



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

*"Taenia solium: Evaluación de mimótopos de la
Tiosa fosfato isomerasa (TPI) e identificación de
mimótopos de dos isoformas de la Glutación
S-transferasa (GST_{25.5} y GST_{26.5})"*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

V I C T O R S A N A B R I A A Y A L A



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m341119



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: María Dolores Lastra Azpilicueta
Vocal: Abel Gutiérrez Ramos
Secretario: Abraham Landa Piedra
1er suplente: Sonia Mayra Pérez Tapia
2do suplente: José Cordero Hernández

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra. El trabajo de investigación fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN210603, bajo el nombre de “Enzimas del metabolismo detoxificante blancos para el desarrollo de nuevos inhibidores de *Taenia solium*”; y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 43806-M, bajo el nombre de “Desarrollo de inhibidores específicos contra *Taenia solium*.”

Asesor:



Dr. Abraham Landa Piedra

Sustentante:



Víctor Sanabria Ayala

“...

¿No soy acaso un acorde falso
de una bella sinfonía,
mientras me sacude y muerde
esta voraz ironía?

Ella es sangre de mi sangre
y de mi mismo el reflejo.
La furia en mí se contempla,
yo soy su siniestro espejo.

Soy la herida y el cuchillo,
soy el esclavo y el yugo,
el penado y la prisión,
la víctima y el verdugo.

De mi propio corazón
condenado a ser vampiro,
y a reír sin más razón.
Risa que, al fin, es suspiro.”

El heautontimorumenos, de C. Baudelaire.

“...Fui una parte de la ira del cordero.
También soy una parte del lobo.

Soy el lobo. Soy el cordero.
También soy lo que Satán es para Dios.

Llámame un judas. Llámame demente.
Pero, soy lo que soy, sólo soy un hombre...”

Amarok-zorn des lammes III, de Kamwulf.

*A Teresa y Darío Víctor por todo su amor y comprensión.
Con todo mi infinito agradecimiento por asumir el compromiso de
hacer de mi lucha, la suya.*

Más dedicatorias...

A Jacqueline y Alfredo, por los viejos tiempos, por las alegrías y las tristezas, por todos esos momentos que nos vinculan y guardaremos para siempre con nostalgia. Aún cuando la vida nos lleve por caminos distintos, seguiremos siendo compañeros de esta gran aventura.

A Diego, porque su reciente llegada nos ha llenado de una alegría indescriptible.

A Alejandra, por todo el cariño que de ella he recibido en los últimos cinco años.

A Josué Paris, por su incansable compañía y por todas las atenciones que ha tenido para conmigo.

A esa persona que considero especial, por darme la oportunidad de conocerme, y en el trasfondo, mucho debo por ayudar a reestructurar mi mundo onírico. Con el más icástico agradecimiento, a ti Maria Paulina.

Con todo mi cariño, Víctor

A todas aquellas personas que no tienen miedo de expresar sus más profundos sentimientos de violencia, odio, ira, o repudio, cuando la ocasión así lo requiere; y con especial admiración y respeto, a todas aquellas personas que no tienen miedo de expresar sus más nobles sentimientos.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los profesores que, a lo largo de casi 10 años, han sido partícipes en mi formación.

Al Dr. Abraham Landa Piedra, por brindarme la oportunidad de tener mi primer acercamiento formal con la ciencia, por pulir y ampliar los conocimientos adquiridos en la licenciatura, por la confianza otorgada al permirme formar parte de su grupo, y especialmente por su amistad sincera.

A la M. en C. Ma. Dolores Lastra A. y el Q.F.B. Abel Gutiérrez R., mis sinodales, por la revisión final y correcciones hechas a este trabajo.

A la Dra. Lucia Jiménez por su asesoría y apoyo logístico en la realización de los experimentos.

A la Bióloga Alicia Ochoa por todo el apoyo técnico y sobre todo por su excepcional compañerismo.

A mis compañeros de Laboratorio, Alex, Gabriela, Gladiz, Isela, José, Martha y Richie.

A la familia Campos Zappett, porque siempre me han recibido cordialmente en el seno de su hogar.

A mis entrañables amigos de generación, Héctor (Gatito), Felipe, Sofía, Mario (Borrego), Alicia, Enedina, Rodrigo D. (Rock), Iris A., Mario (Amiguito), Iaraset, Anayetzin, Hugo Antonio (éste es 2000).

