>Materiales y métodos</u>	22
Proteínas:	22
<i>Expresión de proteínas:</i>	<i>22</i>
<i>Lisis de células:</i>	<i>22</i>
<i>Visualización de proteínas:</i>	<i>23</i>
<i>Purificación de proteínas:</i>	<i>23</i>
Inmunoensayos:	24
<i>Western blot:</i>	<i>24</i>
<i>Dot blot:</i>	<i>25</i>
<i>Test de saturación con anticuerpo conjugado a peroxidasa:</i>	<i>26</i>
<i>ELISA:</i>	<i>26</i>
PCR para diagnóstico:	28
<i>Extracción de ADN de sueros:</i>	<i>28</i>
<i>Diseño de PCR:</i>	<i>28</i>
<u>Resultados y discusión</u>	31

Expresión y evaluación de la solubilidad de TES-26 y TES-120 en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	31
<i>Purificación de proteínas TES-26 y TES-120:.....</i>	<i>34</i>
Inmunoensayos:	37
<i>Western blot:.....</i>	<i>37</i>
<i>Dot blot:.....</i>	<i>41</i>
<i>Test de saturación con anticuerpo conjugado a peroxidasa:</i>	<i>44</i>
<i>ELISA con TES recombinantes:</i>	<i>45</i>
PCR para diagnóstico:.....	49
<i>Extracción de ADN de sueros:.....</i>	<i>49</i>
<i>PCR de control positivo de extracción de ADN de pacientes:.....</i>	<i>50</i>
<i>Sensibilidad de la PCR Límite de detección de los cebadores</i>	<i>51</i>
<i>Primeras pruebas de amplificación con los cebadores.....</i>	<i>52</i>
Conclusiones y perspectivas	60
Referencias	61
Anexo I.....	65

Introducción

El parásito: *Toxocara canis*.

Toxocara canis es un geohelmintho que pertenece al filo nematodo, presenta dimorfismo sexual, donde la hembra (6 a 18 cm) se diferencia del macho (4 a 10 cm) por ser más larga (Glickman & Schantz, 1981). Las larvas miden 0,4 μm de largo y 0,015 a 0,021 μm de diámetro, en el medio externo (suelo) siempre se encuentra en el interior del huevo (Rodríguez & Ripoll, 2006). Sus hospedadores definitivos son el perro y otros canidos, en los que el nematode adulto vive en el intestino delgado. Los huevos del parásito son eliminados a través de las heces del perro, estos huevos fecundados necesitan de una incubación en el suelo de unos 10 a 15 días, en los que ocurre la embriogénesis, por esto se denominan geohelmintho (Figura 1). Solo después de la incubación en el suelo es que los huevos son infectivos, a su vez estos son capaces en las condiciones ambientales adecuadas de permanecer viables desde meses hasta años. Las hembras son capaces de producir 200.000 huevos por día, y en el intestino del perro puede haber de una a cientos de hembras, lo que permite la generación de millones de huevos por día. Los perros no solo se pueden infectar mediante la ingesta de huevo directamente, sino también por la ingesta de larvas alojadas en tejidos de hospederos intermediarios, mediante pasaje de la madre al cachorro, o por la ingesta de larvas maduras en el vómito o heces de otros perros (Glickman & Schantz, 1981).

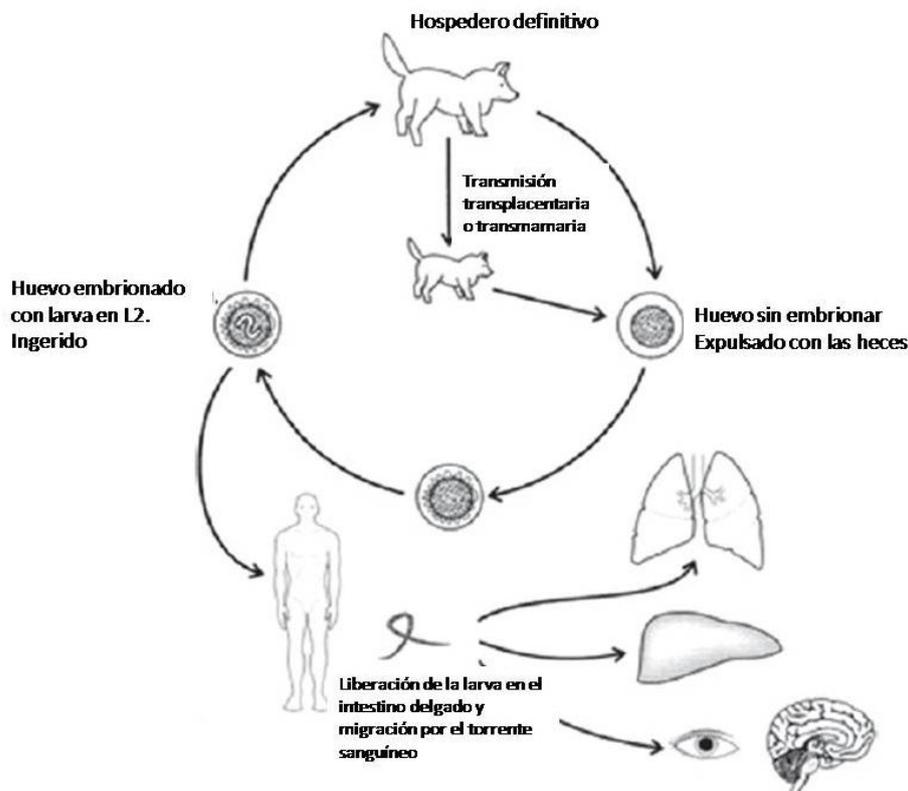


Figura 1: Ciclo de vida *Toxocara canis*. Adaptado de Nicoletti 2013

El ciclo de vida del parásito comienza una vez ingerido el huevo embrionado por el perro, este eclosiona liberando la larva L2 (Figura 2), la cual penetra la pared del duodeno. Esta larva pasa a la circulación (pasando al estadio L3) y llega hasta el hígado dentro de las primeras 24 hs, migra a través del sistema porta hasta el corazón y desde allí al pulmón. En el pulmón pasa al siguiente estadio (L4). Y pasan a través de los bronquiolos a la luz de los pulmones, suben hasta la faringe, donde mediante estornudo o tos provocada, es nuevamente ingerida. Alojándose en el intestino del perro, donde maduran al estadio adulto (L5) y comienzan a liberar los huevos unas 4 a 5 semanas post infección.

La edad del hospedero determina la proporción de larvas que migran hacia la tráquea o las que realizan una migración somática. En los cachorros de hasta 3 meses la mayoría de las larvas realizan el ciclo antes descrito. En el caso de los de más de 3 meses este ciclo es menos frecuente y más allá de los 6 meses ya no se da. En el perro adulto la larva en el estadio L2 hace migración somática que puede llevar a que se aloje en diferentes órganos (hígado, corazón, pulmones, cerebro, etc.) en los que se enquistan. En las hembras, se puede alojar en las glándulas mamarias donde pasa a los cachorros a través de la leche, sobre todo en las primeras 3 semanas de lactancia, en los que en lugar de hacer una migración somática, se aloja directamente en el intestino, madura y comienza a liberar huevos. También es posible la infección trasplacentaria de hembras infectadas a los cachorros en desarrollo. Esta suele darse después del día 42 de gestación, y se atribuye a cambios hormonales. Las larvas se alojan en el hígado del feto, hasta que este nace y pasa al pulmón hasta llegar al intestino delgado. La liberación de huevos comienza a las 4 semanas de vida del cachorro (Glickman & Schantz, 1981).

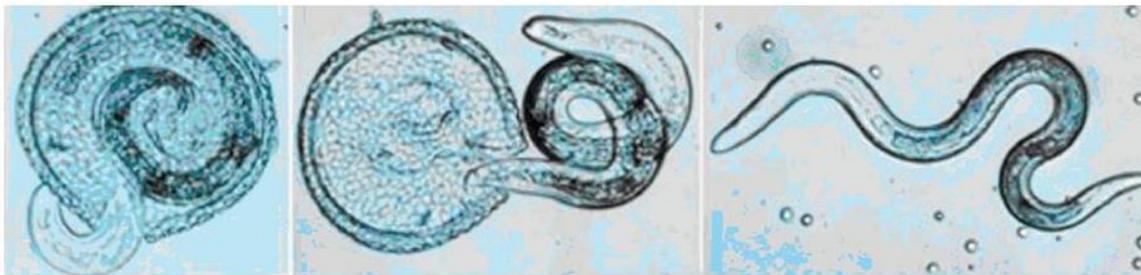


Figura 2: Diferentes etapas de la eclosión de la larva. Tomado de Nicoletti 2013.

Los huevos embrionados pueden infectar a una gran variedad de mamíferos no cánidos, entre ellos roedores que sirven como hospederos intermediarios, donde las larvas quedan estacionadas en el estadio L2 y una vez el perro ingiera el roedor es infectado por *T. canis*. Dentro de los mamíferos en los que la larva se puede desarrollar se encuentra el humano, el cual es un hospedador inadecuado, es decir las larvas no son capaces de completar su ciclo en este tipo de hospedero. Luego de la ingesta del huevo embrionado, la larva se libera y penetra la pared del intestino, entrando a la circulación donde es libre para migrar por todos los tejidos, como se representa en la Figura 3. La larva juvenil falla en su desarrollo hacia adulto, quedando en estado de pausa en su desarrollo, y puede permanecer migrando a través del cuerpo desde meses hasta años (Despommier, 2003). Si el parásito es alcanzado por la respuesta inmune del humano

este se puede ver confinado a un tejido en particular, en el cual puede sobrevivir de forma latente sin causar síntomas, o puede ser eliminado por la respuesta inmune del hospedero. Por otra parte la sola presencia del parásito en el tejido, cuando la respuesta inmune es fuerte es el causante de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad (Roldan, Espinoza, Huapaya, & Jimenez, 2010). Una vez el diámetro de la larva supera el diámetro de los vasos sanguíneos esta se aloja en el tejido que la rodea, siendo más común encontrarla en hígado, pulmones, corazón y cerebro. La migración de la larva produce hemorragia, necrosis e inflamación (Glickman & Schantz, 1981).

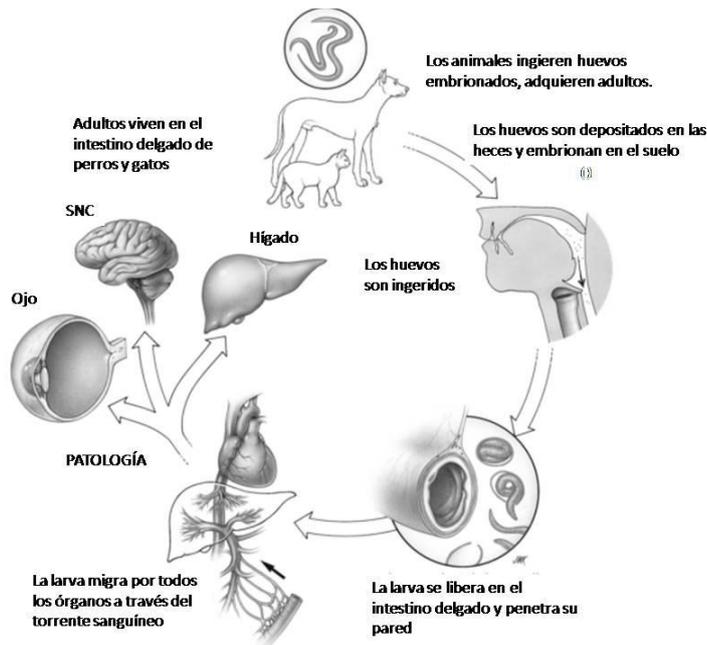


Figura 3: Infección del humano con huevos de *T. canis* y *T. cati*. Modificado de Despommier 2003.

La enfermedad toxocariasis:

Es una zoonosis causada por *Toxocara canis* o *Toxocara cati*. Estos son parásitos helmintos que afectan a perros y gatos respectivamente. Esta enfermedad es mayormente prevalente en países en desarrollo, pero también ha sido reportada como la parasitosis más común de Estados Unidos, está catalogada como una de las 5 enfermedades más importantes desatendidas por el CDC. Los más afectados por esta parasitosis son los niños, por estar más expuestos al contacto con tierra o arena contaminada durante el juego (Hotez & Wilkins, 2009). La transmisión de esta enfermedad se da frecuentemente, mediante la ingesta del huevo embrionado ya sea directamente del suelo, o en frutas, verduras y aguas contaminadas. Se ha descrito que otra forma de adquirir la enfermedad es mediante la ingesta de carnes crudas de hospederos como pollo y ganado, lo que implicaría que la larva enquistada en los tejidos es capaz de activarse en el proceso de digestión y penetrar el intestino (Magnaval, Glickman, Dorchie, & Morassin, 2001).

En América Latina se han reportado tasas que van desde el 2,5 al 63,2% de prevalencia (Olave AM, Mesa JA, Botero JH, Patiño EB, García GM, 2016). Uruguay presenta una alta prevalencia de esta enfermedad, llegando a ser según informes de zoonosis un 50% de los casos de parasitosis infantiles en Montevideo (Zoonosis, s. f.), desarrollándose mayormente en sectores vulnerables de la población. Como se mencionó anteriormente una sola hembra es capaz de depositar miles de huevos por día, esto se refleja en que el suelo sea el reservorio de mayor importancia de *Toxocara* spp. La falta de higiene pública y la dificultad en el diagnóstico de la toxocariasis, hacen de esta una enfermedad difícil de erradicar.

Según la localización de la larva esta puede generar diferentes síntomas. La mayoría de estos se confunden con otras enfermedades, haciendo necesario el desarrollo de un diagnóstico diferencial (Archelli & Kozubsky, 2008). La enfermedad presenta tres fases, la aguda, latente y crónica. La fase aguda ocurre inmediatamente después de la ingesta del huevo. La fase latente ocurre cuando el parásito queda confinado a un tejido en particular y es capaz de evadir la respuesta inmune, sin generar síntomas en el hospedador. La fase crónica ocurre como consecuencia de los daños ocasionados en el tejido por la respuesta inflamatoria (Roldan et al., 2010). Se definen cuatro formas de presentación para la toxocariasis:

- A) Sintomática [larva migrante visceral (VLM) o incompleta]
- B) Compartimentalizada [larva migrante ocular (OLM) o larva migrante del sistema nervioso]
- C) Covert o toxocariasis común (es una forma con síntomas que no son característicos de la toxocariasis, como ser asma, bronquitis, etc.)
- D) Asintomática

De las diferentes forma de presentación, la asintomática aparece en la bibliografía como la forma más prevalente en muchos pacientes a los que se les realizó un inmuno-diagnóstico (Paludo et al., 2007).

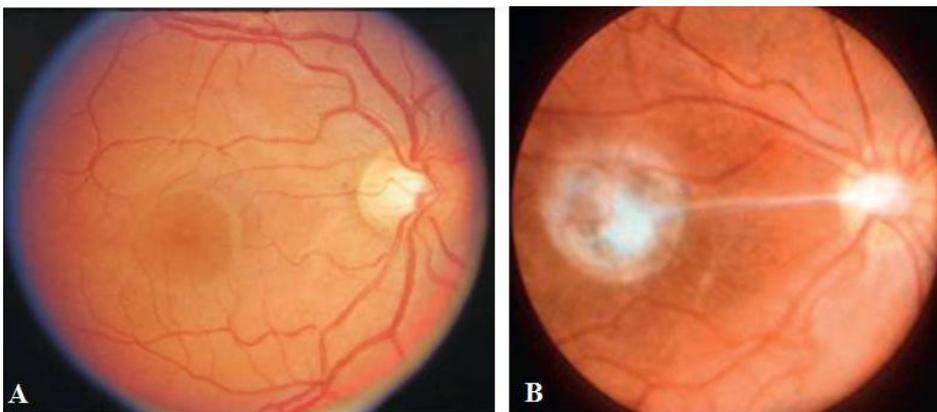


Figura 4: Fotografía de fondo de ojos. A- Ojo sano, B- Presentación clínica de toxocariasis ocular, con lesión en la retina y vítreo.

La VLM se desarrolla en niños de 1 a 7 años y es caracterizada por la presencia de eosinofilia, leucocitosis, fiebre, entre otros síntomas ligados al órgano donde este migra.

Cuando se aloja en el hígado se reportan síntomas como hepatitis, hepatomegalia y pruebas hepáticas levemente alteradas, la respuesta inflamatoria del hígado dependerá de la cantidad de larvas que sean ingeridas (Roldan et al., 2010). En la localización pulmonar se puede tener síntomas como asma, bronquitis, tos, neumonitis, obstrucción bronquial. Si bien los síntomas graves no son frecuentes se han descrito casos de neumonitis con derrames, también se reporta la vinculación entre asma y toxocariasis. En algunos estudios se ha visto que niños con problemas respiratorios presentan cuadros más recurrentes de asma luego de la infección por *T. canis*, si bien hace falta más evidencia parece haber una vinculación entre el asma y la toxocariasis (Altcheh, Nallar, Conca, Biancardi, & Freilij, 2003). En la localización cardíaca puede haber miocarditis, e incluso insuficiencia cardíaca. La miocarditis asociada a toxocariasis es capaz de afectar todas las edades, siendo mayormente afectados los niños menores de 5 años (Kuenzli, Neumayr, Chaney, & Blum, 2016; Overgaauw & Nederland, 1997). Por otra parte la OLM es más frecuente en niños mayores de 10 años y suele cursar sin eosinofilia (Archelli & Kozubsky, 2008). Esta forma de toxocariasis puede causar ceguera en el 64% de los casos (Roldan et al., 2010). La presencia de una larva en la pared de ojo o cerca del mismo provoca una respuesta inmune crónica, que puede causar lesión en la retina, pérdida de visión o estrabismo. La forma clínica más común de manifestación de esta enfermedad es un granuloma en el polo posterior que se asemeja a un retinoblastoma ver Figura 4 (Fillaux & Magnaval, 2013; Glickman & Schantz, 1981; Overgaauw & Nederland, 1997). La covert (CT) toxocariasis está relacionada a síntomas como fiebre, dolor de cabeza, problemas para dormir, resfrío, anorexia, hepatomegalia, entre otros, con o sin presencia de eosinofilia. Si bien se asemeja en los síntomas a la forma VLM, estos no caen en la clasificación de VLM pero tampoco son específicos (Nicoletti, 2013; Overgaauw & Nederland, 1997). La toxocariasis común presenta síntomas tales como disnea crónica, irritación de la piel, dolor abdominal, eosinofilia, niveles elevados de IgE, entre otros. La diferencia entre la covert toxocariasis y la toxocariasis común, es que la primera se desarrolla en niños, mientras la segunda en adultos. Es probable que las diferencias sintomáticas entre ambas se deba a la reacción del sistema inmune según sean niños o adultos (Nicoletti, 2013).

Se ha reportado que la tendencia al desarrollo de un tipo u otro de esta enfermedad se debe a la cantidad de larvas que efectivamente infectan al humano. Siendo más común que la VLM se desarrolle cuando existe un mayor número de larvas ingeridas. Esto se debe a que un gran número de larvas serían capaces de generar una respuesta inmune fuerte, quedando arrestadas en el hígado o siendo destruidas lo que limita su migración somática. Por otro lado un bajo número de larvas probablemente falla en generar una respuesta efectiva del sistema inmune facilitando su migración somática (Glickman & Schantz, 1981; Overgaauw & Nederland, 1997). También se ha descrito que dependiendo de la cantidad de larvas que infecten encontramos eosinofilia periférica en el paciente, ya que un mayor número de larvas favorece la eosinofilia (Roldan et al., 2010). Si bien las primeras formas que se describieron de esta enfermedad fueron la

VLM y OLM, es más común el desarrollo de CT. Siendo difícil definir una toxocariasis tipo OLM por inmunodiagnóstico dado los bajos títulos de anticuerpos generados en esta (Smith et al., 2009). En general la presentación de la toxocariasis como OLM es detectada únicamente durante exámenes de rutina del ojo (Nicoletti, 2013).

La toxocariasis asintomática o encubierta se suele desarrollar cuando la larva se localiza en el músculo esquelético no presentando sintomatología o muy pocos síntomas inespecíficos (Archelli & Kozubsky, 2008). En animales de experimentación infectados con *T. canis*, hay reportes que muestran cierto tropismo de la larva al sistema nervioso central (SNC). Si bien el involucramiento del SNC en humanos se considera raro, se han reportado casos donde se hallan larvas en el fluido espinal, en el cerebro (Figura 5) y en las meninges. Al igual que las otras formas de toxocariasis, esta no presenta síntomas específicos dificultando su diagnóstico. Este tipo de toxocariasis parece ser más frecuente en adultos que en niños (Magnaival et al., 2001; Nicoletti, 2013). Según la localización de la larva varían los síntomas, se comporta como pequeños tumores que desarrollan síntomas tales como encefalitis, meningitis, mielitis, convulsiones epileptiformes, trastornos conductuales entre otros (Archelli & Kozubsky, 2008). En el cerebro la larva no se encapsula, siendo libre de migrar en este. La migración de la larva deja necrosis y mínima infiltración de células inflamatorias. En algunos casos la toxocariasis del SNC puede ser asintomática (Roldan et al., 2010). Se ha visto asociación entre personas con epilepsia e infectadas por *T. canis*. En un estudio realizado en varias ciudades del mundo, se vio que las personas con epilepsia en su mayoría presentaban altos niveles de seroprevalencia para toxocariasis con respecto a un grupo control. Es probable que la relación entre los casos de epilepsia y toxocariasis se deba a la formación de lesiones en el cerebro, ya sea por lesiones focales o por la respuesta inflamatoria a su alrededor (Nicoletti, 2013).