A la siguiente caterva de dipsómanos: Olguita, Omar, Odin (Ooooding), Jocz, Gerardo, Aurelio (Inge), Ranferi, Ivette, Paola, Toño, Neto, Memo, Ricardo, Luis, Abril, Marco (Alfalfa Viruchis), Claudia (Fly), Lalo, Iván (Bizbi), Gabriel (Gavroche) y Nancy Claudia, pues en verdad son ellos los que han tenido que soportar todo el peso de mi personalidad extremadamente corrosiva y, en cierto grado, tóxica. Sin embargo, espero que mi dedicación y constancia les sirvan de ejemplo. Agradezco en demasía su invaluable amistad! Pa' su v#rSa ***... /////!!!

A todos ustedes, 999 gracias!!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.2 <i>Taenia solium</i>	7
1.2.1 Generalidades del parásito	7
1.2.1.1 Morfología.....	7
1.2.1.2 Sistema de transporte y excreción/secreción.....	10
1.2.1.3 Sistema nervioso.....	11
1.2.1.4 Sistema muscular	11
1.2.1.5 Sistema reproductor	12
1.2.2 Ciclo de vida	12
1.2.3 Manifestaciones clínicas	14
1.2.3.1 Teniosis.....	14
1.2.3.2 Cisticercosis	14
1.2.4 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	15
1.2.5 Diagnóstico.....	16
1.2.5.1 Teniosis.....	16
1.2.5.2 Cisticercosis	17
1.2.6 Tratamiento	18
1.2.6.1 Teniosis.....	18
1.2.6.2 Cisticercosis	18
1.2.7 Medidas de control.....	19
1.2.8 Vacunas	19
1.3 Vía glucolítica.....	20
1.3.1 Triosa fosfato isomerasa (TPI)	22
1.3.1.1 Triosafosfato isomerasa en parásitos	23
1.4 Metabolismo destoxicante	24
1.4.1 Glutación S-transferasas (GST's)	25
1.4.1.1 Glutación S-transferasa en parásitos.....	26
1.5 Despliegue en fagos (PhD)	27
1.5.1 Fagos filamentosos	27
1.5.1.1 Proteína III	28
1.5.1.2 Proteína VIII	29
2. HIPÓTESIS	30
3. OBJETIVO.....	30
3.1 Objetivos particulares.....	30

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Materiales	31
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Reamplificación y titulación de fagos	31
4.2.2 Inmunización de animales	32
4.2.3 Purificación de IgG's de conejo.....	33
4.2.4 Inmunoelectrotransferencia (IET).....	33
4.2.5 Obtención de anticuerpos específicos para la TTPI	34
4.2.6 Ensayos de actividad de la TTPI	34
4.2.7 Ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI.....	34
4.2.8 Selección de mimótopos.....	35
4.2.9 Selección de clonas de fagos	36
4.2.10 Preparación del ADN de fagos para secuencia	36
4.2.11 Determinación de la secuencia del ADN de fagos.....	37
4.2.12 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Inhibición de la Triosafofato isomerasa por anticuerpos	39
5.1.1 Inmunoelectrotransferencia de la TTPI con sueros de ratón	40
5.1.2 Ensayos de actividad de la TTPI con sueros de ratón antimimótopos	40
5.1.3 Inmunoelectrotransferencia de la TTPI con sueros de conejo	42
5.1.4 Ensayos de actividad de la TTPI con sueros e IgG's de conejo.....	42
5.2 Identificación y caracterización parcial de mimótopos de las isoformas de GST _{25.3} y GST _{26.3}	43
6. DISCUSIÓN.....	46
7. CONCLUSIONES.....	50
8. ANEXOS.....	51
REFERENCIAS.....	57

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNcs	Ácido desoxirribonucleico cadena sencilla
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	grados Celsius
ddATP	2',3'-dideoxiadenosina trifosfato
ddCTP	2',3'-dideoxicitidina trifosfato
ddGTP	2',3'-dideoxiguanosina trifosfato
ddTTP	2',3'-dideoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etiledinitrilo tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa
GST ^{25.5}	Glutación-S transferasa de 25.5 kDa
GST ^{26.3}	Glutación-S transferasa de 25.5 kDa
kDa	kiloDaltones
IPTG	isopropiltio-β-thio galactosido
LB	medio Luria-Bertani
μL	microlitro
mL	mililitro
M	molar
mM	milimolar
μm	micrómetros
NADH	Nicotinamida Adenina dinucleótido (forma reducida)
ng	nanogramos
mm	manómetros
PBS	amortiguador salino de fosfatos pH 7.4
PCR	reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	polietilenglicol 8000
pfu	unidad formadora de placa
pH	potencial de Hidrógeno
P _i	ortofosfato inorgánico
pmol	picomoles
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	amortiguador Tris/Ácido Bórico/EDTA
TBS	amortiguador Tris-HCl/NaCl
TE	amortiguador Tris-HCl/EDTA pH 7.4
TED	amortiguador Trietanolamina/EDTA/ditiotreitol
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TGST	Glutación S-transferasa de <i>Taenia solium</i>
TPI	Triosafofosfato isomerasa
TTPI	Triosafofosfato isomerasa de <i>Taenia solium</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido

Índice de figuras

página

Figura 1A. Adulto de <i>Taenia solium</i>	8
Figura 1B Morfología del escólex de <i>Taenia solium</i>	8
Figura 2A Cisticerco celoso.....	9
Figura 2B Cisticerco racemoso.....	9
Figura 3A Micrografía de un huevo de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 3B Eclosión de huevo de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 4 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	13
Figura 5 Vía glucolítica.....	21
Figura 6 Reacción de interconversión de la TPI.....	21
Figura 7 Monómero de la TPI.....	22
Figura 8 Reacción catalítica de la GST.....	25
Figura 9 Dímero de GST de mamífero.....	26
Figura 10 Despliegue de péptidos en fagos.....	28
Figura 11 Gráfico de ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI con IgG's.....	39
Figura 12 IET de la TTPI con sueros de ratón antimimótopos.....	40
Figura 13 Ensayo de actividad de la TTPI con sueros de ratón antimimótopos.....	41
Figura 14 IET de la TTPI con sueros de conejo antimimótopos.....	42
Figura 15 Ensayos de actividad de la TTPI con sueros de conejo antimimótopos.....	43
Figura 16 Secuencias peptídicas de mimótopos de la GST.....	44
Figura 17 Gráfico de ELISA de sueros de ratón antimimótopos	45

RESUMEN

La Triosa fosfato isomerasa (TPI) es una enzima de la vía glucolítica, la cual cataliza la interconversión de la dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato, el primero de ellos altamente tóxico, de ahí que la carencia de la enzima sea incompatible con la vida. Es por ello, que los esfuerzos de varios estudios van encaminados en la búsqueda de inhibidores específicos de la TPI de *Taenia solium*. Este parásito es el agente etiológico de la teniosis y de la cisticercosis, en su fase adulta y larvaria respectivamente, siendo los países subdesarrollados los más afectados, debido a los factores socioeconómicos que imperan en estas zonas. La cisticercosis causa serios problemas de salud, lo cual repercute en el ámbito económico.

En la actualidad, el empleo de anticuerpos en diversas áreas de investigación biológica ha adquirido gran importancia, dado que son macromoléculas muy específicas, hacen posible la realización de una gran gama de estudios finos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la actividad de la enzima. Los anticuerpos fueron hechos en contra de péptidos desplegados en la cápside de fagos de tipo M13, la característica de estos péptidos es que no tienen identidad con la estructura primaria de la enzima, pero presentan mimetismo con ciertas regiones de ésta, es por ello que son referidos como mimótopos. En este trabajo encontramos que los anticuerpos hechos en ratón dirigidos contra la enzima, aun cuando la reconocen, no son capaces de abatir su actividad, por el contrario, los realizados en conejo la disminuyen considerablemente. Por otro lado, se encontraron tres mimótopos (Ts6, Ts15 y Ts16) con los cuales se generaron anticuerpos que son capaces de aumentar la actividad de la enzima. Asimismo, se identificaron mimótopos conformacionales para dos isoformas de la Glutación S-transferasa (GST_{23.3} y GST_{26.3}), enzima esencial en el metabolismo destoxificante de los cestodos.