Niños con diagnóstico serológico positivo para *T. canis*, presentan un menor desarrollo cognitivo que niños seronegativos. Estos resultados que se reportaron en Estados Unidos son independientes del estatus socio-económico, etnia, género, infección por citomegalovirus, residencia rural y niveles de plomo en sangre (Macpherson, 2013).

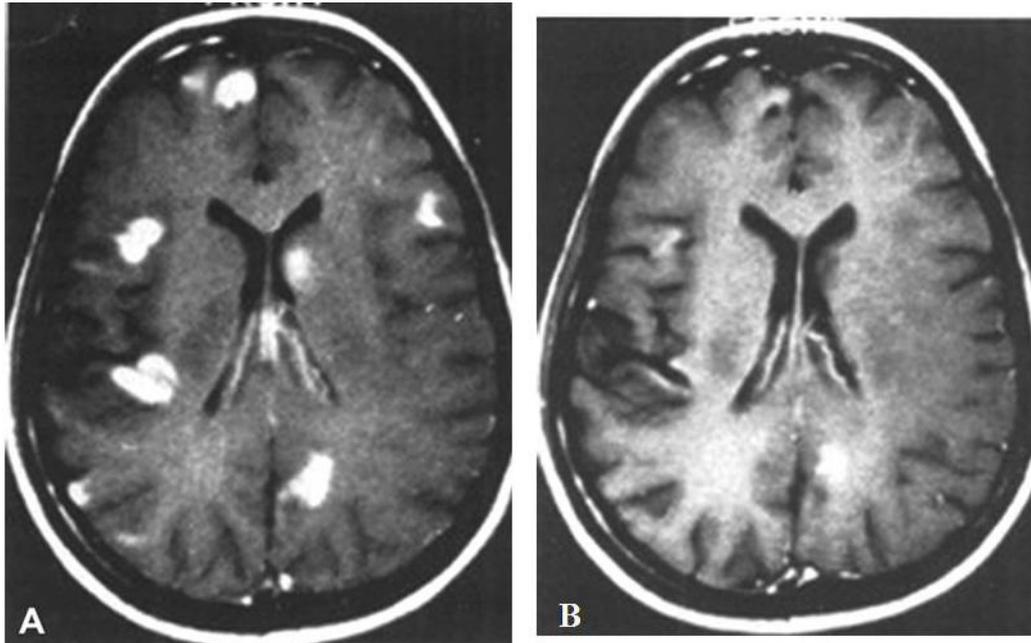


Figura 5: Imagen de antes y después del tratamiento con anti-helmínticos, resonancia magnética craneal. A- Antes del tratamiento con anti-helmínticos, B- Después del tratamiento con anti-helmínticos. Tomado de Nicoletti 2013

La relevancia de *T. cati* en el desarrollo de la toxocariasis no está muy clara, pero se han reportado casos de VLM y OLM con este parásito. Se han descrito también casos de VLM desarrollados por *Ascaris suum*. Para poder definir la importancia de *T. cati* en la toxocariasis el desarrollo de técnicas moleculares en el diagnóstico serían una mejor herramienta para la diferenciación de los parásitos (Macpherson, 2013).

Para el tratamiento de esta enfermedad se indican a los pacientes antihelmínticos como el tiabendazol, albendazol. A diferencia de las infecciones con *Ascaris*, el tratamiento con estas drogas para la toxocariasis debe ser de mayor duración. La indicación de antihelmínticos en pacientes asintomáticos o con OLM presenta controversia en otros países, dado que las reacciones inflamatorias desarrolladas por la necrosis de la larva podría generar lesiones oculares de mayor importancia en los pacientes con OLM, y en los asintomáticos no se sabe que podría pasar por desconocer la ubicación de la larva (Altcheh et al., 2003). En general el tratamiento de esta enfermedad involucra no solo antihelmínticos, de los cuales el más utilizado es el albendazol, si no también corticoides. La utilización de corticoides y anti-inflamatorios disminuye los efectos secundarios de la inflamación generada por la destrucción de la larva disminuyendo los posibles efectos adversos de esta (Magnaval et al., 2001).

Diagnóstico de la toxocariasis:

En 1921 se realizó el primer reporte del potencial infeccioso de *Toxocara spp.* por Fülleborn, pero recién en 1940 se caracterizó el síndrome en un niño con eosinofilia persistente atribuida a un ascaris (Glickman & Schantz, 1981). En 1964 se desarrolló por primera vez un test de piel para toxocariasis, que luego fue adaptado con anticuerpos fluorescentes en 1968 mejorando la especificidad, pero no fue hasta 1979

que se desarrollo uno de los primeros test de ELISA para la detección de toxocariasis con proteínas de excreción-secreción utilizadas como antígenos (de Savigny, Voller, & Woodruff, 1979). Con diversas mejoras y modificaciones este test es la base del que se sigue utilizando actualmente.

El diagnóstico de toxocariasis humana mediante la biopsia de tejido específico se encuentra en desuso, a pesar de que el hallazgo de la larva implica un diagnóstico de certeza, nos enfrentamos a la dificultad de hallar la larva en un tejido en particular. Esta dificultad radica en que, la toxocariasis asintomática, o covert, e incluso en un cuadro de larva migrante visceral, la larva no se encuentra ubicada en un tejido en concreto sino que está migrando a través de ellos. Otro caso en que la biopsia de tejido está contraindicada, es en la toxocariasis compartimentalizada donde una biopsia de tejidos del sistema nervioso u ocular, puede conllevar a un daño irreparable de los mismos. Por estas últimas razones es que la toxocariasis se diagnostica, principalmente por un conjunto de síntomas, evidencia clínica y por inmuno-análisis como el ELISA o el western blot. Un indicador de toxocariasis es la eosinofilia persistente que suele ser alta, excepto en la OLM la cual se puede llegar a cursar sin ella, en el caso de las infecciones con *Ascaris* y *Strongyloides* si bien hay eosinofilia esta suele durar poco en el tiempo, permitiendo así la diferenciación de estas parasitosis (Altcheh et al., 2003).

El serodiagnóstico se basa en la utilización de kit de ELISA comercial, que tiene como antígeno todas las proteínas de excreción-secreción (TES) del estadio L2/L3 de la larva crecido en cultivo (Paludo et al., 2007). Estos presentan diferentes especificidades (90-92%) y sensibilidades (75-86%) según la calidad del antígeno y si detectan inmunoglobulinas totales o algún subtipo específico. Normalmente el diagnóstico se confirma mediante western blot, el que resulta ser muy específico cuando se toman en cuenta las proteínas de bajo peso molecular (24, 30, 35, 55 y 70 kDa), que evitan la reacción cruzada con otros helmintos. A su vez se ha identificado que las bandas de 55 a 66 kDa son las responsables de la reacción cruzada con *Ascaris lumbricoides*. Se ha estandarizado un inmunoblot que se utiliza para el seguimiento de la enfermedad, en este se monitorean IgG contra las fracción mayor a 205 kDa, IgA para 29-38, 48-54, 81-93 kDa e IgE para la fracción de 95-121kDa (Roldán & Rubinsky-Elefant, 2012). En el caso particular de la OLM es probable que la serología en sangre periférica sea baja y el diagnóstico resulte confuso, siendo necesaria la confirmación mediante la detección de anticuerpos específicos producidos localmente, es decir en el humor vítreo (Archelli & Kozubsky, 2008). El diagnóstico de la toxocariasis en el SNC es difícil, este suele implicar la búsqueda de anticuerpos específicos en el líquido céfalo-raquídeo y eosinofilia. También involucra tomografía computada y escaneo con MRI, que detectan granulomas como lesiones difusas (Macpherson, 2013). En los últimos años se ha desarrollado un dot-ELISA que parece ser tan sensible como el ELISA estándar. La ventaja de este método es que es más barato y es más rápido (Roldán & Rubinsky-Elefant, 2012).

Las TES utilizadas para el test inmunológico son producidas por la larva mantenida in vitro en el estadio L2/L3 y ha sido la opción más confiable de diagnóstico (Smith et al., 2009). El problema es que este kit presenta reacción cruzada con otros nematodos, lo que es de importancia en zonas endémicas donde existen poli-parasitosis. La existencia de reacción cruzada es más frecuente en los antígenos de alto peso molecular que en los de bajo peso molecular, esto se ve reflejado cuando se emplean western blot para la confirmación del diagnóstico (Smith et al., 2009). A su vez se han reportado falsos positivos por la presencia de grupos reactivos similares a un tipo sanguíneo u otros glicanos (Maizels, 2013). Otro inconveniente es la ausencia de estandarización de los resultados, para su utilización en estudios epidemiológicos.

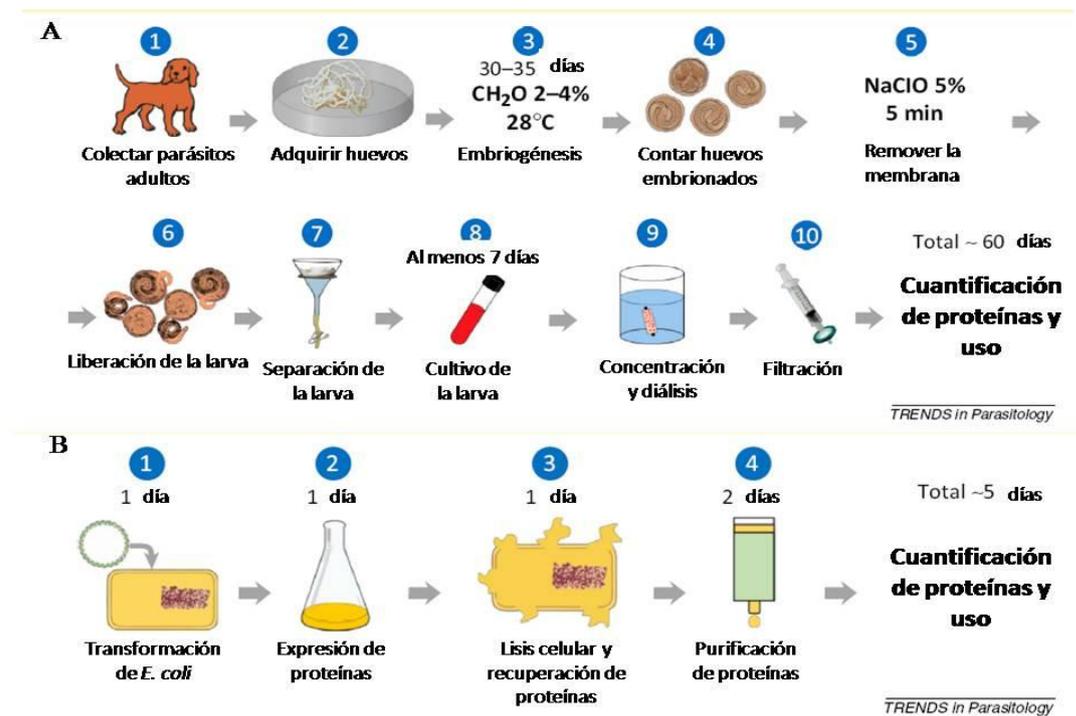


Figura 6: Esquemas de obtención de TES para su utilización como antígeno. A- Representa la obtención de TES nativa según el método descrito por De Savigny 1975, B- Representa la obtención de TES en forma recombinante. Modificado de Moreira et al. 2014.

Si bien, la utilización del método de ELISA parece ser el más prometedor, se ha visto que el empleo de proteínas nativas presenta reacción cruzada con otros parásitos en zonas endémicas con poli-parasitismo (Smith et al., 2009). En busca de mejorar la técnica de diagnóstico se han desarrollado diferentes diseños de ELISA, basados en encontrar anticuerpos anti-*Toxocara*. Así mismo también se ha desarrollado uno para la detección de la proteína de excreción- secreción utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TES-120, que ha sido eficaz para el diagnóstico temprano y el seguimiento de la quimioterapia (Roldán & Rubinsky-Elefant, 2012).

En estos últimos años la producción de proteínas recombinantes como antígenos aparece como una alternativa. Esto se vio en la utilización de TES-32, producida como

proteína recombinante e insoluble en *Escherichia coli*, en un ensayo de ELISA en el cual disminuyo a un 2-4% la reactividad cruzada con otros helmintos. Sugiriendo que una conformación correctamente plegada de la proteína puede mejorar la especificidad del ensayo, dado que no solo aportar antígenos conformacionales si no también lineales (Maizels 2013). También se ha empleado la proteína recombinante TES-30 para el desarrollo de una inmuno-cromatografía que resulto presentar mayor sensibilidad que un ELISA desarrollado con la misma proteína (Lim et al., 2015). La implementación de proteínas recombinantes en lugar de proteínas nativas en el desarrollo de un test inmunológico, ha disminuido la reactividad cruzada con otros nematodos. Como se puede ver en la Figura 6 la obtención de la TES nativas lleva al menos un mes y medio de trabajo solo en la producción de la proteína por parte de la larva en cultivo, a esto se le suma que la obtención de cantidad de proteína está limitada por la cantidad de larvas que se obtienen en el cultivo, uno de los métodos de obtención de proteínas nativas fue descrito por Nieves et al. 2012. Al contrario de esto la producción en forma recombinante de las proteínas de excreción-secreción (TES) en bacterias es más económica y simple, que su obtención mediante el cultivo de la larva L2 de *T. canis*.

Proteínas TES como antígenos:

Las proteínas de excreción-secreción de los parásitos se han visto ampliamente involucradas en la evasión de la repuesta inmune. Un mecanismo que se ha visto es el bloqueo de la respuesta IL-12p70, lo que muestra la tendencia al bloque de la respuesta Th1 (Hewitson, Grainger, & Maizels, 2009). Las proteínas de excreción-secreción de *T. canis* (TES) son estimulantes de la respuesta tipo Th2 y se ha visto que incluyen un set de glicoproteínas provenientes de tres tipos de genes. La mayoría de las proteínas de excreción-secreción son conformadas por dos lectinas tipo-C y tres tipos de mucinas. Las mucinas presentan O-glicosilación similar en estructura al grupo sanguíneo H de los mamíferos, y son el principal antígeno de los anticuerpos IgM en el hospedero durante la infección. En el caso de *T. canis* los glicanos similares al grupo sanguíneo se unen a las lectinas de DC-SING, lo que hace pensar que favorecen una respuesta del tipo regulatoria (Hewitson et al., 2009).

En los productos de secreción de *T. canis* las lectinas tipo-C son particularmente abundantes. El rol de la lectinas tipo-C no es claro, en el caso de las secretadas por *T. canis* (TES-32 y TES-70) se ha visto que presentan homología con proteínas de mamíferos tales como CD23 y el receptor de manosa de los macrófagos (Hewitson et al., 2009). También se ha visto que los glicanos presentan gran importancia en la modulación de la respuesta inmunológica. Los glicanos son capaces de generar una respuesta cruzada del Toll like- receptor (TLR) y del receptor de lectinas tipo-C en la célula dendrítica que llevan a una interferencia en la activación clásica de esta célula, facilitando la evasión de la respuesta inmune (Schabussova, Amer, van Die, Kosma, & Maizels, 2007). El conocimiento del rol de estas proteínas en la respuesta del hospedero las hace factibles de ser elegidas como un posible candidato para vacunas o desarrollo de test de detección. Lo anterior se basa en que si tiene un rol sobre la respuesta inmuno

probablemente genere anticuerpos que la hagan detectable en un test y en el caso de la vacuna el bloqueo de su acción disminuya las posibilidades de sobrevivir del parásito. En la Figura 7 se muestra un esquema de las funciones que se conocen para las proteínas de excreción-secreción para diferentes parásitos, donde aparecen las TES involucradas en la interacción con los macrófagos.

Las TES fueron descritas en primera instancia por sus pesos moleculares en un SDS-PAGE, donde la mayoría de las bandas correspondían a 26, 32, 45, 55, 70, 120 y 400kDa. Se observó un alto grado de glicosilación en aproximadamente un 40% de las TES. Han sido caracterizados 3 grupos de TES y glicoproteínas (Maizels, 2013). Las TES de mayor peso molecular descritas presentaron en los ensayos de ELISA mayor reactividad cruzada con otros parásitos (Smith, y otros, 2009), por otra parte en la inmuno-precipitación, antígenos generados comúnmente por la larva presentaron reactividad cruzada con antígenos del tipo sanguíneo A (Despommier, 2003). Se han reportado diferentes tipos de proteínas que forman parte de las TES nativas entre las que se destacan por lo menos 6 familias de mucinas, asociadas a la cutícula del parásito, también se han detectado 4 diferentes tipos de lectinas tipo C, 5 variedades de superóxido dismutasa, proteínas de unión a la fosfatidiletanolamina, solo 3 homólogos de ASP, entre otras (Despommier, 2003). Se ha reportado que la larva produce 2 ng de glico-proteínas solubles por día, como antígenos de excreción-secreción que difieren de los antígenos somáticos de la larva o del estadio adulto. Dentro de estas proteínas están incluidas, lectinas, mucinas y enzimas que modulan la respuesta inmune del hospedero. La capa proteica de la larva se recambia rápidamente en un rango del 50% en 1 h y del 80% en 48 hs, de esta forma el parásito podría evadir la respuesta inmune del hospedero. Dado la velocidad de intercambio de esta capa, los anticuerpos específicos se unen a la superficie de la larva facilitando el ataque de los eosinófilos, permaneciendo estos unidos incluso luego de la muda de la larva (Maizels, 2013). La respuesta inmune generada hacia las proteínas secretadas es más fuerte que hacia antígenos somáticos, que solo quedan expuestos en la destrucción de la larva, gran parte de estas proteínas están formadas por potenciales alérgenos (Fillaux & Magnaval, 2013; Macpherson, 2013; Magnaval et al., 2001).

En estudios moleculares se obtuvieron tres posibles candidatas para utilizar como antígenos en el desarrollo de una ELISA. Ellas son: TES-26, TES-30 y TES-120 (Olave AM, Mesa JA, Botero JH, Patiño EB, García GM, 2016). En la utilización de TES-30 en forma recombinante como antígeno en el desarrollo de un inmunoblot, se reportó la ausencia de reacción cruzada con los sueros de pacientes con toxoplasmosis, mientras que el ELISA con las TES nativas presentó reacción cruzada. Este resultado es de gran importancia para el diagnóstico de toxocariasis ocular, dado que permite diferenciarla de la toxoplasmosis ocular (Olave et al., 2016). También se ha utilizado la proteína recombinante TES-120 en el desarrollo de un test de ELISA en el que se reportó una alta especificidad. Por otra parte la combinación de tres proteínas de excreción-secreción producidas de forma recombinante en el desarrollo de un test que detecta IgG4 parece poseer mayor especificidad que los anteriores (Roldan et al., 2010).

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

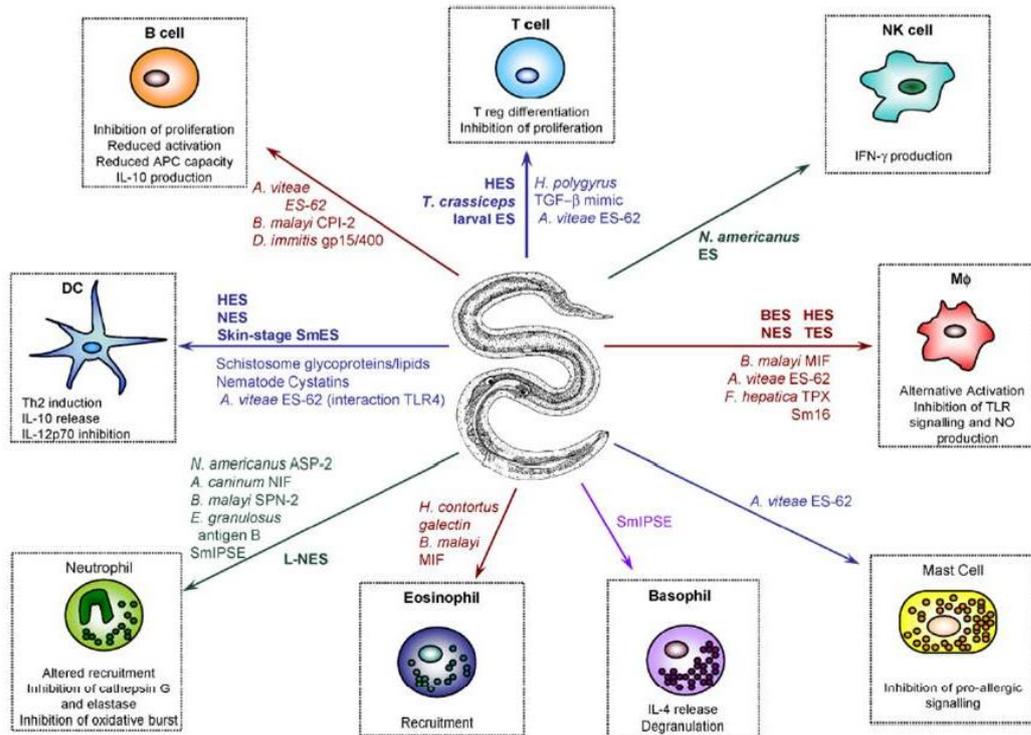


Figura 7: Esquema de las posibles acciones de las diferentes proteínas de excreción secreción de los helmintos. Tomado de Hewitson, Grainger, and Maizels 2009.

Las mucinas de *T. canis* son miembro de la familia de proteínas TES-120, a diferencias de las mucinas estas no presentan dominio de unión a membrana lo cual indica que es secretada. Son el mayor componente de la superficie larvaria, además estas proteínas presentan un dominio en el C-terminal con un repetido de seis cisteínas (repetidos en tándem de dominios en ShKT), el cual se ha visto asociado a otras proteínas de parásitos, indicando una conservación evolutiva del mismo (Loukas et al., 2000). La familia de TES-120 está formada por 5 mucinas presentes en la superficie de la larva, que se denominada como Tc-MUC-1, Tc-MUC-2, Tc-MUC-3, Tc-MUC-4, Tc-MUC-5 y son secretadas juntos con las otras TES (Długosz, Wasyl, Klockiewicz, & Wiśniewski, 2015). Estas proteínas presentan un repetido de treoninas y serinas donde ocurre la O-glicosilación (Maizels, 2013). Dentro de las 5 mucinas descritas la MUC-1 es uno de los mayores componentes de la superficie de la larva, y se ha visto que tiene un muy buen potencial inmunogénico (Fong et al., 2003). Esta protege a la larva de los anticuerpo y del ataque de los eosinófilos, este rol se da debido a su alto poder inmunogénico. Estas proteínas son reconocidas por los anticuerpos no dejando que estos accedan directamente a la larva disminuyendo los efectos que podrían tener estos sobre ella. El alto poder inmunogénico se debe a tres posibles razones: (1) se ubican en la parte más externa de la superficie parasitaria por lo que son fácilmente reconocidas por el sistema inmune; (2) las largas cadenas de glicanos conjugadas a proteínas multiplican los antígenos posibles; (3) la densidad antígenos glicanos puede ser mayor que la densidad de un epítope específico para proteínas, dado que una simple glicoproteína tiene grandes estructuras formadas por un simple glicano (Schabussova et al., 2007). De todas las mucinas descritas para *T. canis*, Tc-MUC-5 es la más divergente lo que

podría indicar que no forma parte de la familia TES-120. Los pesos moleculares de estas proteínas es menor del que se ve por SDS-PAGE dada su alta glicosilación se ha descrito que los pesos para Tc-MUC-1 es de 39.7kDa, Tc-MUC-2 es de 47.8kDa y Tc-MUC-3 es de 45kDa (Długosz et al., 2015).

TES-26 o Tc-PEB-1 es un homólogo a la proteína de unión a fosfatidiletanolamina de mamíferos. A pesar de esta homología, su estructura es muy diferente debido que presenta el mismo repetido de seis cisteínas que TES-120 (Maizels, 2013). Se ha reportado que un homólogo de la TES-26 es expresada tanto en la microfilaria como en el adulto de *Brugia malayi* (Hewitson et al., 2009), lo que podría llegar a pensar que este mismo comportamiento se observaría para TES-26.

Se ha observado que antígenos como TES-120 en forma recombinante y sin glicosilar aumenta la especificidad de la técnica y su sensibilidad. Por otro lado la proteína recombinante TES-26, si bien se ha visto que presenta una menor sensibilidad, otorga una mayor especificidad al diagnóstico de la toxocariasis. Hay estudios en los que se ha reporta una especificidad del 96,2% para TES-26 y del 92% para TES-120 (Mohamad, Azmi, & Noordin, 2009). La utilización de los antígenos nativos en un western blot, mostro que los antígenos de bajo peso molecular son más específicos para la detección de toxocariasis, sin embargo los de alto peso molecular muestran más reactividad cruzada con otras parasitosis. Esta evidencia junto con la constatación que el antígeno de 26kDa es el que se usa como marcador de toxocariasis, lleva a la hipótesis de que la utilización de TES-26 en el desarrollo de un ensayo puede servir como buen marcador de toxocariasis.

Los anticuerpos involucrados en el desarrollo del test:

Otro punto que se ha tenido en cuenta en la búsqueda del desarrollo de un ELISA específico para la toxocariasis, es que isotipo de anticuerpo sería mejor detectar en el ensayo. Hasta el momento los ensayos de ELISA comerciales que se han desarrollado solo detectan IgG total. En esta enfermedad la detección de IgM es un marcador clásico en la fase aguda, sin embargo no es muy útil dado que es poco probable el diagnóstico de toxocariasis en fase aguda, dado que no suele haber sospecha de esta enfermedad (Roldan et al., 2010).

El cuadro clínico de la toxocariasis implica una gran gama de síntomas, y son buenos inductores de reacciones alérgicas lo cual se refleja en un aumento de los eosinófilos y un aumento del nivel sérico de la IgE. El decidir que anticuerpo testear en el desarrollo de un test inmunológico no es tan simple. Se han podido detectar anti cuerpos IgE, IgM e IgG en pacientes con toxocariasis. Los anticuerpos IgE no son tan específicos como los IgG, IgM, estos se detectan únicamente en casos donde la enfermedad es aguda. Por su parte los IgG han sido ampliamente utilizados para la detección de toxocariasis y se ha podido encontrar anticuerpos específicos en el subtipo IgG4, que parecen favorecer la especificidad del ensayo (Mohamad et al., 2009). Los anticuerpos IgG4 se han utilizado en el diagnóstico de otras parasitosis como ser oncocercosis y filariasis

(Noordin, Smith, Mohamad, Maizels, & Fong, 2005). En concreto en un estudio entre los isotipos de IgG el IgG4 fue el isotipo más sensible y específico para la detección de la toxocariasis (Mohamad et al., 2009). Otros estudios han demostrado que un IgG-ELISA es más sensible que el IgG4-ELISA mientras que este último mostró ser más específico que el IgG-ELISA (Noordin et al., 2005). La detección de IgE favorece la especificidad del diagnóstico, pero es menos sensible que la detección de IgG. Otro inconveniente que presenta la detección de IgG, es que permanecen en circulación incluso años después de la infección por *Toxocara*, lo que no permite distinguir entre una infección activa o pasada (Roldán & Rubinsky-Elefant, 2012). Una forma de solucionar esto sería mediante la detección de IgE, cuyos títulos disminuyen en el primer año post tratamiento con tiabendazol, este no solo permite la diferenciación de un caso activo de uno pasado si no también el seguimiento de un paciente ya confirmado (Maizels, 2013; Roldan et al., 2010). Un ensayo que demostró tener eficiencia para facilitar la diferencia entre una infección pasada y una activa es el ELISA-Avidez –IgG con proteínas nativas, este emplea urea para disociar los complejos antígeno-anticuerpo, normalmente los anticuerpos de mayor avididad están relacionados con infecciones pasadas, mientras que los de menor avididad con infecciones recientes, por lo que esta técnica es una posible estrategia para la diferenciación de una toxocariasis, activa de una pasada (Archelli & Kozubsky, 2008).

A pesar de haberse desarrollado distintas formas de realizar los ensayos de ELISA específico para toxocariasis, ya sea mediante el cambio de anticuerpos a detectar o la forma que se presentan las proteínas, en la mayoría se ha fracasado en su implementación en zonas donde hay poli-parasitosis. La reacción cruzada con otros parásitos como *Ascaris sp.*, *Schistosoma*, entre otros, no se ha podido eliminar. Si bien se ha visto una mejora en los resultados mediante la combinación de algunos antígenos y la detección de determinado isotipo e anticuerpo. A pesar de ello los ensayos realizados hasta el momento no han sido estandarizados, ni se ha podido eliminar las reacciones cruzadas en zona de poli parasitismo y por lo tanto no se pueden utilizar en un estudio epidemiológico.

Diagnóstico molecular:

En el diagnóstico cada vez se apunta más a la utilización de las técnicas de biología molecular que favorecen la especificidad. Dentro de estas herramientas las más utilizadas son; la PCR de punto final, nested PCR y el real time PCR. Dentro de las ventajas de esta técnica, se encuentra la fácil aplicación en los diferentes tipos de muestras, desde sangre hasta tierra. La realización de varias muestras a la vez es muy sencilla, siendo útil en un rastreo para estudios epidemiológicos. Es una técnica económica, cada vez más utilizada en el diagnóstico tanto de cáncer, enfermedades hereditarias y parasitosis. En particular en los parásitos que se han diseñado PCRs de diagnóstico son *Toxoplasma gondi*, enfermedad de chagas, Leishmaniasis, entre otros (Jeon et al., 2009; Silva de Moraes et al., 2016; Thiong'o et al., 2016). El desarrollo de técnicas moleculares que permitan conocer la biología, diagnosticar y controlar la

toxocariasis y el rol de otros Ascarideos en la epidemiología de *Toxocara* spp. son de gran importancia para nuevas actividades de investigación (Macpherson, 2013).

En el caso de *T. canis* y *T. cati* esta técnica ha sido utilizada para la detección de huevos en suelo y heces de perros y gatos respectivamente. A lo largo de los años se han desarrollado diferentes protocolos de PCR en los que se describen diferentes juegos de cebadores, pero en todos los casos se ha elegido amplificar diferentes regiones del *internal transcribed spacer-2* (ITS-2) del ADN ribosomal, ver Figura 8. También encontramos reportes del uso de real time PCR para la detección de *T. canis* y *T. cati* en suelo y heces. En este trabajo se describen cebadores que amplifican parte del ITS-2 uno igual para ambos parásitos y otros dos específicos para cada uno (Durant et al., 2012). La utilización de PCR de suelo para detectar *Toxocara* es ampliamente utilizada, con la gran ventaja de que mediante secuenciación se puede distinguir entre los diferentes parásitos. También se ha usado PCR para la detección de *Toxocara* en leche de vacas (Pereira, Santarém, Batista, Merigueti, & Bin, 2016).



Figura 8: Esquema de la ubicación de los ITS de ARN ribosomal.

Se desarrollo una técnica de PCR para la detección de *Toxocara* en la biopsia de hígado de animales infectados experimentalmente tanto con *Toxocara* como con *Ascaris summ*, teniendo solo resultados positivos para *Toxocara* (Rai, Uga, Wu, Takahashi, & Matsumura, 1997). Se han desarrollado PCR que permiten la detección de ADN de *Toxocara* en el lavado bronquial de animales de experimentación dado que este es más accesible, sin embargo parece ser poco sensible (Roldan et al., 2010). Si bien en la mayoría de los casos los parásitos que se detectan mediante PCR directa en muestras de sangre son protozoarios, cuyo ciclo implica un pasaje por la sangre, o su estadía en la misma. Existen estudios recientes que muestran que los parásito secretan exosomas con micro ARN que son capaces de regular la respuesta inmunológica del hospedador (Buck et al., 2014; Siles-Lucas, Morchon, Simon, & Manzano-Roman, 2015) siendo probable que estos también contengan ADN del parásito haciendo posible la identificación del mismo mediante PCR. El desarrollo de una técnica molecular favorecería el desarrollo del conocimiento etiológico de la enfermedad, dado que aun no se sabe que tanto está involucrado *T. cati* en esta.

Se han diseñado diferentes pares de cebadores, de estos se eligieron los cebadores Tcan (especifico para *T. canis*), NC2 (*revers* que sirve tanto para *T. canis* como *T. cati*) y YY1 (permite diferenciar mediante secuenciación entre *T. canis* y *T. cati*) (Jacobs, Zhu, Gasser, & Chilton, 1997; Li et al., 2007).

Hipótesis de trabajo:

Las proteínas TES (excreción – secreción) del parásito purificadas de forma nativa a partir de estos organismos son usadas desde hace años en el diagnóstico. A pesar de los resultados disímiles en los kits comerciales son candidatos factibles de ser usadas para la elaboración de un test inmunológico, si son producidas de forma recombinante. La utilización de proteínas recombinantes puede favorecer la especificidad y sensibilidad de los ELISAs u otros test inmunológicos para la detección de la toxocariasis. La combinación de dos proteínas para el desarrollo del test favorecerá tanto la especificidad como la sensibilidad de este.

La toxocariasis es una parasitosis tisular con migración larvaria. Esta característica hace posible el uso de una herramienta molecular basada en la PCR para su diagnóstico. Para el desarrollo de PCR de diagnóstico se utilizarán cebadores específicos para genes que son los más utilizados tanto para la detección de huevos como para diagnóstico en otros parásitos.

Objetivos:

Objetivo general: Elaborar un test de diagnóstico para *Toxocara canis* en humanos, utilizando estrategias inmunológicas y moleculares.

Objetivos específicos:

- 1) Producir en forma soluble en *E. coli* y purificar las proteínas TES-26 y TES-120.
- 2) Optimizar el inmunoensayo para detección de *T. canis*.
- 3) Determinar el límite de detección para el diagnóstico por PCR con los genes COX1 e ITS-2.
- 4) Optimizar las condiciones del PCR para la detección de *T. canis* en sangre.

Materiales y métodos

Proteínas:

Expresión de proteínas:

Las secuencias codificantes de las proteínas estaban previamente clonadas en el vector pET41a (Novagen). Este vector presenta dos colas de histidinas, una en el N-terminal y otra en el C-terminal. También cuenta con un GST en el extremo N-terminal, que estaría favoreciendo la expresión en forma soluble de las proteínas. Las construcciones de las proteínas se realizaron entre los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Xho*I tanto para TES-26 como para TES-120. El peso teórico para TES-26 con GST es de 55 kDa y sin GST es de 29 kDa, para TES-120 es peso teórico con GST es de 46 kDa y sin GST 19 kDa. En la Figura 9 se representa de forma grafica como queda la construcción de las proteínas TES-26 y TES-120 en el vector de expresión pET41.

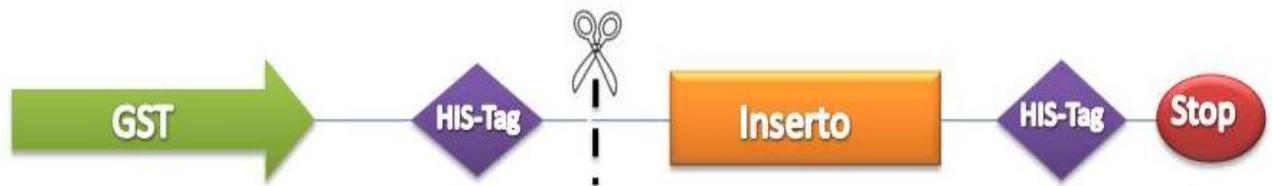


Figura 9: Representación gráfica de la construcción para las proteínas TES-26 y TES-120. Donde la tijera señala el sitio de corte para la trombina, His-Tag hace referencia a la cola de histidinas, GST hace referencia a la secuencia de la proteína GST, Inserto refiere a la porción donde se colocan las secuencias de TES-26 y TES-120 y “Stop” refiere al codón de finalización de la traducción.

Para la expresión de proteínas se probaron dos cepas diferentes de *E. coli*, la cepa SHuffle y la cepa BL21 STAR. Se eligieron estas cepas dado que; en el caso de SHuffle su citoplasma está modificado de forma que la formación de los puentes disulfuros se vea favorecida. Mientras que en la cepa BL21 STAR la degradación de los ARNm se ve disminuida favoreciendo su traducción.

Todas las expresiones se realizaron en el medio TB (terrific broth) conteniendo diferentes concentraciones de Kanamicina, fueron inducidas con IPTG (BioRon). En la Tabla 5 de la sección resultados y discusión, se resumen todas las condiciones que se probaron para las expresiones.

Lisis de células:

1. Se recuperaron las células mediante centrifugación a 14000 rpm, el pellet obtenido se pesó.
2. Se resuspendió agregando 5 mL del buffer de lisis* por cada gramo de pellet obtenido.
3. Se dejó en agitación por 1 h a RT.
4. Se centrifugaron a 14000 rpm por 30 min
5. Se recuperó el sobrenadante, que corresponde a la fracción soluble.
6. Se lavó el pellet con buffer fosfato 20 mM pH 7,4

7. Se centrifugó a máxima por 20 min
8. Se resuspendió la fracción insoluble en un buffer desnaturizante.

*Buffer de lisis está compuesto por: 0,5 M NaCl₂, 20 mM de buffer fosfato de sodio pH=7,4, 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT, inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich) en una relación de 1 mL por cada 20 g de células, 20 µg/mL DNasa, 1 mg/mL Lisozima (Sigma-Aldrich).

Visualización de proteínas:

La visualización de las proteínas obtenidas en el proceso se realizó mediante electroforesis desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE), estos se tiñeron con *Coomassie Blue* o nitrato de plata (Wray, Boulikas, Wray, & Hancock, 1981) según fuera necesario. Los diferentes marcadores de peso molecular se encuentran en el ANEXO I.

También se realizaron western blots con anticuerpo anti-histidinas (*Novex*®, *LifeTechnology*TM) para constatar que las bandas de expresión correspondían a las proteínas de interés. Para ello se siguió el protocolo que se describe a continuación:

1. Se corrió un SDS-PAGE al 15%.
2. Se realizó la transferencia en un sistema húmedo de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (#88018, *ThermoScientific*) por 2 hs a 200 mA a 4°C.
3. La membrana se dejó bloqueando toda la noche en solución de bloqueo.
4. Se incubó por 2 hs con anticuerpo anti-histidinas en una dilución de 1/1000
5. Se realizaron 6 lavados con TBST (10 mL de 1 M Tris-HCl pH= 7,5, 30 mL de NaCl 5 M, Tween 20 al 0,1%, H₂O destilada c.s.p. 1 L)
6. Se incubó por 1 h con anticuerpo anti- IgG de ratón (*Novex*®, *LifeTechnology*) conjugado a peroxidasa en una dilución 1/1000
7. Se realizaron 6 lavados con TBST
8. Se reveló con un reactivo quimioluminiscente (*Novex*® *ECL HRP Chemiluminescent substrate reagent kit* - Invitrogen)
9. Se visualizó mediante el sistema G:Box, SYNGENE

Las diluciones de los anticuerpos fueron realizadas en solución de bloqueo (TBST, 5% leche descremada en polvo, 2% glicina). La transferencia se realizó en buffer: Tris Base 1,51 g, Glicina 7,21 g agua destilada c.s.p. 100 mL, SDS 0,037%, 100 mL de Etanol y 300 mL de agua destilada.

Purificación de proteínas:

La purificación de las proteínas se realizó en columnas HisTrapTM HP de 1 mL en el equipo ÄKTATM System (GE Healthcare).

Se probaron varias condiciones en las que se varió la composición de los diferentes buffers tanto de unión como de elución pero siempre siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Se lavó la columna con 5 volúmenes de H₂O filtrada
2. Se equilibró la columna con 10 volúmenes de buffer *binding*
3. Se carga la muestra a 1 mL/min
4. Se lava con buffer de unión con 10 a 15 volúmenes, hasta estabilizar la absorbancia.
5. Se inyectó 100 µL de trombina 100 unidades/mL (Sigma-Aldrich) diluida en buffer *binding*, se dejó 2 hs a 4°C u ON a temperatura ambiente.
6. Se lavó con 5 volúmenes de buffer de unión
7. Por último se eluyó la proteína en un gradiente continuo de 25 volúmenes con buffer elución.
8. Se lavó la columna con H₂O
9. Se dejó en etanol 20% y se guarda a 4°C para futuras purificaciones.

Tanto el buffer de unión como el de elución se prepararon según lo sugiere el manual de la columna. Exceptuando el contenido de imidazol que para el buffer de unión se probaron de 20 a 40 mM, según indica el fabricante de la columna. En el caso del buffer de elución se probó con 250 a 500 mM de imidazol (Sigma-Aldrich).

Inmunoensayos:

Para la realización de los inmunoensayos se contó en primera instancia con 16 sueros positivos para toxocariasis y un suero negativo. También con dos pools de sueros uno positivo y otro negativo. Estos sueros provienen de una seroteca existente en el Dpto. de Parasitología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. El criterio utilizado por esta seroteca para definir que sean positivos o no, es que el ensayo de ELISA que se utiliza actualmente tenga un resultado positivo para toxocariasis y que esto concuerde con la clínica del paciente.

Para los ensayos se realizó la cuantificación de las proteínas purificadas, utilizando el *kit Qubit® ProteinAssay Kit de LifeTechnology™ (Ref. Q33212)* según indicaciones del fabricante.

Western blot:

Se realizaron en una primera instancia western blot de las fracciones soluble de TES-26, fracción soluble e insoluble de TES-120. Como control positivo se reveló con anticuerpo anti-histidinas al igual que se describió anteriormente. Se probaron algunos de los sueros positivos en una dilución 1/100 y como secundario se utilizó un anti-IgG humano conjugada a peroxidasa (Sigma A0170) en una dilución 1/3000.

Por otra parte se realizaron western blots con las proteínas TES-26 y TES-120 puras, para estos se utilizó el pool de sueros positivos en una dilución 1/100, como secundario un anti-IgG humano sin conjugar hecho en cabra (*Novex®, LifeTechnology™*) en una dilución 1/3000 y un anti- IgG de cabra conjugado a peroxidasa (*Novex®, LifeTechnology™*) en una dilución 1/1000

Dot blot:

Se armaron tiritas de nitrocelulosa donde se colocaron gotas de las proteínas purificadas y solubles. El protocolo que se siguió para este ensayo es igual que el descrito anteriormente para los western blot, pero en lugar de utilizar una única dilución de sueros de pacientes se probaron diferentes diluciones. Se revelaron con 1/3000 de anti-IgG humana hecho en cabra sin conjugar (*Novex®*, *LifeTechnology™*) y 1/1000 de anti-IgG de cabra conjugada a peroxidasa (*Novex®*, *LifeTechnology™*). Los dot blot fueron revelados o con reactivo quimioluminisciente (*Novex® ECL HRP Chemiluminescent substrate reagent kit* - Invitrogen) o con desarrollo de color (AEC, 3-amino-9-etilcarbazol).

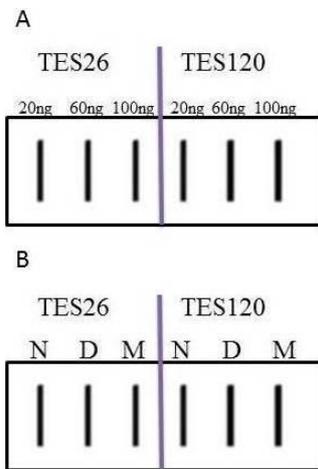


Figura 10: Esquema de las tiritas utilizadas para el dot blot. Donde N hace referencia a la proteína pura en forma nativa, D a la proteína pura desnaturalizada y M a la mezcla de ambas formas.