1. Introducción

La teniosis y la cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son problemas de salud pública que prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza. La cisticercosis se encuentra en África, Asia y Latinoamérica; en particular, México y Brasil son los países que informan las frecuencias más altas¹, aunque en la actualidad se informa el surgimiento de casos en naciones del primer mundo tales como EUA,^{2, 3} debido al creciente número de migración poblacional y en menor medida los viajes turísticos.⁴

La cisticercosis se debe al parásito *Taenia solium*, cuya forma larvaria (metacestodo) llamada cisticerco, se aloja en diversos tejidos y ocasiona graves daños, principalmente en el sistema nervioso central del ser humano; por otra parte, la forma adulta se aloja en el intestino delgado del humano (hospedero único) y casi siempre es asintomática, pero existe especial atención para el portador del gusano, ya que es parte medular del ciclo del parásito, pues es éste quien libera en las heces los huevos del parásito, los cuales, después de haberse ingerido, se desarrollan y ocasionan cisticercosis, tanto humana como porcina.⁵

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se calcula que hay en el mundo unos dos y medio millones de personas con teniosis (portadores del gusano adulto). La contribución que tiene la cisticercosis humana en las tasas de morbilidad y mortalidad es resultado del desarrollo del cisticerco en el sistema nervioso central (SNC), lo que frecuentemente causa discapacidad física y en ocasiones la muerte. El número de gentes infectadas con cisticercosis de *Taenia solium* es posiblemente mucho mas alto de lo reportado en estudios epidemiológicos y se calcula que unas 50 mil personas fallecen anualmente por cisticercosis.¹

1.2 *Taenia solium*

1.2.1 Generalidades del parásito

La *Taenia solium* (Linneo 1758) pertenece al phylum Platyhelminthes, a la clase Cestoidea, a la subclase Eucestoda, al orden Cyclophyllidea y a la familia Taeniidae. Lo más sobresaliente de los cestodos es la ausencia de boca y aparato digestivo, lo cual los diferencia de los tremátodos y nemátodos. También se diferencian por la estructura de su cuerpo, el cual es segmentado. Los ciclofílideos, están dentro de un grupo de cestodos que se caracterizan por tener glándulas o células vitelógenas compactas, y un escólex con cuatro ventosas.⁶

1.2.1.1 Morfología

1.2.1.1.1 Gusano adulto

La tenia adulta (*Figura 1A*) mide entre 1.5 m y 5 m de longitud y su cuerpo está formado por el escólex, el cuello y el estróbilo. El escólex (*Figura 1B*) mide aproximadamente 1 mm de diámetro, con cuatro ventosas y un prominente rostelo armado por una doble corona de ganchos (entre 25 y 30). El cuello es corto y delgado, está formado por células germinales que dan origen al estróbilo. El estróbilo es una cadena de segmentos o proglótidos. Los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, ya que aún no tienen desarrollados los órganos sexuales. Los últimos segmentos son grávidos y esencialmente son sacos llenos de huevos. Cada proglótido grávido mide 0.5 a 2 cm y contiene aproximadamente 30,000 a 50,000 huevos. Los segmentos grávidos son liberados del estróbilo y transportados en la materia fecal, se considera que se liberan de 2 a 5 segmentos con una frecuencia de 2 a 3 veces por semana.^{3, 7, 8} Cuando los proglótidos son expulsados, estos se deshacen vertiendo los huevos al ambiente.⁹

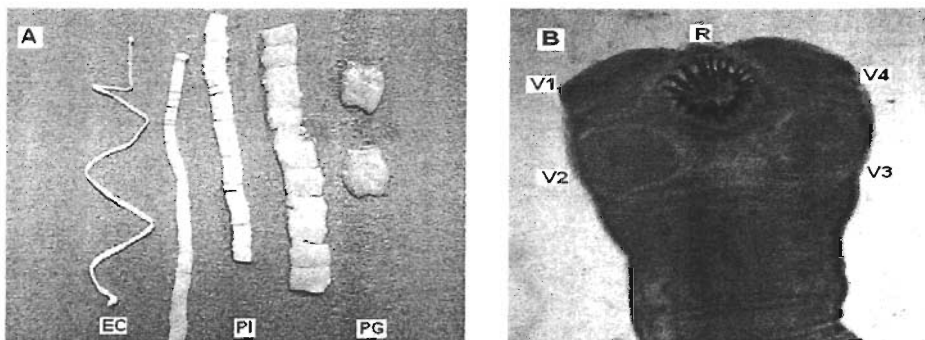
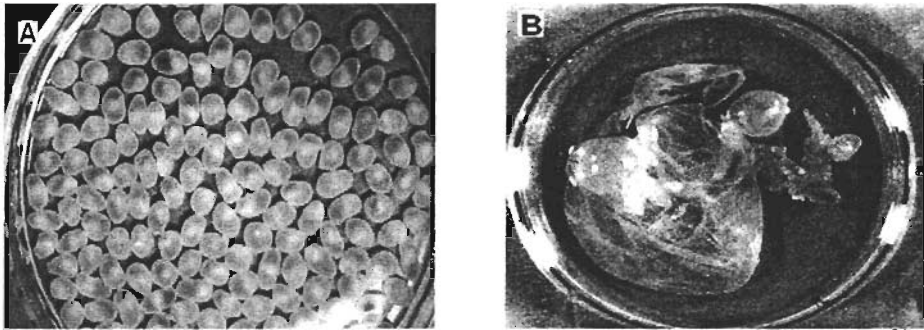