Se realizaron diferentes pruebas en las que se varió el armado de las tiritas (Figura 10) en dos formas distintas:

1. Las tiritas que denominaremos como **A** se diseñaron con diferentes cantidades de proteínas (20 ng, 60 ng y 100 ng).
2. Las tiritas que denominaremos **B** se diseñaron con 60 ng de proteína en forma nativa (N), 30 ng de proteína desnaturalizada (D) y una mezcla de ambas formas (M).

En la Tabla 1 se resumen las distintas diluciones de sueros utilizadas en los ensayos de dot blot.

Tabla 1: Resumen de los diferentes ensayos realizados para dot blot.

Tiritas	Dilución de sueros	Revelado
A	1/20, 1/50, 1/100, 1/200	Quimioluminisciente
A	1/100	Desarrollo de color
B	1/100	Desarrollo de color

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

Test de saturación con anticuerpo conjugado a peroxidasa:

Este test se realizó para probar la máxima cantidad de proteína que se podría utilizar en la sensibilización de la placa. Se realizó con ambas proteínas puras y por duplicado.

El protocolo seguido se describe a continuación:

1. Se sensibilizó la placa con 100 μ L de diferentes cantidades de proteínas (Tabla 2) diluidas en buffer carbonato 0,05 M pH=9,6
2. Se incubó toda la noche a 4°C.
3. Se descartó el líquido
4. Se enjuagó con H₂O destilada
5. Se colocó 100 μ L de anti- IgG de cabra conjugada a peroxidasa
6. Se incubó por 1 h a 37°C
7. Se lavó 3 veces con PBS/T
8. Se agregó 50 μ L de TMB (3,3', 5, 5' tetramethylbenzidina de Sigma-Aldrich) fresco, preparado según instrucciones de fabricante.
9. Se incubó por 20 min
10. La reacción se detuvo con 25 μ L de ácido sulfúrico 2 N
11. Se leyó la absorbancia a 420 nm en un lector de placa de ELISA

Tabla 2: Diferentes cantidades de proteína colocada en la placa de ELISA.

	Cantidad de proteína
A	20ng
B	40ng
C	100ng
D	200ng
E	500ng
F	1000ng

ELISA:

Antes de comenzar con el desarrollo del ELISA, se decidió probar los sueros con un kit de ELISA comercial de Abcam, se realizó según las instrucciones del fabricante. El kit fue utilizado con fines comparativos.

Para el desarrollo del ELISA se utilizaron el pool de sueros positivos y el pool de sueros negativos, que fueron utilizados como estándar. Esta primera prueba se realizó en *Microplate, 96 well, PS F-Bottonclear, Microlon®, High binding de Greinerbio-one (Ref. 655061)*

Se probó el siguiente protocolo:

1. Se sensibilizo la placa con 100 μ L de xng de proteínas diluidas en buffer carbonato 0,05 M pH=9,6
2. Se incubó toda la noche a 4°C.

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

3. Se descartó el líquido
4. Se enjuagó con H₂O destilada
5. Se bloqueó con 100 µL de PBS 5% leche descremada y 0,05% de Tween20.
6. Se incubó por 2 hs a 37°C.
7. Se descartó la solución de bloqueo.
8. Se colocó 100 µL de la dilución de los pool de sueros
9. Se incubó por 2 hs a 37°C
10. Se lavó 3 veces con PBS/T (PBS con 0,05% de Tween20)
11. Se colocó 100 µL de anti-IgG humana hecho en cabra a la dilución de trabajo
12. Se incubó por 1 h a 37°C
13. Se lavó 3 veces con PBS/T
14. Se colocó 100 µL de anti-IgG de cabra conjugada a peroxidasa
15. Se incubó por 1 h a 37°C
16. Se lavó 3 veces con PBS/T
17. Se agregaron 50 µL de TMB (Sigma-Aldrich) fresco, preparado según instrucciones del fabricante.
18. Se incubó por 20 min
19. La reacción se detuvo con 25 µL de ácido sulfúrico 2 N
20. Se leyó la absorbancia a 420nm en un lector de placa de ELISA

PCR para diagnóstico:

Extracción de ADN de sueros:

La extracción del ADN de los sueros se realizó con *ZRGENOMIC DNA*TM- Tissue Micro Prep de ZymoResearch. Siguiendo las instrucciones del fabricante.

La visualización del ADN obtenido se realizó mediante gel de agarosa al 1% a 80 mA en buffer TAE (Tris Acetato-EDTA). Se visualizó utilizando *SYBR® Safe DNA Gel Stain* de Invitrogen y exponiéndolo al UV. Las muestras obtenidas fueron cuantificadas por nanodrop.

Diseño de PCR:

Luego de la extracción del ADN de los sueros se procedió a realizar un PCR con cebadores que amplifican una porción del 18S humano descritos por Chang et al. 2009 (18sFw. GTAACCCGTTGAACCCATT, 18sRv. CCATCCAATCGGTAGTAGCG), de forma de verificar la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR. El producto esperado para estos cebadores es de 120pb.

Para el desarrollo de esta técnica se probaron dos estrategias; una de ellas involucra dos juegos de cebadores que amplifican parte de la COX (Citocromoxidasa) y otros dos juegos de cebadores que amplifican una parte del ITS2 (*internaltranscribedspacer2*) del genoma de *Toxocara canis*. Estos últimos los *forward* se denominan Tcan y YY1, mientras que el *reverse* se denomina NC2, estos cebadores provienen de la bibliografía y fueron descritos por Jacobs et al. 1997; Li et al. 2007. El producto esperado para Tcan-NC2 es de 380 pb y para YY1-NC2 de 400 pb aproximadamente.

Como alternativa a la primera estrategia se diseñaron cebadores para amplificar fragmentos de COX1. Como cebadores *forward* se diseñaron a

Tx1 (TATAAGTATCAGGGGGGCC, Tm= 57,3°C) y

Tx3 (AGGAGAGTGGACTTGGCT, Tm= 56,1°C),

y los cebadores *revers* diseñados fueron

Tx2 (CATAACAAAAGAGTGGCT, Tm= 53°C) y

Tx4 (AATCCAATCCATGCCACC, Tm= 58,4°C).

El fragmento esperado para Tx1-Tx2 es de 999pb, y para Tx3-Tx4 es de 486pb. En la Figura 11 se muestra un esquema del diseño de los cebadores. Los programas utilizados se resumen en la Tabla 3. Como control positivo de las PCR con los cebadores diseñados se utilizó ADNg de *T. canis*. Una de las razones por la que se decidió trabajar con la COX1 es que el genoma mitocondrial de *T. canis* es conocido y fue descrito en la bibliografía (Jex, Waeschenbach, Littlewood, Hu, & Gasser, 2008).

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos



Figura 11: Esquema de los cebadores diseñados para COX1.

Tabla 3: Programas utilizados en el desarrollo del PCR de diagnóstico.

Programa A		30 ciclos					
	Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	
	Tiempo	5min	30s	30s	30s	7min	
Programa B		35 ciclos					
	Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	
	Tiempo	5min	30s	30s	30s	7min	
Programa C		35ciclos					
	Temperatura	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	
	Tiempo	5min	30s	30s	30s	7min	
Programa D		35ciclos					
	Temperatura	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	
	Tiempo	5min	45s	45s	1min	7min	
Programa E		40 ciclos					
	Temperatura	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C	
	Tiempo	5min	45s	45s	1min	7min	
Programa F		40 ciclos					
	Temperatura	94°C	94°C	50 a 60°C	72°C	72°C	
	Tiempo	5min	45s	45s	1min	7min	

Para la reacción de PCR se utilizaron las enzimas por kit KAPPABIO y U-Taq (SBS), para las que se realizó la mezcla de reacción según las instrucciones del fabricante. En la Tabla 4 se resumen las pruebas que se realizaron para el desarrollo de la PCR de diagnóstico.

*Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de
Toxocariasis en humanos*

Tabla 4: Pruebas realizadas para el desarrollo del PCR de diagnóstico.

Pruebas	µL de molde	Cebadores	Programa	Enzima utilizada	Observaciones
1	3	Tcan-Nc ₂ /YY ₁ -Nc ₂	A	KAPA Taq	-
2	3	Tcan-Nc ₂ /YY ₁ -Nc ₂	B	SBS U-Taq	Se agregó DMSO al 5% al molde
3	3	Tcan-Nc ₂ /YY ₁ -Nc ₂	B	SBS U-Taq	SE calentó el molde a 65°C por 5min
4	5	Tcan-Nc ₂ /YY ₁ -Nc ₂	C	KAPA Taq	-
5	5	Tcan-Nc ₂ /YY ₁ -Nc ₂	C	SBS U-Taq	-
6	5	Tx ₁ -Tx ₂ y Tx ₃ . Tx ₂	D	KAPA Taq	-
7	5	Tx ₁ . Tx ₂	E	KAPA Taq	-
8	5	Tx ₁ -Tx ₂ y Tx ₃ . Tx ₂	F	KAPA Taq	Gradiente de temperatura**
9	10	Tcan-Nc ₂ , YY ₁ -Nc ₂ , Tx ₁ -Tx ₂ y Tx ₃ . Tx ₂	E	KAPA Taq	Límite de detección*
10	10	Tx ₁ -Tx ₂ y Tx ₃ . Tx ₂	D	KAPA Taq	-
11	5	Tx ₁ -Tx ₂ y Tx ₃ . Tx ₂	E	KAPA Taq	Se mantuvo la cantidad de ADNg en cada reacción
12	10	Tcan-Nc ₂ , YY ₁ -Nc ₂ , Tx ₁ -Tx ₂ y Tx ₃ . Tx ₂	E	KAPA Taq	Cantidad de ADN 40ng

Nota 1: * Para el límite de detección se probó desde 3.98 ng a 1.90 pg de ADNg de *T. canis* diluido en H₂O mQ. ** El gradiente se realizó entre los 50 a 60°C.

Resultados y discusión

Expresión y evaluación de la solubilidad de TES-26 y TES-120 en diferentes cepas de *E. coli*

El primer ensayo de expresión de estas proteínas se realizó utilizando la cepa SHuffle. Debido a la presencia de muchas cisteínas en estas proteínas, la cepa SHuffle presenta la ventaja de tener modificado el citoplasma favoreciendo la formación de los enlaces disulfuro. Las expresiones se realizaron en medio TB tal como se describió previamente en materiales y métodos.

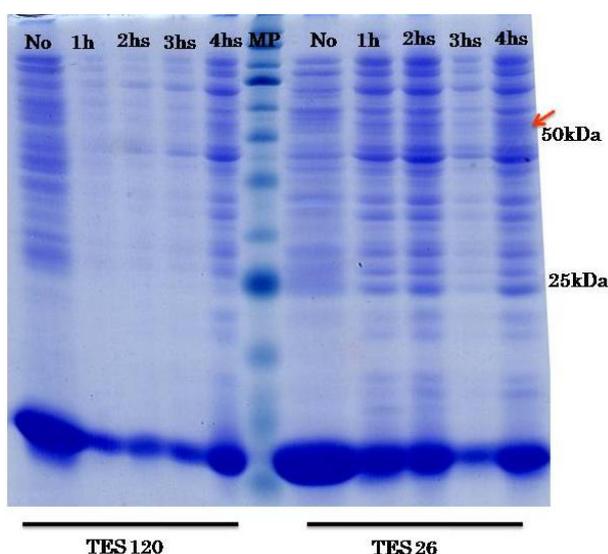


Figura 12: Expresión de TES en la cepa SHuffle. Gel de poliacrilamida al 15%, tenido con Coomassie blue. Se observan diferentes tiempos de inducción de la fracción soluble de las proteínas. Con la flecha naranja se indica la altura a la que se aprecia TES-26 unida a GST. Marcador de peso N P7710S (Figura 35).

En la Figura 12 se muestra la expresión de las proteínas luego de inducir con 3 mM de IPTG en diferentes tiempos, esta prueba se realizó dado que en una prueba previa con 1 mM de IPTG a 30°C, no se logró obtener cantidades significativas de proteínas de forma soluble. Como se puede ver en la figura la cantidad de proteína obtenida tampoco mejoró. Por este motivo se procedió a realizar diferentes pruebas en paralelo para buscar una forma de mejorar la expresión de las proteínas en forma soluble.

En procura de obtener cantidades considerables de proteína en forma soluble, se decidió realizar las expresiones a diferentes temperaturas y con distintas cantidades de IPTG, eligiéndose probar la expresión a RT y a 30 °C con 1 y 3 mM de IPTG. Los resultados se pueden observar en la Figura 13. Se define como condición 1; 30 °C y 1 mM de IPTG, condición 2; RT y 1 mM, condición 3; 30 °C y 3 mM y 4; RT y 3 mM IPTG

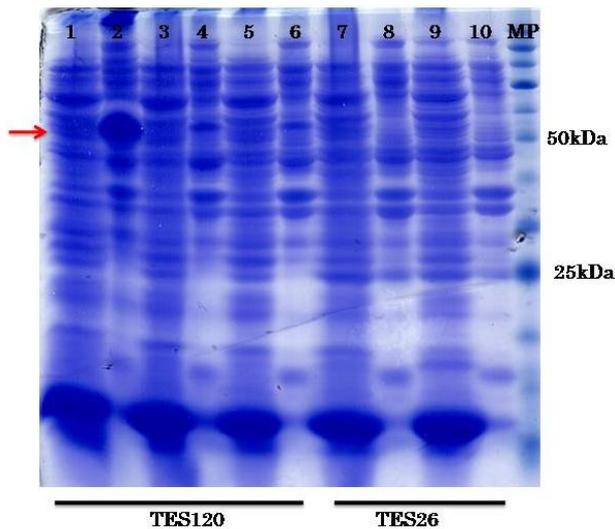


Figura 13: Pruebas de expresión en diferentes condiciones de las TES. Gel de poliacrilamida al 15% tenido con Coomassie blue. Orden: 1_ FS condición 1, 2_ FI condición 1, 3_ FS condición 3, 4_ FI condición 3, 5_ FS condición 2, 6_ FI condición 2, 7_ FS condición 4, 8_ FI condición 4, 9_ FS condición 1, 10_ FI condición 1. Donde FS refiere a las fracciones solubles y FI a las fracciones insolubles. Marcador de peso N P7710S (Figura 35).

Como se puede observar en la Figura 13 no fue posible mejorar la expresión de forma soluble de las proteínas. Sí podemos observar que el aumento de la cantidad de proteínas va acompañado de una mayor producción de proteína en forma insoluble. Esto se observa más claramente en el caso de la TES-120, donde en la condición 1 se obtiene gran cantidad de proteína, pero toda esta en forma insoluble.

Estos resultados nos motivaron a realizar nuevos ensayos. En los primeros ensayos todas las expresiones se realizaron con una aeración de 1/5. Según la bibliografía la aeración en la expresión de proteínas unidas a GST es de suma importancia por lo que se procedió a realizar diferentes pruebas con una aeración de 1/10. Al igual que en los ensayos anteriores no se obtuvo proteína soluble en cantidades importantes.

Ninguna de las pruebas anteriores mejoró en forma significativa la expresión de proteínas en forma soluble. Antecedentes anteriores en la expresión de estas proteínas describen la obtención de TES-26 en forma soluble utilizando la cepa BL21 START (Mohamad et al., 2009). Por ese motivo procedimos a realizar un nuevo ensayo de expresión con las condiciones descritas en ese artículo, donde no solo variaba la cepa de *E. coli* si no también la cantidad de antibiótico en el medio de expresión. Los resultados de este ensayo se observa en la Figura 14. Si bien la Figura 14 no permite visualizarlo se obtuvo una mejora en la expresión de proteína en forma soluble.

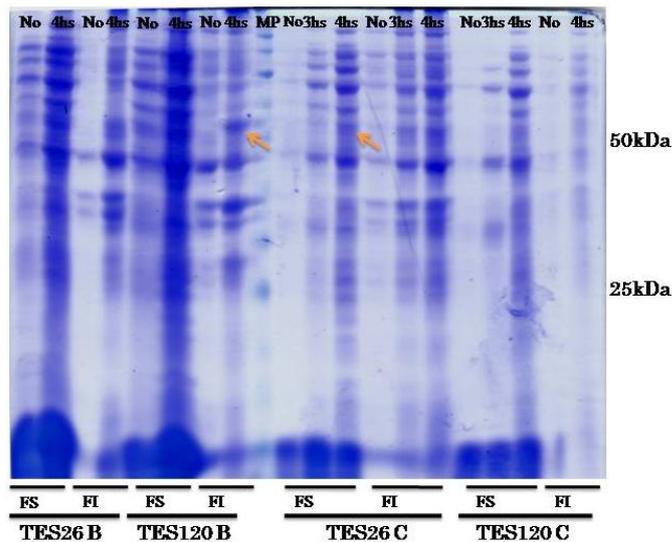


Figura 14: Pruebas de expresión de las TES en BL21 START. Gel de poliacrilamida al 15%, tenido con Coomassie blue. FI hace referencia a las fracciones insolubles, FS a las fracciones solubles, No corresponde a las fracciones no inducidas, 4hs refiere al tiempo de inducción. Las letras C y B hacen referencia a las condiciones descritas en la Tabla 5. Con las flechas naranjas se marca las bandas correspondientes a las proteínas. Marcador de peso N P7710S (Figura 35)

La mejora en la expresión de las proteínas en estos ensayos nos estimuló a seguir trabajando en la cepa BL21 STAR expresando las proteínas en la condición que se denomina C. En la Tabla 5 se muestra un resumen de todas las condiciones de expresión ensayadas para estas proteínas y sus resultados. Se decidió trabajar con la condición C en la cepa BL21 STAR, por ser la que presentaba un mejor balance en la expresión de ambas proteínas de forma soluble.

Tabla 5: Diferentes condiciones de expresión ensayadas para la producción de las proteínas TES.

Proteínas	SHUFFLE								BL 21 Start			
	Aireación 1/5				Aireación 1/10				Aireación 1/10			
Temperatura	RT		30°C		RT		30°C		30°C			
Condiciones	A	B	A	B	C	C	D	A	C	D	C	B
TES 26	Sb	-	-	N	S/I	Sb	Sb	Sb	Sb	Sb	S+	Sb
TES 120	-	I	I	I	S/I	Sb	Sb	Sb	I	Sb	Sb	I

Nota 2: A_ 3mM IPTG, 30µg/mL Kanamicina, B_ 1mM IPTG, 30µg/mL Kanamicina, C_ 1mM IPTG, 50µg/mL Kanamicina, D_ 3mM IPTG, 50µg/mL Kanamicina. Nota 3: Sb- Soluble expresión baja, N- no hay expresión, S/I- repartido soluble insoluble, I- insoluble, S+- más soluble

Este resultado no era esperable ya que pensábamos que la mayor cantidad de proteína fuera obtenida en la cepa SHuffle, por su capacidad para favorecer la formación de los enlaces disulfuro, y por lo tanto la estabilidad de la proteína. Es probable que la expresión de estas proteínas sea más dependiente de la estabilidad del ARNm que de la proteína en sí misma. Esto se puede asociar al hecho de que la cepa BL21 STAR ha sido modificada de forma tal que la vida media del ARNm sea mayor, y en esta cepa se obtiene mayor cantidad de proteína de forma soluble.

Logro: Expresión de proteínas TES en forma soluble e insoluble en la cepa BL21 START a 30 °C 1/10 de aireación 1 mM IPTG y 50 µg/mL de Kanamicina.

Purificación de proteínas TES-26 y TES-120:

Las dificultades para obtener grandes cantidades de proteínas de forma soluble, nos impusieron realizar pequeñas pruebas de purificación en paralelo a los ensayos de mejora de la expresión de las proteínas. En las primeras pruebas de purificación se utilizó poco volumen de partida por lo que la cantidad de proteína obtenida era baja. Se comenzó realizando la purificación como se describe en el manual de la columna de purificación, eluyendo la proteína en un gradiente continuo de imidazol de 25 volúmenes con un buffer fosfato de 500 mM imidazol. En este primer ensayo se obtuvo la proteína con alta cantidad de impurezas, para el lavado de la columna se utilizó un buffer fosfato con 20 mM imidazol. Para esta prueba se utilizó la fracción soluble de la proteína TES-26, dado que la TES-120 sólo se obtenía de forma insoluble en las primeras pruebas de expresión. En la Figura 15 se observa el gel de plata obtenido para la primera prueba de purificación de TES-26, como se puede observar la proteína eluye con otros contaminantes. Con la flecha violeta se señala la proteína sin GST y con la flecha roja la proteína entera.

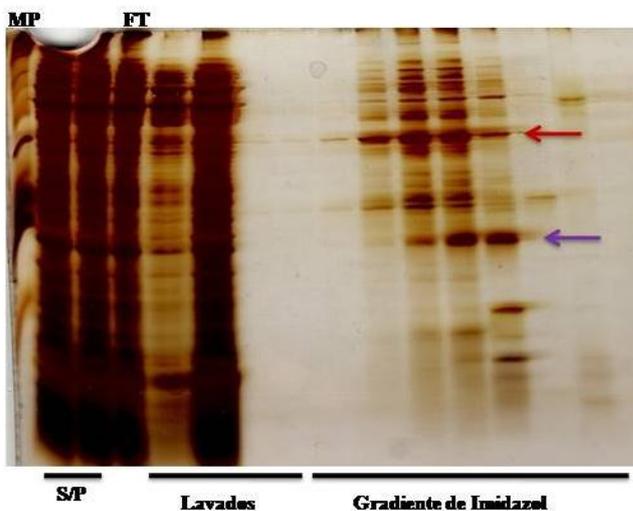


Figura 15: Purificación de TES-26 en columna HisTrap™HP. Gel de poliacrilamida al 15%, tenido con nitrato de plata. S/P- refiere a proteína sin purificar, FT- flow through es la fracción de la carga de la columna, Lavados- fracciones donde se paso buffer binding, Gradiente de imidazol- fracciones con concentraciones de imidazol ascendentes. Con la flecha roja se señala la proteína entera (TES-26 con GST) y con la flecha violeta la proteína sin GST. Marcador de peso molecular N P7702S (Figura 36)

Durante la purificación se observó que la proteína se separa de GST sin necesidad de proteólisis (Figura 15) pero no lo hace totalmente. Como la separación no es completa en las próximas purificaciones se agregó un paso de digestión de la proteína con trombina en la misma columna.

Para la segunda prueba se juntaron varias fracciones solubles de la proteína TES-120 y se realizó la purificación de la misma en una columna HisTrapTMHP con buffer fosfato 40 mM imidazol para lavar, una incubación ON a RT con trombina y la elución se realizó en gradiente continuo de 25 volúmenes con buffer 500 mM de imidazol. Como se puede observar en la Figura 16 se obtuvo la proteína más pura que en la primera purificación, es decir con menor contaminación. Con la flecha negra se señala la banda que correspondería a TES-120 sin GST. Si bien aun se observan proteínas contaminantes estas disminuyeron en gran medida en comparación con la primera prueba. Las proteínas de bajo peso molecular que se observa en el entorno a los 10 kDa podría ser Lisozima, que al utilizarse en el procesado de las células haya quedado restos de ellas en la columna de purificación.

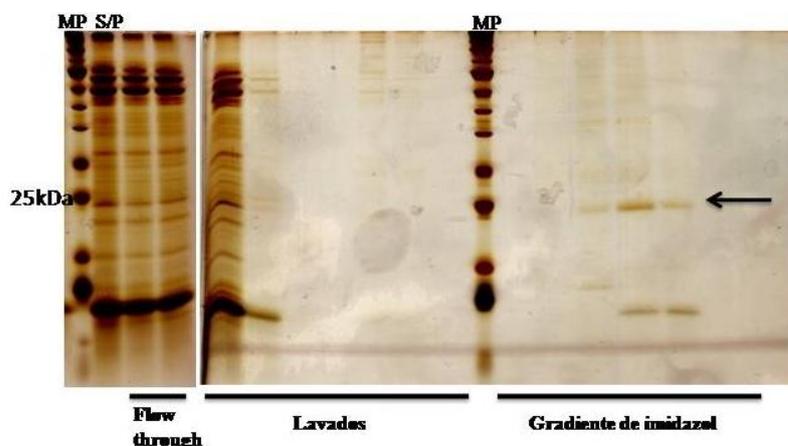


Figura 16: Purificación de TES 120 en columna HisTrapTMHP y digestión con trombina. Gel de poliacrilamida al 15%, teñido con nitrato de plata. S/P- proteína sin purificar, Flow through- fracción que sale de la columna mientras se carga, Lavados- fracciones en las que se pasa buffer de *binding* a través de la columna, Gradiente de imidazol- fracciones con concentraciones de imidazol ascendentes. Con la flecha negra se señala la banda que corresponde a la proteína pura sin GST. Marcador de peso N26616 (Figura 34).

Aunque es importante destacar que también se tiene menos cantidad de proteínas total desde el comienzo.

Una vez encontrada las mejores condiciones se procedió a realizar una expresión de 1L de medio para purificar las proteínas. Estas se purificaron siguiendo las mismas condiciones que la anterior. Para esta nueva purificación se obtuvo lo que se observa en la Figura 17. A pesar de la incubación con trombina aún se puede observar proteína unida a GST, aunque si bien se ven otras proteínas contaminantes la que se encuentra en mayor proporción en la proteína de interés.

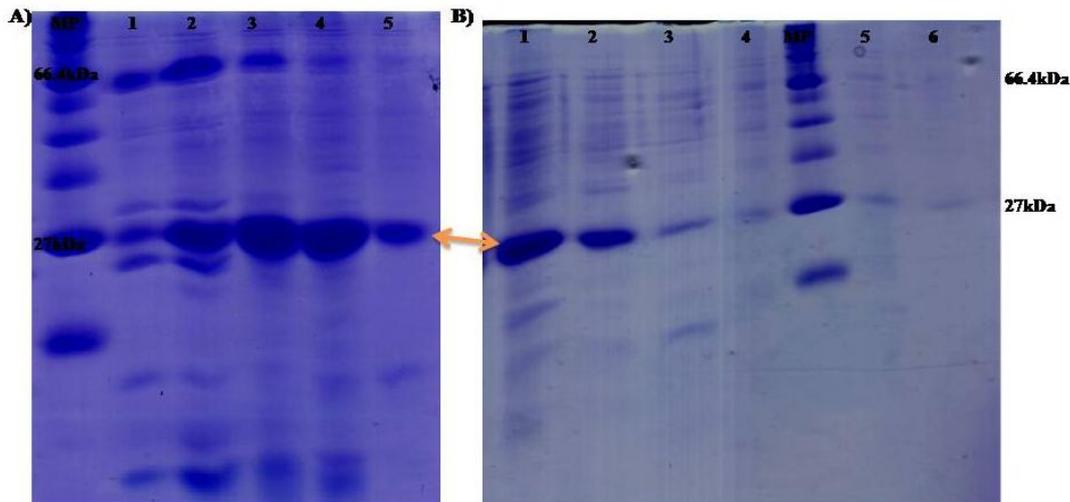


Figura 17: Purificación de TES-26 y TES-120. Gel de poliacrilamida al 15%, tenido con coomassie blue. A) Purificación de TES-26, 1 al 5 son diferentes puntos de la elución de la columna mediante gradiente de imidazol. B) Purificación de TES-120, 1 al 6 son diferentes puntos de la elución de la columna mediante gradiente de imidazol. Con la flecha naranja se señala la banda correspondiente a las proteínas TES-26 y TES-120 sin GST. Marcador de peso molecular N P7702S (Figura 36)

Con este último protocolo es que se continuó trabajando para la obtención de las proteínas puras que se utilizarán en los inmunoensayos. Se confirmó mediante western blot que las banda que se observan a la altura de 27kDa corresponden tanto a TES-12 como a TES-26 y no a GST (no se muestra). La concentración de proteínas obtenida luego de la purificación de la fracción soluble fue de 3.3 mg/L de medio de cultivo para TES-26 y 2.4 mg/L de medio de cultivo para TES-120. Las cantidades obtenidas para las proteínas son semejantes a las encontradas en la bibliografía (Olave et al., 2016).

Logro: Proteínas TES-26 y TES-120 purificadas mediante cromatografía de afinidad con una concentración de 3.3mg/L de medio de cultivo y 2.4mg/L de medio de cultivo respectivamente.

Inmunoensayos:

Para el desarrollo de los inmunoensayos se utilizaron 16 sueros de pacientes con resultado positivo para el kit comercial de toxocariasis y uno con resultado negativo para el kit que se consideró como suero negativo. Estos sueros fueron brindados por el Departamento de Parasitología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, como se mencionó previamente en la sección Materiales y Métodos. Estos sueros forman parte de una seroteca de este departamento y datan de los años 1992-1993.

Western blot:

Dada la dificultad para obtener proteína de forma soluble y pura al comienzo, y que encontrar el mejor protocolo para la expresión nos requirió más tiempo del que originalmente habíamos planificado, se decidió realizar una primera aproximación con las fracciones solubles e insolubles de las proteínas.

Como primera aproximación se realizaron western blot donde se sembró la fracción soluble de la TES-26 y tanto la fracción soluble como insoluble de las TES-120. Para este ensayo se seleccionaron solo alguno de los sueros con los que se contaba. La selección de qué sueros utilizar sólo se basó en la disponibilidad de los mismos, es decir se utilizaron solamente aquellos con los que se contaba con mayor volumen.

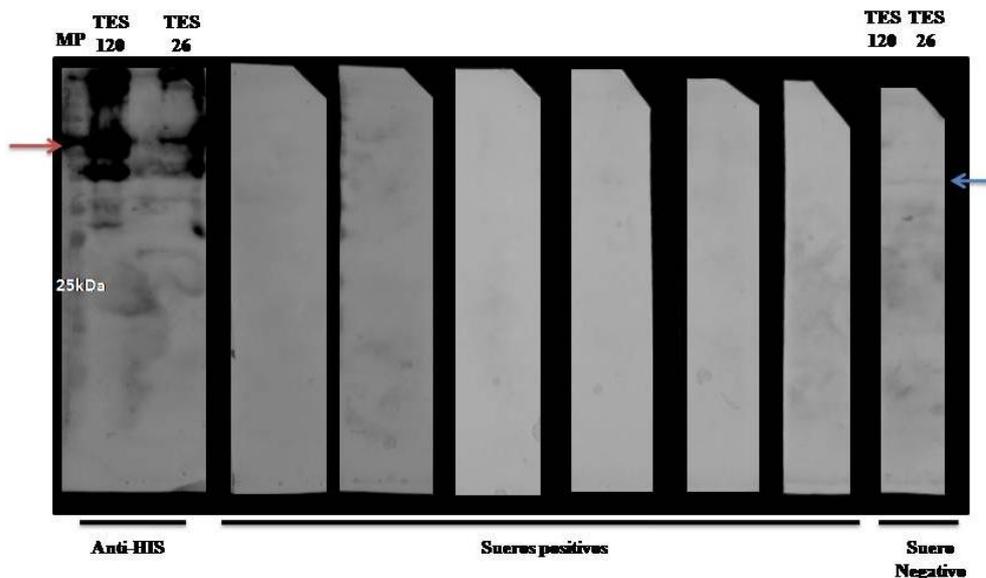


Figura 18: Foto del western blot con Sueros de pacientes. Cada tirita contiene las fracciones solubles e insolubles de TES-120 y la fracción insoluble de TES-26, en el orden que se marca para la tirita del suero negativo. Con la flecha rosada se marca la banda correspondiente las proteínas obtenida con el anti.his, con la flecha celeste se marca una señal inespecífica para el suero negativo. Marcador de peso N 26616 (Figura 34).

Como se puede observar en la Figura 18 el control con anticuerpos anti-histidinas reconoce las proteínas unidas a GST, en el caso particular de TES-120, el reconocimiento se da únicamente en la fracción insoluble, lo que indica que en estas condiciones la proteína se encuentra expresada de forma insoluble. Con la flecha rosada en la Figura 18 se marca las bandas pertenecientes a las proteínas (TES-26 y TES120

con GST) y con la flecha celeste se marca una proteínas de *E. coli* que fue reconocida por el suero negativo.

Los resultados del western blot mostrados en la figura indican que en líneas generales no parece haber reconocimiento por parte de los sueros positivos de proteínas nativas de *E. coli*. No cumpliéndose esto para el suero negativo en el cual se llega a apreciar reconocimiento de proteínas de *E. coli*. Otros de los resultados es que tampoco se llega a ver reconocimiento de las proteínas por los sueros positivos. Esto puede deberse a la baja concentración de proteína en las fracciones tanto soluble como insoluble. A pesar de que la dilución de los sueros fue baja (1/50), no se pudo observar reconocimiento de banda específica. Igualmente es probable que la no observación de banda sea por la baja cantidad de proteína y no por la dilución de los sueros.

En ensayos posteriores cuando ya se contaba con cantidad suficiente de proteínas se realizó un western blot con la proteína pura, para este ensayo también se armó un pool de sueros positivos (compuesto por los sueros que venimos trabajando) y un pool de sueros negativos (proveniente del Dpto. de Parasitología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina). Como controles se reveló, una membrana con anti-histidinas, otra con anti-GST, una con el pool de sueros positivos en una dilución 1/100, otra con el pool de sueros negativos con dilución 1/100 y por último se realizó un blanco en el que se reveló sin sueros pero con los anticuerpos anti-IgG humana y anti-cabra conjugado a peroxidasa.

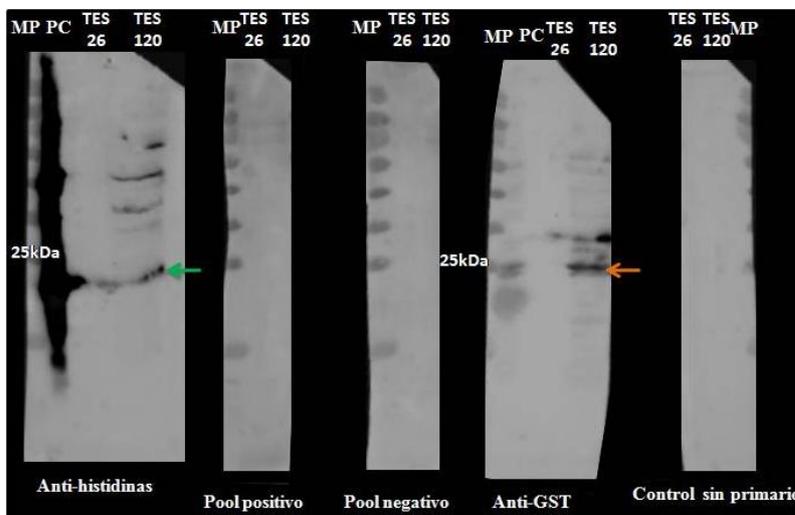


Figura 19: Foto del western blot con proteínas puras y pools de sueros. Con la flecha verde se señal la banda que corresponde a las proteínas puras sin GST y con la flecha naranja la banda que corresponde a GST. PC hace referencia a proteína control. Marcador de peso N26616 (Figura 34).

Como se puede observar en la Figura 19, en la membrana con anticuerpo anti-histidinas se ve reconocimiento de banda específica para las proteínas puras y también para una fracción insoluble de una proteína recombinante expresada en *E. coli* en nuestro laboratorio que presenta cola de histidinas (PC). Esta proteína se incorporo como control positivo del ensayo para comprobar la validez del anticuerpo anti-histidinas. El revelado con anticuerpo anti-GST se realizó para comprobar que esta no se encontraba con las proteínas puras, y en el caso de hacerlo no correspondía a la banda que se

reconoce con el anticuerpo anti-histidinas. Lo que se puede observar en el revelado con anticuerpo anti-GST es que en el carril correspondiente a TES-120 pura existen trazas de GST, pero su tamaño es diferente al observado en el reconocimiento por el anticuerpo anti-histidinas. En la membrana que se utiliza como blanco (control) , no se incubó con los pools, pero si con el anticuerpo anti-IgG humano y el anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado y no se observa reconocimiento inespecífico por parte del anticuerpo anti-IgG humana, ni el anti-IgG de cabra. Con las flecha verde se marca la banda que corresponde a las proteínas puras, con la flecha naranja se marca la banda de GST.

Sin embargo, a pesar de esta vez estar utilizando proteína pura no se observa reconocimiento de banda específica por el pool de sueros positivos, ni por el pool negativo. Es probable que la falta de reconocimiento sea por una baja cantidad de proteína en el western blot, dado que al ser proteínas expresadas en baja concentración y con la limitación del volumen de carga por los peines usados no se fue posible cargar en el gel mucho más que 40ng de proteína total. A esto además debemos añadir que la transferencia desde el gel a la membrana pudo no haber sido completa lo que hace que la cantidad e proteína en la membrana sea menor que la sembrada en el pocillo. Otra dificultad es que se trata de sueros que ya tiene por lo menos 20 años es posible que hayan perdido parte de su sensibilidad, comprometiendo así su capacidad para reconocer las proteínas.

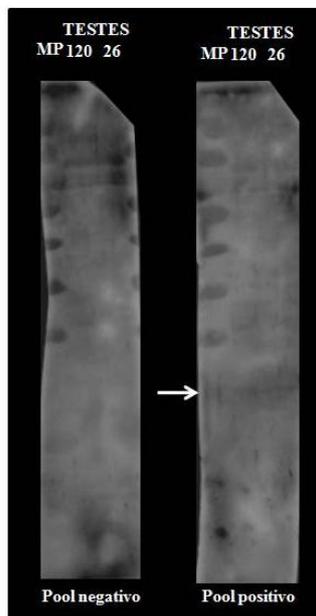


Figura 20: Foto del western blot para las proteínas puras frente a los pools de sueros. Marcador de peso N 26616 (Figura 34). La flecha blanca marca la banda correspondiente a las proteínas con el pool de sueros positivo.

Un nuevo ensayo de western blot con los pools de los sueros, permitió observar (Figura 20, señalado con la flecha blanca) bandas tenues de tamaño esperado para las proteínas puras. Es probable que la falta de señal se haya dado por la combinación de la poca cantidad de proteína y la baja sensibilidad de los sueros probablemente por tratarse

de sueros guardados durante mucho tiempo. En este último ensayo lo único que se modificó fue la dilución de los pooles en lugar de ser 1/100 fue de 1/50. Esta dilución muy baja de sueros nos hace pensar que los pooles de los sueros han perdido parte de su capacidad de reconocimiento de las proteínas. Se podría suponer que se puede deber a que las proteínas simplemente no son reconocidas por los anticuerpos por no ser buenas para el diagnóstico, esta teoría quedaría descartada, dado que ambas se han reportado como prometedoras y en particular TES-26 se utiliza en el diagnóstico de rutina cuando se realizan los western blot en el diagnóstico de toxocariasis y es considerada como un marcador específico de la enfermedad.

Si bien el western blot (Figura 20) nos permite demostrar que los sueros reconocen a nuestras proteínas como banda única, para el desarrollo de un test de diagnóstico es muy complejo y costoso. Los ensayos de western blot nos permitieron demostrar que los sueros no reconocen en un principio proteínas nativas de *E. coli*, y que las proteínas (TES-26 y TES-120) son reconocidas por los sueros, aunque la banda sea muy tenue. Es probable que si incrementamos la cantidad de proteína la señal sea más fuerte.

Logro: Reconocimiento de las proteínas recombinantes purificadas por el pool de sueros positivos para *Toxocara canis*. Ausencia de reconocimiento de proteínas de *E. coli* por western blot, de estos sueros.

Dot blot:

Luego de los western blot se procedió a realizar dot blots. Estos son una forma más sencilla y práctica de analizar diferentes cantidades de proteínas en una sola tira, lo que facilita la capacidad de reconocimiento por parte de los sueros.

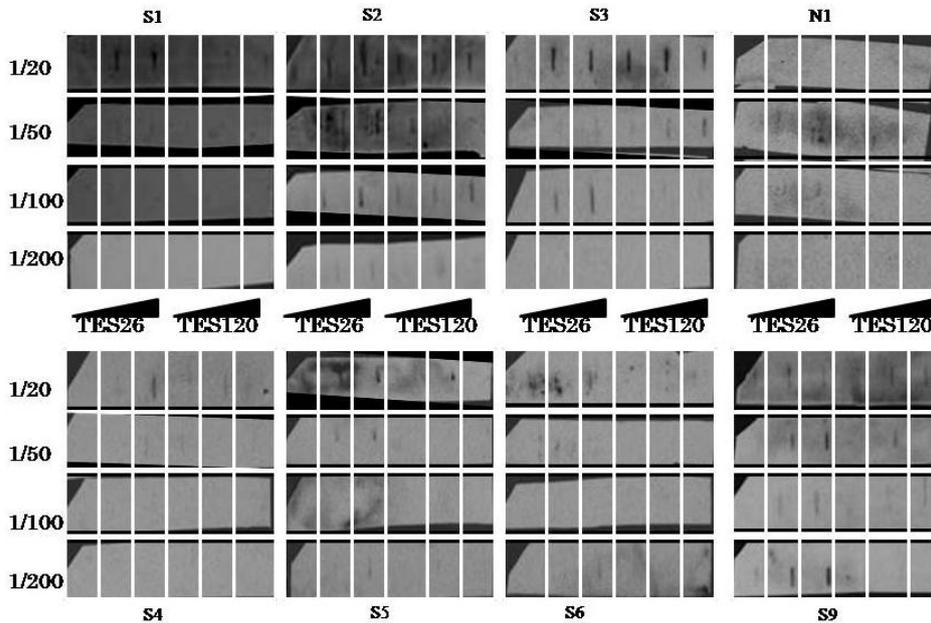


Figura 21: Foto de los dot blot de los diferentes sueros, en la tiritas se sembraron diferentes cantidades de proteínas como se indica en la Figura 10. Se marcan las diferentes diluciones de los sueros que se utilizaron en cada caso. Las S con números corresponden a los sueros positivos y la N con número al suero negativo.

En la Figura 21 se muestra uno de los ensayos de dot blot. A diferencia de los western blot que solo se probaron para algunos sueros con un pool de ellos, para los dot blot se probaron los 16 sueros positivos y el suero negativo. Como se puede observar en la Figura 21 en el suero negativo nombrado como N1 no se ve señal en ninguna de las tiritas. Las marcas que aparecen en cambio se deben problemas en el lavado de la tira. Por otra parte la mayoría de los sueros presentan señal en la dilución 1/20, y muy pocos en la dilución 1/100. Esto podría apoyar la teoría de que dado el tiempo de almacenados de los sueros han perdido parte de su capacidad de reconocer las proteínas.

Este primer ensayo fue revelado con quimioluminiscencia, como este es un método más sensible que el desarrollo de color que se utiliza en los ELISA, se decidió probar realizar la misma prueba pero revelando con reactivo de color (no se muestra). Los resultados para este dot se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 6: Resultado del reconocimiento de las proteínas por los sueros humanos por Dot blot revelado con anticuerpo anti-IgG de humano hecho en cabra y anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a peroxidasa, con reactivo de color AEC (3-amino-9-metil-carbazol)

Cantidad de proteínas	TES-26			TES-120		
	20ng	60ng	100ng	20ng	60ng	100ng
Sueros positivos	4/16	13/16	15/16	7/16	12/16	12/16
Suero negativo	0	1	1	0	1	1

Como se puede ver en la Tabla 6 se obtuvo señal para el suero negativo a diferencia del ensayo anterior. Esto podría deberse a que entre el primer ensayo de dot blot y este se cambió la forma de revelar dado que se utilizan dos anticuerpos secundarios, ya que no se contaba con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado como en el primer dot blot. Es posible que aunque hubiera una pequeña señal que antes no se percibía con este nuevo sistema, donde la señal queda amplificadas, dado que para revelar se utiliza un anti-IgG humana hecho en cabra sin conjugar y un anti-IgG cabra conjugado. Por otra parte, a pesar de que se trate de proteínas puras, es probable que hayan trazas de proteínas de *E. coli*, que no sean visibles por gel de acrilamida pero sí por dot blot, teniendo en cuenta que en el western blot de la Figura 18 (que se realizó con las fracciones solubles e insolubles) el suero negativo reconoce proteínas nativas de *E. coli*, tal vez la señal sea producida por esas proteínas y no por las TES.

A pesar de los resultados obtenidos para el suero negativo se decidió realizar otro ensayo con los dot blots. En este ensayo se sembró en un pocillo proteína de forma nativa, en otra proteína desnaturalizada (con SDS y β -mercaptoetanol) y en el tercero una mezcla de ambas formas. Esto se realizó para probar si había o no cambio en la capacidad de reconocimiento por parte de los sueros ante distintas conformaciones.

Tabla 7: Resultados del reconocimiento de las proteínas en diferentes conformaciones por los sueros humanos por Dot blot, en donde se sembró 30 ng de proteína pura.

Cantidad de proteínas	TES-26			TES-120		
	N	D	N/D	N	D	N/D
Sueros positivos	4/16	16/16	15/16	15/16	15/16	13/16
Suero negativo	1	1	1	1	1	0

La Tabla 7 muestra que en el caso de TES-26 como era de esperar mejoró la sensibilidad obteniendo reconocimiento por el 100% de los sueros. Sin embargo este resultado podría llegar a ser cuestionable dado que el suero negativo también reaccionó. La proteína TES-26 ha sido reportada como lo describimos anteriormente como marcador de toxocariasis por western blot, en el caso de TES-120 no parece haber diferencia entre la presentación de esta proteína de forma nativa o desnaturalizada frente a los sueros.

Logro: Las proteínas purificadas fueron reconocidas por los sueros de los pacientes mediante dot blot.

La conformación de la proteína TES-26 varía su capacidad de ser reconocida, siendo la forma desnaturalizada la más favorecida.

Evaluación serológica: comparación del inmunoblot con el ELISA comercial

Como se mencionó anteriormente al no existir una forma directa de localizar la larva de *T. canis*, para confirmar el diagnóstico, lo único que se puede hacer es comparar los resultados con el kit comercial de diagnóstico. Los resultados que se observan en la Tabla 8, corresponden a los que se obtuvieron para el kit comercial de ELISA. Los resultados están expresados en la unidad estándar que define el kit.

En este kit se define el *cut off* en 10 unidades estándar, lo que indica que cualquier resultado mayor o igual a 10 será considerado positivo. En el caso de nuestros sueros solo 6 de ellos resultaron positivos. El suero que definimos como negativo, según el criterio del test resultó negativo también.

Es probable que algunos de los sueros positivos hayan caído dentro de los valores negativos, dado que como se discutió anteriormente, probablemente las inmunoglobulinas se pueden haber afectado con el tiempo de almacenamiento, perdiendo parte de su capacidad para reconocer estas proteínas.

A pesar de que las inmunoglobulinas podrían no estar en buen estado, si comparamos los resultados obtenidos con el kit comercial frente a los obtenidos para los dot blot, es posible inferir que las proteínas recombinantes puras son más específicas, que el conjunto de proteínas de excreción-secreción. Si bien estos resultados no son definitivos, ya que sería necesario realizar la misma prueba con un mayor número de sueros. También sería importante contar con muestras frescas para poder comprar la especificidad de las proteínas puras, en comparación a la fracción de excreción-secreción que se utiliza en los kit comerciales.

Tabla 8: Resultados para el kit comercial de los sueros de pacientes con toxocariasis

Muestras	Unidades estándar	Resultados positivos
S1	16	+
S2	8	
S3	8	
S4	3	
S5	3	
S6	7	
S7	8	
S8	8	
S9	41	+
S10	37	+
S11	3	
S12	23	+
S13	11	+
S14	2	
S15	22	+
N1	3	
Control positivo	18	+
Control de Cut off	10	+
Control negativo	1	

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

Para visualizar la diferencia entre los resultados obtenidos para el test de ELISA comercial y los dot blots se realizó la Tabla 9.

Tabla 9: Relación de la prueba de ELISA-*TES* y el dot blot de *TES-26* y *TES-120*.

	Positivos	Negativos	Porcentaje %
Dot blot <i>TES-26</i> N/D	15	1	93.7%
Dot blot <i>TES-120</i> N/D	13	3	81.2%
ELISA comercial	6	11	37.5%

Nota 4: N/D- corresponde a la mezcla de proteínas nativa u desnaturalizada de la Tabla 7.

Como se puede observa en la Tabla 9 las proteínas en forma recombinantes fueron mejor reconocidas por los sueros de pacientes que en el ELISA comercial. Es probable que la sensibilidad del dot blot sea parcialmente mayor a la del ELISA comercial, pero para validar esto sería necesario contar con un mayor número de sueros.

Logro: Visualizar de forma comparativa la capacidad de ser reconocidas las proteínas recombinantes y su potencial como antígenos, por dot blot con el Elisa comercial de uso rutinario.

Test de saturación con anticuerpo conjugado a peroxidasa:

Como primer paso para realizar el ELISA se intentó realizar el test de saturación con el anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado a peroxidasa, este test es usado habitualmente para conocer la máxima cantidad de proteína que se puede sembrar en el pocillo de la placa.

Es un test muy simple y que podría ayudarnos a comprender si algún error o comportamiento extraño no se deba a estar trabajando con tanta cantidad de proteína, de forma que este formando más de una capa en el pocillo y bloqueando posible epitopes.

Tabla 10: Valores de absorbancia obtenidos para el test de saturación con peroxidasa.

Cantidad de proteína cargada por pocillo(ng)	Promedio de absorbancias para <i>TES-26</i>	Promedio de absorbancias para <i>TES-120</i>
0	0.695	0.676
10	0.690	0.695
40	0.681	0.725
80	0.685	0.733
100	0.694	0.716
200	0.656	0.727
300	0.663	0.723
600	0.651	0.679

Como se puede observar en la Tabla 10 no se llegó, con las cantidades de proteína utilizadas al límite de saturación. Para facilitar la visualización en la Figura 22 se realizó el gráfico de los valores obtenidos para ambas proteínas. Si bien algunos valores no siguen el comportamiento esperado, en líneas generales se observa que la cantidad de proteína no es suficiente para llegar al punto de saturación.

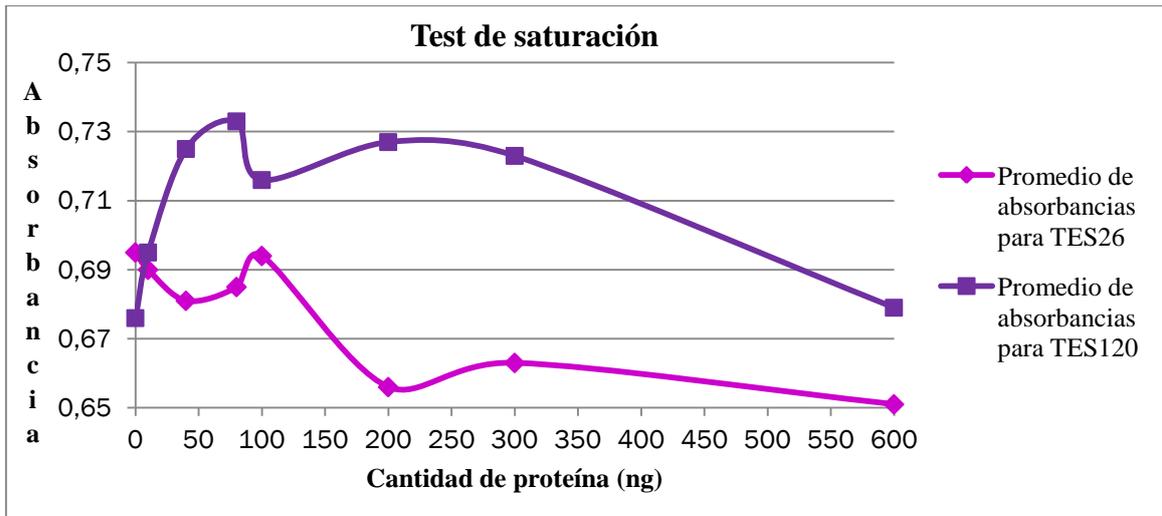


Figura 22: Gráfico de los valores obtenidos para el test de saturación

Este ensayo nos permite concluir que las cantidades utilizadas no son suficientes para llegar al punto de saturación. Esto reviste particular importancia dado que la mayoría de los ensayos se realizaron dentro del rango en que se probó esta técnica.

Logro: El test de saturación nos muestra que las cantidades de proteínas utilizadas hasta el momento se encuentran dentro del rango adecuado.

ELISA con TES recombinantes:

Una vez obtenidos los resultados para el kit comercial, se eligieron aquellos sueros que fueron positivos tanto en el ELISA comercial como para los dot blots. Se decidió realizar un ensayo de ELISA con diferentes cantidades de proteínas para ver como esto afecta el reconocimiento de las proteínas en placa. En este ensayo se hizo un pool con los sueros elegidos, este pool se utilizó en una dilución de 1/100, como la que se utiliza en el kit comercial, esta prueba se realizó por duplicado.

Tabla 11: Absorbancias obtenidas para ELISA con las TES recombinantes.

Cantidad de proteína (ng)	Sueros para TES-26	Blancos para TES-26	Sueros para TES-120	Blancos para TES-120
40	0,730	0,173	0,817	0,237
50	0,697	0,164	0,811	0,220
60	0,836	0,239	0,826	0,218
70	0,774	0,196	0,827	0,280
80	0,765	0,207	0,787	0,279
90	0,775	0,235	0,896	0,258
100	0,802	0,216	0,874	0,230
200	0,732	0,262	0,822	0,287

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

Los promedios de los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 11. Esta tabla muestra que los valores de absorbancia obtenidos para las proteínas son buenos en todos los casos y bien diferentes del valor del blanco. No se ve una variación muy marcada entre las diferentes cantidades de proteínas ensayadas. Si se ve claramente que las proteínas están siendo reconocidas por el pool de sueros. No es posible realizar más conclusiones dado que sería necesaria la utilización de un pool de sueros negativos para comparar. El siguiente ensayo consistió en probar las distintas cantidades de proteínas con diferentes diluciones de los anticuerpos, tanto del pool de sueros como el anticuerpo anti-IgG humana. Como se puede observar en la Tabla 12 no se observó gran variación en los valores de absorbancia en las diferentes pruebas.

Tabla 12: Absorbancias obtenidas para ELISA con diferentes diluciones de anti-IgG y sueros, con TES-26 y TES-120.

Cantidad de proteína (ng)	TES-26						TES-120					
	1/3000				1/2000	1/1000	1/3000				1/2000	1/1000
anti-IgG	1/20	1/50	1/100	1/200	1/100		1/20	1/50	1/100	1/200	1/100	
Sueros												
40	0,450	0,344	0,307	0,254	0,575	0,485	0,689	0,382	0,422	0,376	0,420	0,606
50	0,541	0,387	0,319	0,256	0,581	0,547	0,648	0,556	0,474	0,354	0,675	0,595
60	0,532	0,391	0,394	0,287	0,647	0,632	0,672	0,610	0,480	0,392	0,722	0,672
70	0,532	0,408	0,343	0,271	0,581	0,592	0,656	0,552	0,536	0,363	0,647	0,609
80	0,473	0,396	0,327	0,253	0,599	0,565	0,635	0,546	0,443	0,341	0,624	0,578
90	0,487	0,412	0,242	0,244	0,586	0,435	0,644	0,533	0,500	0,360	0,687	0,510
100	0,506	0,406	0,332	0,260	0,579	0,549	0,273	0,592	0,452	0,363	0,634	0,558
200	0,428	0,393	0,271	0,265	0,575	0,749	0,789	0,607	0,526	0,374	0,479	0,642

Para continuar con el desarrollo de los ensayo de ELISA se consiguió un pool de sueros positivos y uno de sueros negativos para poder comparar los resultados obtenidos con el pool positivo frente al negativo. Se realizó un ensayo de ELISA con estos sueros y diferentes cantidades de proteínas para visualizar el comportamiento de la absorbancia. Para este ensayo la dilución de anticuerpo anti-IgG humana fue de 1/2000 y 1/100 de los pools de sueros.

Tabla 13: Valores de absorbancia obtenidos para el ELISA de los pool negativo y positivo, con TES-26 y TES-120 como antígeno.

Cantidad de proteína (ng)	TES-26			TES-120		
	1/2000			1/2000		
anti-IgG	Pool positivo	Pool negativo	Blanco	Pool positivo	Pool negativo	Blanco
Sueros						
0	0,810	0,749	0,362	0,802	0,731	0,602
40	0,668	0,731	0,216	0,726	0,703	0,243
80	0,758	0,764	0,296	0,742	0,720	0,343
500	0,868	0,845	0,263	0,726	0,775	0,397
1000	0,773	0,776	0,278	1,300	0,735	0,324
2000	0,713	0,698	0,217	0,765	0,762	0,324
3000	0,714	0,632	0,273	0,789	0,644	0,355

Como se puede observar en la Tabla 13 los valores obtenidos para el pocillo sin proteínas es muy alto en comparación a los obtenidos para los pocillos con proteína. Por

otra parte el comportamiento para TES-120 y TES-26 fue similar. Para verlo de forma más gráfica se realizó el gráfico de TES-26, con el suero positivo y negativo (Figura 23).

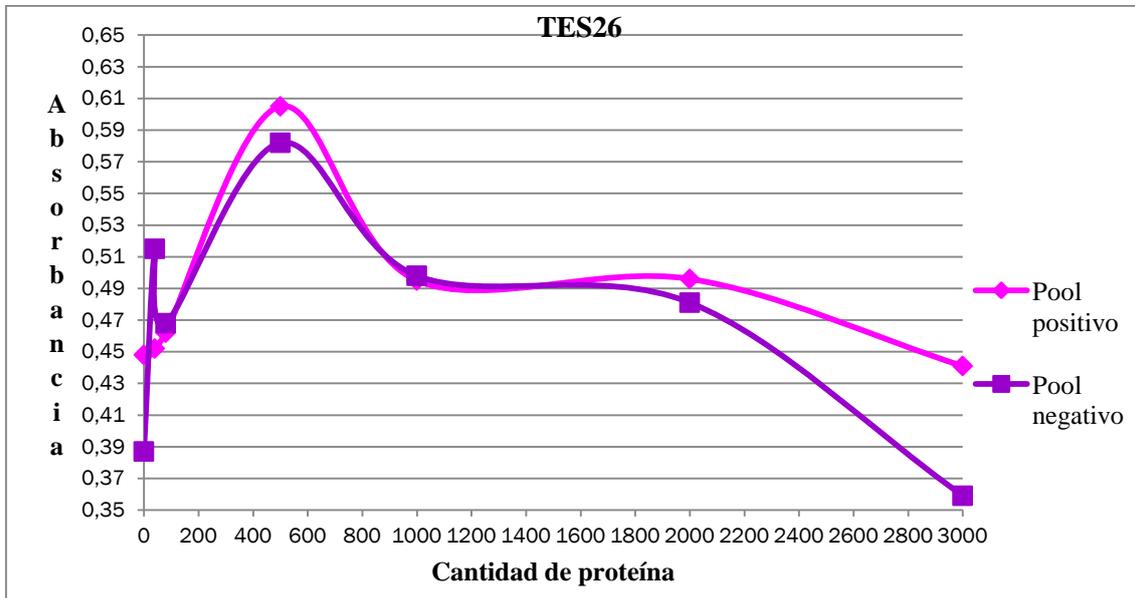


Figura 23: Gráfico de los valores de la Tabla 13 para TES-26

Como se puede observar en la Figura 23 los valores obtenidos para el pool positivo y negativo son semejantes. Estos se comienzan a separar únicamente cuando la cantidad de proteína sembrada en el pocillo es de 3 μ g. Dado el comportamiento de la absorbancia en los pocillos sin proteína tanto para los sueros como para el blanco (el cual se realizó incubando con anticuerpo anti-IgG humano hecho en cabra y anti-IgG de cabra conjugado a peroxidasa) es probable que haya problema en el proceso de bloqueo de la placa, tanto en la composición de buffer como en el tiempo que se deja bloqueando. Sería necesario realizar una prueba donde se deje o bien bloqueando más tiempo o con una solución de bloqueo de diferente composición. También se podría pensar que los anticuerpos secundarios están reconociendo algún elemento del buffer de bloqueo por lo que dan señal incluso en ausencia de proteína. Esta teoría podría descartarse si consideramos que en el caso del western blot cuando se realizaron los blancos no se vió reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos secundarios en la membrana.

Para poder obtener un mejor panorama de lo que está sucediendo sería necesario repetir el ensayo con pools de sueros positivos y negativos más nuevos, de forma de poder descartar que el reconocimiento inespecífico por parte de los mismos se pueda deber a que se encuentren deteriorados por el tiempo de almacenamiento, y haya reconocimiento inespecífico. También sería de interés contar con un mayor número de sueros que sean confirmados para *Toxocara* y se tuviera la información de a qué tipo de toxocariasis pertenecen. Para poder desarrollar el test y determinar su especificidad sería de gran importancia contar con sueros confirmados para *Ascaris*, *Strongilus*,

Toxoplasmosis y otras parasitosis para poder definir que tanto se disminuye las reacciones cruzadas con otros parásitos.

En el caso de contar con un mayor número de sueros confirmados para toxocariasis y otros negativos para la misma, sería de vital importancia realizar los test estadísticos habituales para la obtención de la sensibilidad y especificidad del test que se está desarrollando. En este trabajo no fue posible realizar un procesamiento estadístico de las muestras, dado que en el ensayo de ELISA solo se trabajó con los pools de sueros negativo y positivo, por lo que no sería correcto aplicarlo en este caso.

En la bibliografía se ha reportado que la utilización de proteínas recombinantes provenientes únicamente de *T. canis*, dejarían por fuera en el diagnóstico la toxocariasis causadas por *T. cati*, dado que no presentarían en el suero del paciente anticuerpos capaces de reconocer proteínas de *T. canis*. En particular se reportó que la utilización de TES-120 de *T. canis* en forma recombinante deja por fuera en el diagnóstico toxocariasis causados por *T. cati* (Zahabiun et al., 2015). Según esta evidencia una forma de mejorar el test a desarrollar sería agregándole al test proteínas de *T. cati*, dado que no se conoce que tanto este podría estar involucrado en el desarrollo de la toxocariasis y no siempre las proteínas de *T. canis* son reconocidas por anticuerpos generados en una respuesta anti- *T. cati*.

En el caso particular de nuestros ensayos como mayor medida sería imperativa la utilización de sueros frescos para poder eliminar el factor del tiempo como posible razón de reconocimiento inespecífico. Si bien los resultados para los ELISAs ensayados son un poco confusos, los obtenidos por western blot y dot blot nos alientan a pensar que ambas proteínas son prometedoras para el desarrollo de una test inmunológico para la toxocariasis. Es probable que sean necesarios ajustes en el diseño del test aunque en nuestro caso apuntamos en el futuro al desarrollo de un test del tipo inmunocromatográfico, y este trabajo nos acerca un poco más hacia este objetivo.

Logro: Verificar la capacidad de las proteínas recombinantes TES-26 y TES-120 de ser reconocida por el pool de sueros positivos usando ELISA

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

PCR para diagnóstico:

Como estrategia paralela se planteó el desarrollo de una técnica molecular, en este caso se eligió la PCR de tiempo final. Para el desarrollo de esta PCR, como se explicó anteriormente en la sección de Materiales y Métodos, se diseñaron pares de cebadores capaces de amplificar parte de las COX1 (citocromo oxidasa 1) estos se denominaron Tx1, Tx3 (*forward*), Tx2 y Tx4 (*reverse*). También se utilizaron los cebadores YY1, Tcan y NC2, que se describen en la literatura para la detección de *T. canis* en suelo, amplifican una porción del ITS-2.

A su vez como control de que el material no presentaba inhibidores para la reacción de PCR, se utilizaron cebadores que amplifican una porción de gen 18S humano. Estos cebadores deben amplificar independientemente de que haya o no ADNg de parásito, por eso se utilizan como control de que la reacción no está siendo inhibida.

Extracción de ADN de sueros:

Si bien sería mejor contar con sangre para la realización del PCR, se decidió probar si esta podría funcionar en los sueros. Se procedió a realizar la extracción de ADN de los sueros, mediante un kit comercial. Al igual que para las primeras pruebas de inmunoensayos se seleccionaron solo algunos de los sueros, según disposición de los mismos, para la extracción de ADN.

La cantidad de ADN obtenida para los sueros fue muy baja, no se podían visualizar por gel de agarosa, pero de todos modos se cuantificaron mediante nanodrop. Los valores obtenidos se resumen en la Tabla 14, en esta se muestra que las concentraciones obtenidas fueron muy bajas. También observa en la tabla que las relaciones entre la absorbancia a 260 y 280 están muy por debajo de lo esperable lo que indica que el ADN no se obtuvo con una buena pureza.

Tabla 14: Medidas de absorbancia y concentraciones obtenidos en nanodrop para los ADN de sueros.

Sueros	A ₂₈₀	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración ng/μL
S1	0,099	0,087	0,88	4,3
S2	0,107	0,102	0,95	5,1
S3	0,121	0,089	0,73	4,4
S5	0,122	0,107	0,88	5,4
S6	0,066	0,061	0,92	3,1
S8	0,073	0,071	0,97	3,5
S11	0,086	0,081	0,95	4
N1	0,177	0,187	1,06	9,3

Una vez analizados los resultados anteriores se realizó una nueva extracción de ADN de los diferentes sueros. Los resultados se muestran en la Tabla 15, como se puede

observar la concentración de los ADN obtenidos no mejoró, ni tampoco el grado de pureza.

Tabla 15: Medidas de absorbancia y concentraciones obtenidos en nanodrop para los ADN de sueros.

Sueros	A ₂₈₀	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración ng/μL
S1	0,085	0,064	0,76	3,2
S2	0,105	0,056	0,53	2,8
S3	0,142	0,097	0,68	4,8
S5	0,092	0,025	0,27	1,3
S6	0,148	0,129	0,87	6,5
S8	0,128	0,118	0,92	5,9
S11	0,081	0,086	1,07	4,3
N1	0,082	0,075	0,91	3,7

El volumen de los sueros no era suficiente como para realizar más extracciones por lo que se decidió realizar las primeras pruebas con estos ADN obtenidos. Aunque podrían no funcionar por la baja concentración de ADN total. Hay que tener en cuenta que de todo el ADNg el de *T. canis* será una fracción muy pequeña. Igual se decidió seguir adelante dado que la técnica de PCR es una técnica muy sensible y capaz de amplificar desde una cantidad muy baja de ADN.

PCR de control positivo de extracción de ADN de pacientes:

Se realizó una PCR a tiempo final usando como molde el ADN obtenido de sueros de pacientes y con los pares de cebadores 18S para humano. Las PCR se corrieron en un gel de agarosa del 1% y el resultado obtenido se observa en la Figura 24.

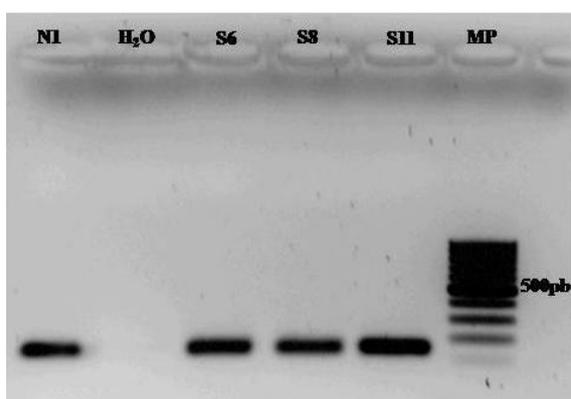


Figura 24: Fotografía de gel de agarosa al 1% del resultado de la PCR usando cebadores para 18S, con algunos de los ADN de los sueros. Marcador de peso molecular de 500pb N SM0242 (Figura 38)

El resultado muestra que a pesar de que tanto las concentraciones como pureza no son buenas, fue posible amplificar la región del ARNr 18s humano a partir de este ADN. Luego de esto se procedió a realizar ensayos de PCR para los sueros con los cebadores YY1-NC2 y Tcan-NC2. Se comenzó con el programa A (ver Tabla 3 en la sección Materiales y Métodos) con estos cebadores.

Logro: Obtención de ADN desde sueros del cual fue posible amplificar una región del gen del ARN r 18S humano mediante PCR.

Sensibilidad de la PCR Límite de detección de los cebadores

Antes de continuar con el desarrollo de la PCR se procedió a buscar el límite de detección para los cebadores que se utilizan. El límite de detección se realizó utilizando el programa E y corresponde a la prueba 9 (véase Tabla 3 y Tabla 4).

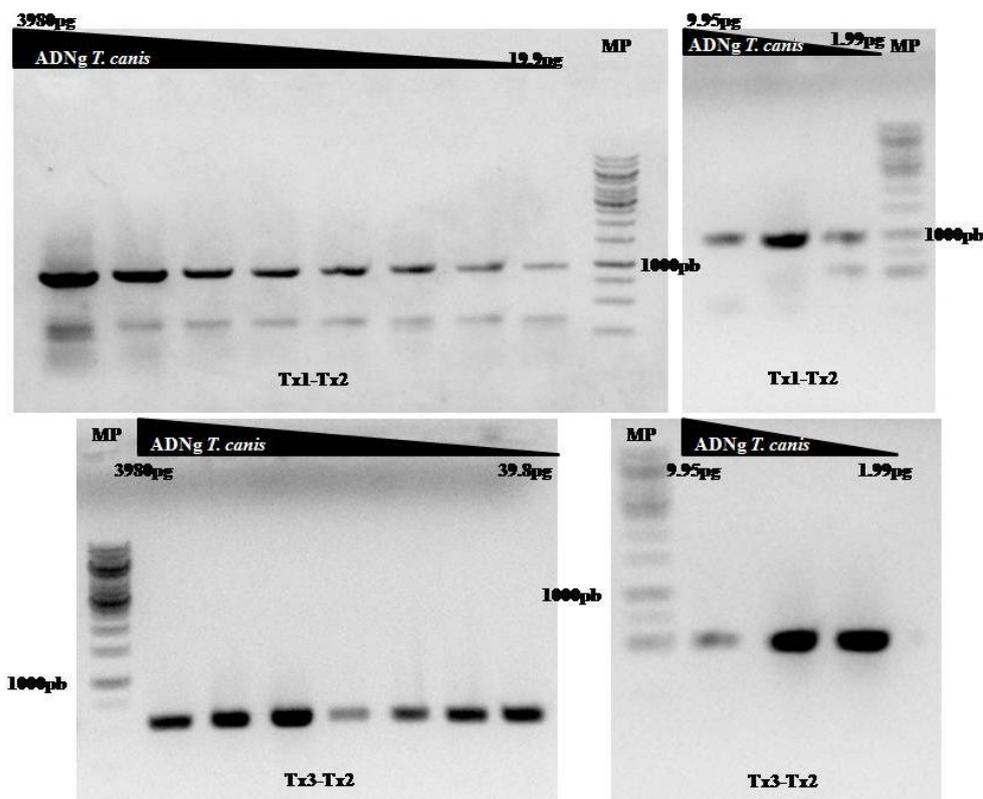


Figura 25: Fotografía del gel de agarosa al 1% para el límite de detección para los pares Tx1-Tx2 y Tx3-Tx2. Marcador de 1Kb N SM0311 (Figura 37).

En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos para el límite de detección de los pares de cebadores Tx1-Tx2 y Tx3-Tx2. Estos resultados muestran que los cebadores son capaces de amplificar por lo menos hasta 1.99pg de ADNg. Para el límite de detección se utilizó ADNg de *T. canis* diluido en H₂O mRO. También se realizó el mismo procedimiento para los pares de cebadores de YY1-NC2 y Tcan-NC2, con los que se obtuvo el mismo resultado. Es decir todos los pares de cebadores diseñados para este ensayo son capaces de amplificar hasta 1.99pg de ADNg de *T. canis* diluido en agua. Sería necesario a los efectos de la utilización de la PCR para diagnóstico, probar el límite de detección con una muestra de sangre negativa, a la cual se le agregue

determinadas cantidades de ADNg de *T. canis*. Con esta prueba podríamos verificar que es posible amplificar el ADNg de *T. canis* en sangre humana, y a su vez buscar el límite de detección para esta técnica en la matriz que se utilizara para el diagnóstico.

Logro: Se determino el límite de detección para los diferentes cebadores en 2pg de ADNg de *T. canis*.

Primeras pruebas de amplificación con los cebadores

Se decidió realizar una primera prueba de amplificación del ADN proveniente de los sueros con los cebadores diseñados para el diagnóstico.

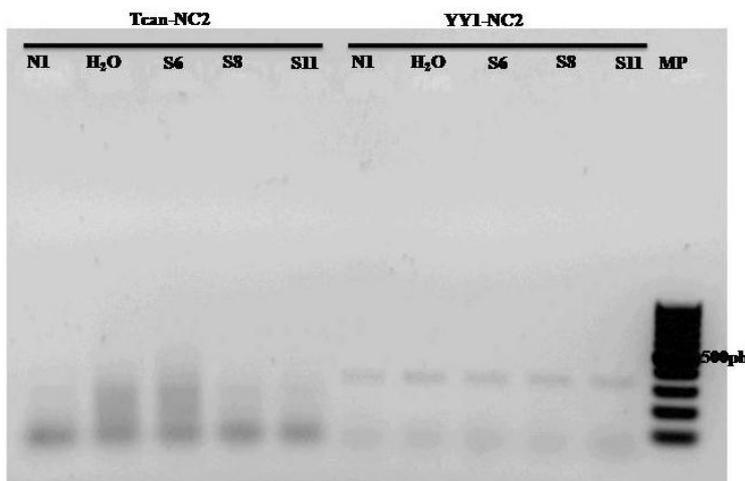


Figura 26: Fotografía de gel de agarosa al 1% mostrando los fragmentos amplificados de la PCR con los pares de cebadores Tcan-NC2 y YY1-NC2. N1 hace referencia al ADN del suero negativo, S con un número hace referencia al ADN de suero positivo, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de peso molecular 500pb NSM0242 (Figura 38)

Como se puede observar en la Figura 26 no se obtuvo amplificación de banda del tamaño esperado para Tcan-NC2 (380pb), pero si se ve banda aparentemente del tamaño esperado, unos 400pb, para el par YY1-NC2. La banda que se observa para el par YY1-NC2, no está solo en el ADN de los sueros positivos, sino que también en el suero negativo (N1) y en el control negativo de reacción. Es probable que esta banda se deba a la contaminación de alguno de los componentes del mix de PCR con ADNg de *T. canis*.

Frente al resultado negativo de las PCR se decidió probar la amplificación nuevamente de los ADN de los sueros. Con la variante de que esta vez se calentó el ADN durante 5min a 65°C o se le agrego DMSO al 5%. Esto se realizó de forma de romper cualquier interacción que el ADN este pudiendo tener consigo mismo, que este impidiendo la separación de las hebras durante la reacción de PCR. En este caso el programa de PCR que se utilizo fue el B (ver Tabla 3 de sección Materiales y Métodos).

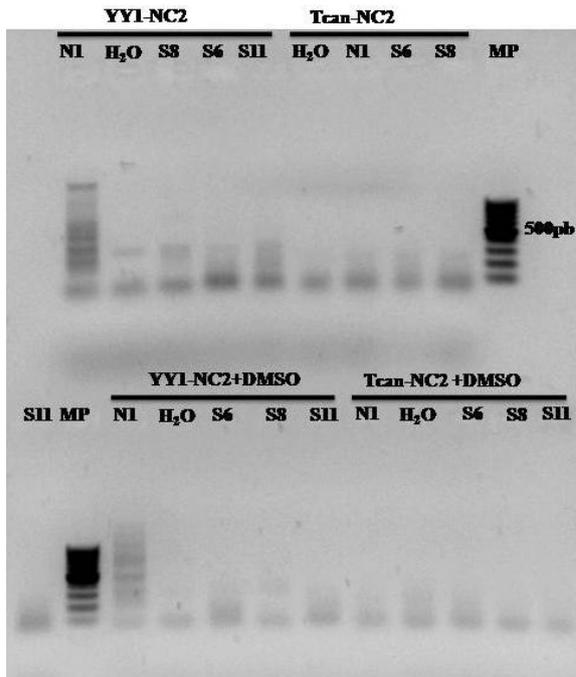


Figura 27: Fotografía de gel de agarosa al 1% mostrando los fragmentos amplificados de la PCR usando los cebadores Tcan-NC2 y YY1-NC2. N1 hace referencia al ADN del suero negativo, S con un número hace referencia al ADN de suero positivo, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de peso de 500pb N SM0242 (Figura 38)

Como se puede observar en la Figura 27, no se obtuvo banda del tamaño esperado en ninguno de los casos para el par Tcan-NC2. Lo que sí se puede observar es que, en el caso del par YY1-NC2 para el molde proveniente de N1 existe amplificación inespecífica, con varios tamaños de bandas. A su vez para este par se ve amplificación de banda aparentemente del tamaño esperado en las PCR donde el molde fue previamente calentado. Como esta amplificación se observa tanto en los ADN de sueros como en el control con agua, es probable que se deba a contaminación de alguno de los componentes del mix de PCR con ADN de *T. canis*. Para buscar de donde provenía la contaminación, se realizaron varias pruebas en las que se fueron cambiando los componentes de la mix de PCR. Dentro de las pruebas realizadas están las que se denominan como prueba 4 y 5 de la Tabla 4 de la sección Materiales y Métodos. Estas pruebas nos llevaron a la conclusión de que los que estaban contaminados eran los cebadores, por lo que los descartamos y adquirimos nuevos cebadores.

Por otra parte se comenzaron las pruebas con los cebadores para COX1. En una primera instancia para comprobar que los cebadores eran capaces de amplificar el fragmento para el que fueron diseñados y que el tamaño de la banda fuera el calculado de forma teórica se realizó una PCR con los pares Tx1-Tx2 (banda esperada de 999pb) y Tx3-Tx2 (banda esperada de 570pb), en la que se usó como molde ADNg de *T. canis*. Los resultados para esta prueba se observan en la Figura 28. Para esta prueba se utilizó el programa D, y se colocó 5µL de ADNg de *T. canis* como molde. Como se puede observar en la Figura 28 las bandas obtenidas son del tamaño esperado y se ve una importante amplificación por parte de los cebadores.

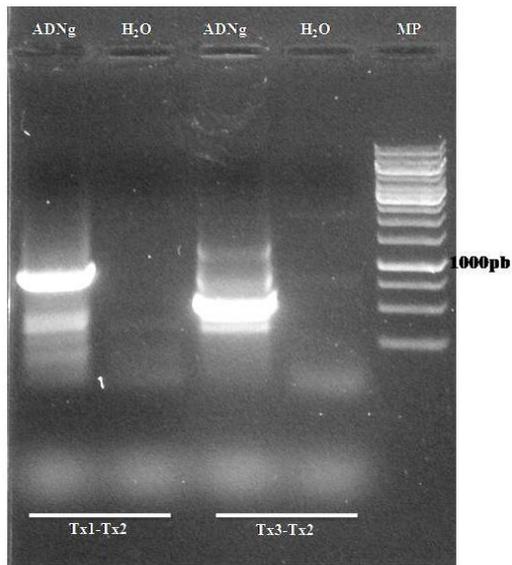


Figura 28: Fotografía de gel de agarosa al 1% mostrando los fragmentos amplificados para la PCR usando los cebadores Tx1-Tx2 y Tx3-Tx2. ADNg hace referencia al ADN de *T. canis*, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de 1Kb N SM0311 (Figura 37).

Dado el resultado positivo para esta prueba se procedió a realizar un PCR usando como molde ADN de pacientes. Para este ensayo se eligieron algunos de los sueros de los cuales se realizó la extracción de ADN. Para este ensayo se utilizó el programa D de la Tabla 3, este corresponde con la prueba 6 de la Tabla 4.

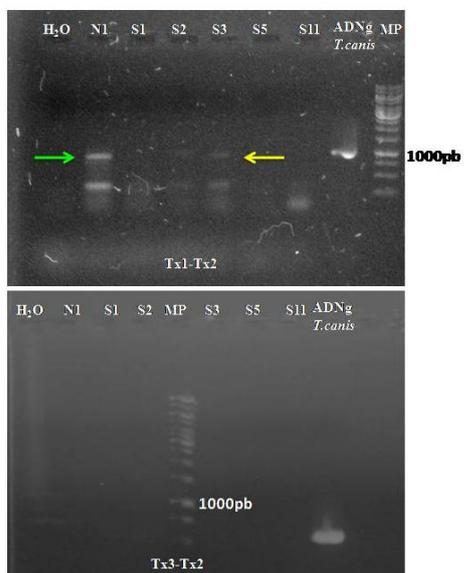


Figura 29: Fotografía de gel de agarosa al 1% mostrando los fragmentos amplificados para la PCR usando los cebadores Tx1-Tx2 y Tx3-Tx2 con los ADN de los sueros como molde. N1 hace referencia al ADN del suero negativo, S con un número hace referencia al ADN de suero positivo, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de 1Kb N SM0311 (Figura 37).

Como se puede observar en la Figura 29 sólo se obtuvo bandas del tamaño esperado para el par Tx1-Tx2. La banda de tamaño esperado se obtuvo tanto para el ADN del suero N1 como para los ADN de los S2 y S3, se señalan en la figura con las flechas verde y amarilla respectivamente. Al observarse banda de tamaño esperado en N1 se

puede suponer que esta se da por una contaminación de las muestras con el ADNg de *T. canis*, o que se está amplificando otra cosa de forma inespecífica. Estos resultados nos indujeron a realizar una nueva PCR del ADN de N1 para obtener más cantidad de ADN amplificado y para enviar a secuenciar.

De la secuenciación de los fragmentos obtenidos para el ADN de N1 se obtuvo, mediante blast en el NCBI, que las bandas correspondían a la amplificación eran de ADNg humano, más específicamente con parte del cromosoma 19 humano. Ambas bandas secuenciadas para el ADN de N1 dieron como resultado fragmento de 500 pb, aunque en el gel se observa una de 500 y otra de 1000 pb.

Por otra parte se realizó una gradiente de temperatura para los cebadores Tx1-Tx2 y Tx3-Tx2. Esto se hizo con el fin de buscar la mejor temperatura a utilizar en el desarrollo de la PCR. Como se indica en la sección Materiales y Métodos esto se realizó utilizando el programa F y corresponde a la prueba 8. De este ensayo se decidió utilizar como Tm 52°C, ya que es la temperatura a la que se obtuvo una banda más visible (datos no mostrados). Una vez definida la temperatura se realizaron unos ensayos más de amplificación por PCR con los sueros. Se probó la amplificación de los ADN de algunos sueros usando el programa D, que se corresponde a la prueba 10. De esta prueba se obtuvo la Figura 30.

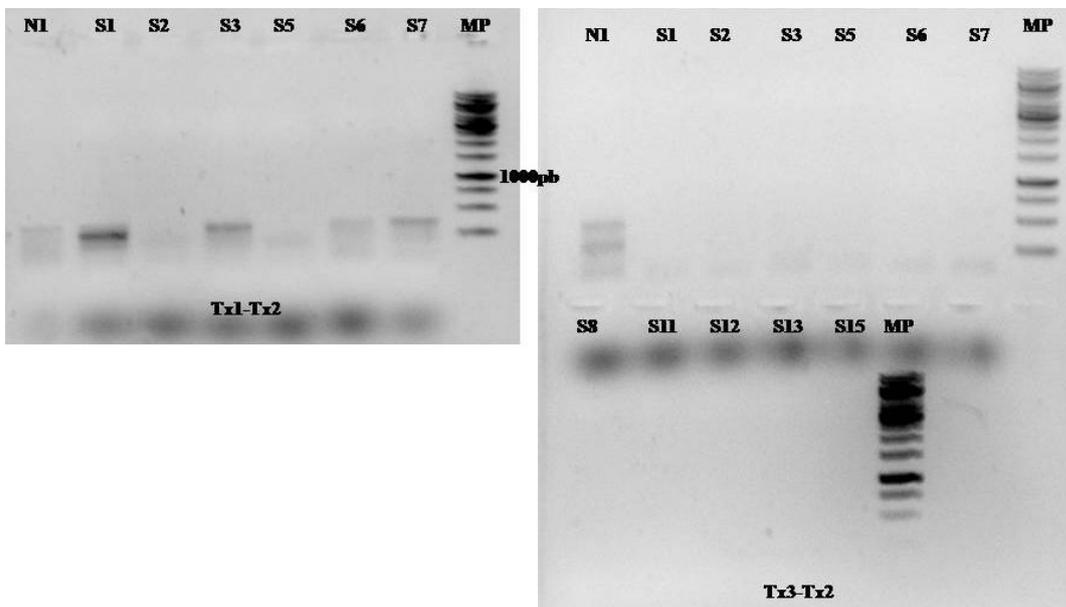


Figura 30: Fotografía del gel de agarosa al 1% con los resultados de PCR para los cebadores Tx1-Tx2 y Tx3-Tx2. N1 hace referencia al ADNg del suero negativo, S con un número hace referencia al ADN de suero positivo, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de 1Kb N SM0311 (Figura 37).

Como se puede observar en la Figura 30, no fue posible obtener banda de tamaño esperado para ninguno de los pares de cebadores.

En una prueba realizada para el par Tx1-Tx2, que corresponde a la prueba 7, con el programa E, fue posible obtener banda del tamaño esperado.

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

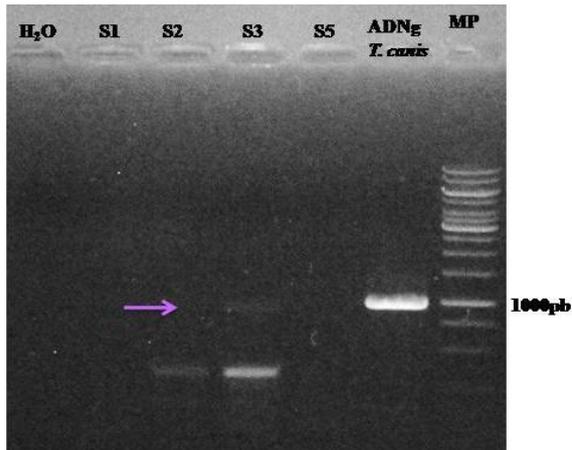


Figura 31: Fotografía del gel de agarosa al 1% con los resultados de PCR para los cebadores Tx1-Tx2. S con número hace referencia al ADN de suero positivo, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de 1Kb N SM0311 (Figura 37).

Como se puede observar en la Figura 31 se logró obtener banda de tamaño esperado (señalada con la flecha violeta) en el ADN de S3. Este resultado muestra que es posible obtener amplificación de ADN del parásito a partir de ADN obtenido de suero. Aunque sería necesario secuenciar el ADN de esta banda para estar seguros de que se trata de *T. canis*.

Se decidió mantener la cantidad de ADN que se utilizaba como molde, para observar si al aumentar la cantidad de ADN se obtiene amplificación del ADN de *T. canis* y si esto sucede poder ver cuál era la mayor cantidad que se podía colocar sin inhibir la reacción de PCR. Este ensayo se desarrolló utilizando el programa E y corresponde a la prueba 11. Las cantidades de ADN que se utilizaron fueron de 30, 40, 46, 80,90 y 100 ng.

Hacia la elaboración de un test de diagnóstico para la detección de Toxocariasis en humanos

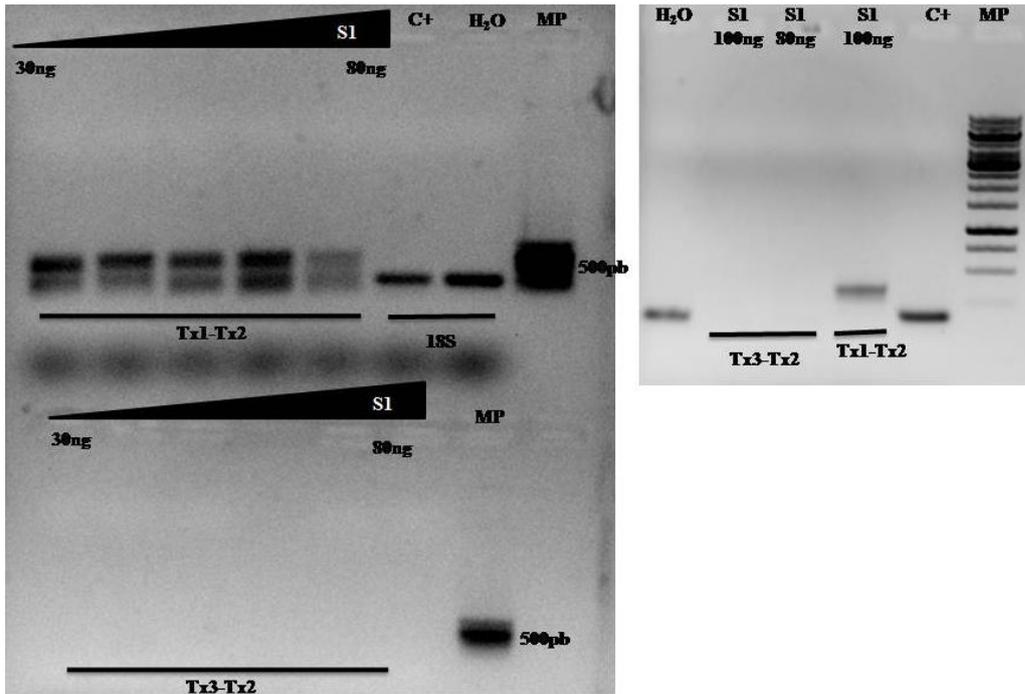


Figura 32: Fotografía del gel de agarosa al 1% para el resultado de PCR con diferentes cantidades de ADN del suero S1. C+ hace referencia al control con ADN de *T. canis*, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de peso molecular de 1Kb N SM0311 (Figura 37) y de 500pb N SM0242 (Figura 38)

Como se puede ver en la Figura 32 no se obtuvo amplificación de bandas de tamaño esperado incluso con 100 ng de ADN para el S1. A pesar de esto sería necesario realizar esta prueba con controles negativos a los que se les haya agregado ADN de *T. canis*, de forma de saber si la reacción de PCR es inhibida por la cantidad de ADN o no.

Se realizó una prueba con todos los pares de cebadores y algunos de los sueros. En este caso se mantuvo la cantidad de ADN en 40 ng para los sueros (prueba 12).

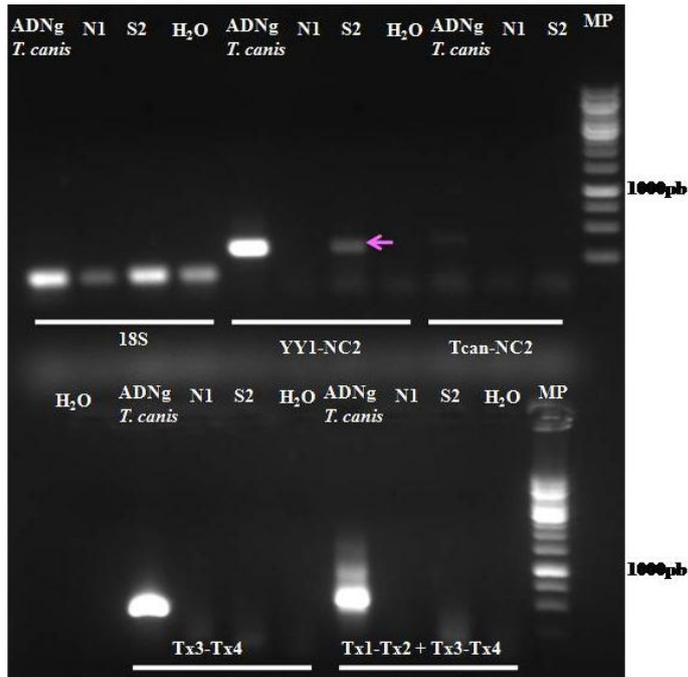


Figura 33: Fotografía del gel de agarosa al 1% con los resultados de PCR para los diferentes juegos de cebadores que se indican en la figura. N1 hace referencia al ADN del suero negativo, S2 hace referencia al ADN de un suero positivo, H₂O corresponde al control negativo con agua. Marcador de peso molecular de 1Kb N SM0311 (Figura 37).

Como se puede observar en la Figura 33 se obtuvo banda del tamaño esperado con el par de cebadores YY1-NC2 (señalado con la flecha lila). También se observa que el juego de cebadores para el 18S humano, se amplificó banda del tamaño esperado incluso en el control con agua, es probable que esta se deba a contaminación de la muestra con ADN humano. En cambio estas condiciones parecen no ser favorable para el par Tcan-NC2, en el que se observa en el control con ADNg de *T. canis* una banda muy tenue.

De todos estos análisis realizados podemos decir que sería posible amplificar ADNg de *T. canis* a partir de suero de pacientes infectados, si bien aun hay que confirmar que las bandas obtenidas para los cebadores YY1-NC2 y Tx1-Tx2 correspondan a ADNg de *T. canis* mediante secuenciado de las mismas. Al observar que estas bandas solo aparecen en un par de sueros y no en todos ellos se descarta su posible origen de ADN humano. Sin embargo, no es posible descartar que se esté amplificando otro ADN foráneo. Serían necesarias más pruebas con ADN de otros pacientes para poder llegar a una mejor aproximación.

En líneas generales es importante destacar que este sería el primer reporte de amplificación de ADNg de *T. canis* en suero humano abriendo la posibilidad al desarrollo de un test de diagnóstico para la toxocariasis del tipo molecular. Si bien el desarrollo de herramientas moleculares implica la necesidad de equipo calificado y mano de obra especializada, desde el punto de vista epidemiológico estas técnicas son de mucho valor. También es un test definitivo de toxocariasis dado que mediante secuenciación no quedarían dudas de la entidad etiológica de la infección. Por otra parte

no presentaría el problema de los test inmunológicos en la dificultad de discriminar infecciones actuales de pasadas, dado que no sería de esperar encontrar ADN de un parásito tiempo después de que este haya sido eliminado del individuo. Por su parte el desarrollo de una inmuno cromatografía como test de diagnóstico tiene la ventaja de la facilidad de aplicación incluso en áreas aisladas donde no es posible transportar grandes equipos y donde el poli parasitismo es endémico como es el caso de los países tropicales de bajos recursos. Siendo en última instancia el desarrollo de ambos tipos de test muy importante y complementarios para el estudio y mejor conocimiento de la epidemiología de la toxocariasis y facilitar el reconocimiento y contribución de los diferentes actores etiológicos de esta enfermedad.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se logró producir en forma recombinante en *E. coli*, las proteínas TES-26 y TES-120 de *T. canis*. Se logró desarrollar un protocolo de purificación eficiente para ambas proteínas recombinantes. Las proteínas puras se utilizaron para la realización de una primera prueba de su capacidad para ser reconocidas por sueros humanos.

En líneas generales se puede concluir que las proteínas recombinantes utilizadas (TES-120 y TES-26) pueden ser reconocidas por sueros de pacientes infectado por *Toxocara*. Esto se refleja en que son reconocidas incluso por sueros que se definen como negativos para el kit comercial de Abcam. Si bien es necesario realizar pruebas con un mayor número de sueros, tanto de pacientes infectados con *T. canis* como sanos. Es posible considerar a las proteínas como prometedores antígenos en el desarrollo de un kit de diagnóstico para la toxocariasis.

En esta tesis también logramos amplificar ADN presumiblemente de *T. canis* de suero humano, sería el primer reporte de amplificación de ADN de *T. canis* en suero. Abriendo de esta forma la posibilidad del desarrollo de una técnica molecular para el diagnóstico de esta enfermedad y un mayor conocimiento de la contribución de *T. canis* o *T. cati* en la toxocariasis.

Una de las primeras perspectivas planteadas es la obtención de mayor número de muestras, de sueros frescos, como de sangre de pacientes infectados. Sería interesante poder contar con sangre para así verificar si la sensibilidad de la PCR en sangre es mayor que en suero, dado que en teoría contaríamos con más material genómico del parásito.

Por otra parte poder acceder a la historia clínica de los pacientes sería de mucha importancia dado que nos permitirá comparar las dificultades en el diagnóstico con los diferentes tipos de presentación de la enfermedad. La posibilidad de poder analizar las muestras de los mismos pacientes post-tratamiento para evaluar la capacidad de los test desarrollados para diferenciar una toxocariasis activa de una pasada sería de gran importancia, para el desarrollo de un kit tanto epidemiológico, como para un kit de seguimiento del paciente durante el tratamiento.

Referencias

- Altcheh, J., Nallar, M., Conca, M., Biancardi, M., & Freilij, H. (2003). Toxocariasis: aspectos clínicos y de laboratorio en 54 pacientes. *Anales de Pediatría*, 58(5), 425-431. <http://doi.org/10.1157/13046522>
- Archelli, S., & Kozubsky, L. (2008). Toxocara y Toxocariosis. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(3), 379-384.
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., ... Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5, 5488. <http://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Chang, T.-C., Zeitels, L. R., Hwang, H.-W., Chivukula, R. R., Wentzel, E. A., Dews, M., ... Mendell, J. T. (2009). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3384-9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0808300106>
- de Savigny, D. H. (1975). In vitro Maintenance of Toxocara canis Larvae and a Simple Method for the Production of Toxocara ES Antigen for Use in Serodiagnostic Tests for Visceral Larva Migrans. *The Journal of Parasitology*, 61(4), 781. <http://doi.org/10.2307/3279492>
- de Savigny, D. H., Voller, A., & Woodruff, A. W. (1979). Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology*, 32(3), 284-288. <http://doi.org/10.1136/jcp.32.3.284>
- Despommier, D. (2003). Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 265-272. <http://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>
- Długosz, E., Wasyl, K., Klockiewicz, M., & Wiśniewski, M. (2015). Toxocara canis mucins among other excretory-secretory antigens induce in vitro secretion of cytokines by mouse splenocytes. *Parasitology Research*, 3365-3371. <http://doi.org/10.1007/s00436-015-4561-5>
- Durant, J.-F., Irengé, L. M., Fogt-Wyrwas, R., Dumont, C., Doucet, J.-P., Mignon, B., ... Gala, J.-L. (2012). Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of Toxocara canis and Toxocara cati (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasites & vectors*, 5(1), 288. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-5-288>
- Filliaux, J., & Magnaval, J. (2013). Veterinary Parasitology Laboratory diagnosis of human toxocariasis, 193(4), 327-336. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028>
- Fong, M. Y., Lau, Y. L., Init, I., Jamaiah, I., Anuar, A. K., & Rahmah, N. (2003). Recombinant expression of Toxocara canis excretory-secretory antigen tes-120 in Escherichia coli. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 34(4), 723-726.
- Glickman, L. T., & Schantz, P. M. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic reviews*, 3, 230-50. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7030762>
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation : The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 167(1), 1-11. <http://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- Hotez, P. J., & Wilkins, P. P. (2009). Toxocariasis: America's most common neglected

- infection of poverty and a helminthiasis of global importance? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(3), 1-4. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000400>
- Jacobs, D. E., Zhu, X., Gasser, R. B., & Chilton, N. B. (1997). PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica*, 68(2), 191-200. [http://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00093-4](http://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00093-4)
- Jeon, H. K., Chai, J. Y., Kong, Y., Waikagul, J., Insisiengmay, B., Rim, H. J., & Eom, K. S. (2009). Differential diagnosis of *Taenia asiatica* using multiplex PCR. *Experimental Parasitology*, 121(2), 151-156. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.10.014>
- Jex, A. R., Waeschenbach, A., Littlewood, D. T. J., Hu, M., & Gasser, R. B. (2008). The mitochondrial genome of *Toxocara canis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000273>
- Kuenzli, E., Neumayr, A., Chaney, M., & Blum, J. (2016). Toxocariasis-associated cardiac diseases-A systematic review of the literature. *Acta Tropica*, 154, 107-120. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.003>
- Li, M. W., Lin, R. Q., Chen, H. H., Sani, R. A., Song, H. Q., & Zhu, X. Q. (2007). PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Molecular and Cellular Probes*, 21(5-6), 349-354. <http://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.04.004>
- Lim, P. K. C., Yamasaki, H., Mak, J. W., Wong, S. F., Chong, C. W., Yap, I. K. S., ... Kumarasamy, V. (2015). Field evaluation of a rapid diagnostic test to detect antibodies in human toxocariasis. *Acta Tropica*, 148, 32-37. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.011>
- Loukas, A., Hintz, M., Linder, D., Mullin, N. P., Parkinson, J., Tetteh, K. K., & Maizels, R. M. (2000). A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *The Journal of biological chemistry*, 275(50), 39600-7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M005632200>
- Macpherson, C. N. L. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis : A zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 999-1008. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004>
- Magnaaval, J. F., Glickman, L. T., Dorchies, P., & Morassin, B. (2001). Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology*, 39(1), 1-11. <http://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>
- Maizels, R. M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*, 193(4), 365-374. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.032>
- Mohamad, S., Azmi, N. C., & Noordin, R. (2009). Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1712-1717. <http://doi.org/10.1128/JCM.00001-09>
- Moreira, G. M. S. G., Telmo, P. de L., Mendonça, M., Moreira, Â. N., McBride, A. J. A., Scaini, C. J., & Conceição, F. R. (2014). Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in Parasitology*, 30(9), 456-464. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>
- Nicoletti, A. (2013). Toxocariasis. *Handbook of Clinical Neurology*, 114, 217-228. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00016-9>
- Nieves, A., Ortega, B., Martínez, M., Castejón, O., Lares, M., & Ferrer, E. (2012). Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico inmunológico de toxocariasis humana. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 52(1), 21-32.

- Noordin, R., Smith, H. V., Mohamad, S., Maizels, R. M., & Fong, M. Y. (2005). Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Tropica*, 93(1), 57-62. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.009>
- Olave AM, Mesa JA, Botero JH, Patiño EB, García GM, A. J. (2016). Producción y evaluación del antígeno recombinante Tes-30 de *Toxocara canis* para el inmunodiagnóstico de toxocariasis. *Biomédica*, 33(4), 24. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.836>
- Olave, A. M., Mesa, J. A., Botero, J. H., Patiño, E. B., García, G. M., & Alzate, J. F. (2016). Producción y evaluación del antígeno recombinante TES-30 de *Toxocara canis* para el inmunodiagnóstico de toxocariasis. *Biomedica*, 36(1), 39-51. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i1.2617>
- Overgaauw, P. A. M., & Nederland, V. (1997). Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Human Toxocarosis. *Critical Reviews in Microbiology*, 23(3), 215-231. <http://doi.org/10.3109/10408419709115137>
- Paludo, M. L., Falavigna, D. L. M., Elefant, G. R., Gomes, M. L., Baggio, M. L. M., Amadei, L. B., & Falavigna-Guilherme, A. L. (2007). Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, South Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(6), 343-348. <http://doi.org/10.1590/S0036-46652007000600002>
- Pereira, E. L. G. M., Santarém, V. A., Batista, A. D. S., Meriguetti, Y. F., & Bin, L. L. C. (2016). Limit of detection of *Toxocara canis* larvae in experimentally contaminated bovine milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1), 213. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p213>
- Rai, S. K., Uga, S., Wu, Z., Takahashi, Y., & Matsumura, T. (1997). Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of toxocariasis: an experimental study. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 28(3), 541-4. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9561605>
- Rodríguez, M. D. L. F., & Ripoll, M. (2006). *Toxocara canis* y Síndrome Larva Migrans Visceralis (*Toxocara canis* and Syndrome Larva Migrans Visceralis). *Redvet*, VII, 1-42. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ2012034076>
- Roldan, W. H., Espinoza, Y. A., Huapaya, P. E., & Jimenez, S. (2010). Diagnostico de la toxocarosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 27(4), 613-620. <http://doi.org/10.1590/S1726-46342010000400019>
- Roldán, W., & Rubinsky-Elefant, G. (2012). Immunodiagnosis of Human Toxocariasis. En Dr. Moslih Al-Moslih (Ed.), *Serological Diagnosis of certain Human, Animal and Plant Diseases* (pp. 98-109). In Tech. Recuperado a partir de http://cdn.intechopen.com/pdfs/33157/InTech-Immunodiagnosis_of_human_toxocariasis.pdf
- Schabussova, I., Amer, H., van Die, I., Kosma, P., & Maizels, R. M. (2007). O-Methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. *International Journal for Parasitology*, 37(1), 97-109. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.006>
- Siles-Lucas, M., Morchon, R., Simon, F., & Manzano-Roman, R. (2015). Exosome-transported microRNAs of helminth origin: new tools for allergic and autoimmune diseases therapy? *Parasite immunology*, 37(4), 208-14. <http://doi.org/10.1111/pim.12182>
- Silva de Moraes, R. C., Nascimento da Costa Oliveira, C., da Cunha Gonçalves de Albuquerque, S., Mendonça Trajano Silva, L. A., Pessoa-E-Silva, R., Alves da Cruz, H. L., ... de Paiva Cavalcanti, M. (2016). Real-time PCR for *Leishmania*

- species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. *Experimental parasitology*, 165, 43-50.
<http://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.005>
- Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J. F., Schantz, P., & Maizels, R. (2009). How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology*, 25(4), 182-188. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006>
- Thiong'o, S. K., Ichagichu, J. M., Ngotho, M., Aboge, G. O., Kagira, J. M., Karanja, S. M., & Maina, N. N. (2016). Use of the nested polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in slaughterhouse workers in Thika District, Kenya. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*, 106(4), 417-9. <http://doi.org/10.7196/SAMJ.2016.v106i4.8777>
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., & Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 118(1), 197-203.
[http://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90179-2](http://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90179-2)
- Zahabiun, F., Sadjjadi, S. M., Yunus, M. H., Rahumatullah, A., Moghaddam, M. H. F., Saidin, S., & Noordin, R. (2015). Production of *Toxocara cati* tes-120 recombinant antigen and comparison with its *T. Canis* homolog for serodiagnosis of toxocariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(2), 319-325.
<http://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0190>
- Zoonosis, comision nacional de. (s. f.). Guia practica de hidatidosis y zoonosis desatendidas.

Anexo I

Marcadores de peso molecular utilizados para los geles de proteínas.

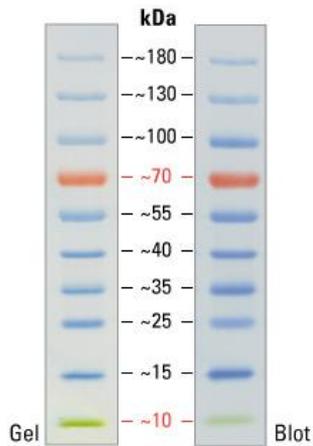


Figura 34: Marcado de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein ladder N 26616 Thermo Scientific

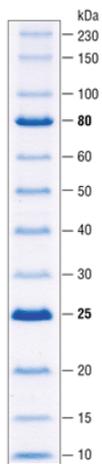


Figura 35: Marcado de peso molecular Unstained Protein Marker N P7710S BioLabs

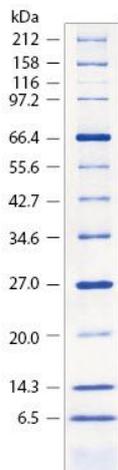


Figura 36: Marcado de peso molecular Unstained Protein Marker N P7702S BioLabs.

Marcadores de peso utilizados para los gels de agarosa.

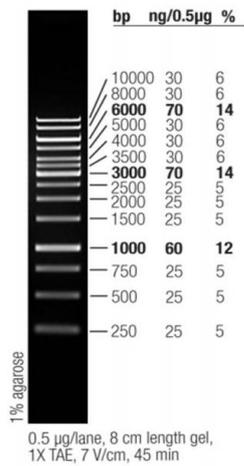


Figura 37: Gen Ruler 1kb DNA Ladder N SM0311 Thermo Scientific.

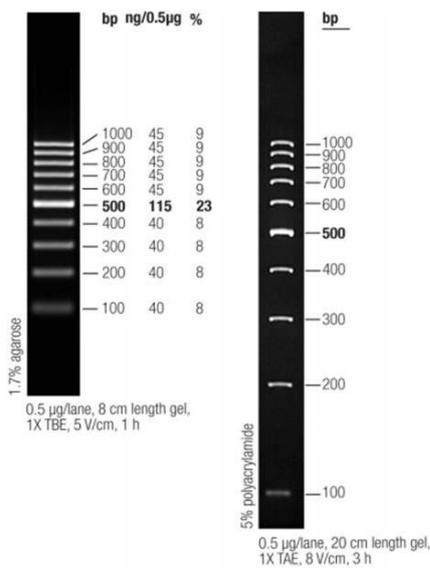


Figura 38: Gen Ruler 100bp DNA Ladder N SM0242 Thermo Scientific.