Figura 1 A) Fotografía de un gusano adulto, en la cual se pueden observar las diferentes secciones que lo componen, a la izquierda se encuentra el escólex y el cuello (EC), en el centro los proglótidos inmaduros (PI) y a la derecha los proglótidos grávidos (PG). B) Escólex. Pueden observarse los órganos de fijación, las cuatro ventosas (V1-V4), y en la parte central el rostellum armado (R).²⁴

1.2.1.1.2 Cisticerco

La larva de la tenia o cisticerco localizados en el cerebro humano presenta dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. El de tipo celuloso (*Figura 2A*) mide entre 4 y 20 mm de longitud, es transparente y está cubierto por una membrana delgada a través de la cual se puede observar el escólex como gránulo sólido excéntrico. En el interior de la vesícula se encuentra contenido el fluido vesicular, donde abundan proteínas, carbohidratos y lípidos. Una característica de los cisticercos celulosos es que están separados del tejido del hospedero por una cápsula fina de colágena.¹⁰ Cuando el cisticerco está vivo, es de un color claro, transparente, con una opacidad central que corresponde al escólex invaginado; si el parásito está muerto se observan alteraciones como separación de los ganchos o irregularidades en la membrana y en su cuello.¹¹ El cisticerco racemoso (*Figura 2B*), casi siempre es grande por el crecimiento de sus membranas, está formado esencialmente por vesículas de morfología variable que presentan estrangulaciones y arborizaciones, faltando comúnmente el escólex; su tamaño varía de 5 a 200 mm y, está cubierto de una fina membrana vesicular que presenta tres capas: una externa o de revestimiento, otra media y una interior o profunda que presenta irregularidades.¹²



*Figura 2. A) Cisticercos de tipo celuloso, extraídos del músculo esquelético de un cerdo infectado naturalmente.²⁴
B) Cisticerco de tipo racemoso, extraído de la cisterna basal de un cerebro humano.⁷*

1.2.1.1.3 Huevo

Los huevos son esféricos y miden de 30-40 μm , en su interior alojan una oncósfera (*Figura 3A*), o embrión hexacanto porque presenta seis pares de ganchos. La capa más externa del huevo es el vitelo, la siguiente es la membrana embriofórica que rodea al embrióforo, membrana que protege al embrión mientras este se encuentra en el medio ambiente. El embrión está rodeado por la membrana oncosferal que es impermeable a las condiciones ambientales externas, aunque se vuelve permeable al entrar en contacto con la pancreatina que además lo activa. El embrión activado pone en movimiento los ganchos, los que le permiten salir de la membrana oncosferal (*Figura 3B*).¹³ Los huevos son resistentes al medio ambiente, por lo que una vez expulsados por el hospedero se mantienen viables, se calcula que un huevo puede permanecer viable hasta 3 meses en un ambiente húmedo y cálido,⁹ lo que ocurre en lugares donde el hombre defeca al aire libre, ya sea cuando trabaja en el campo o en zonas peridomésticas, razón por la cual los porcinos tienen fácil acceso a las heces.

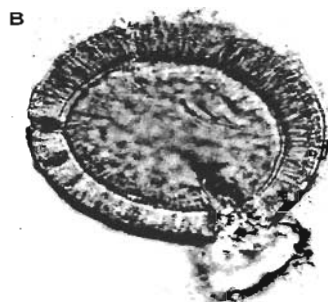


Figura 3. A) Micrografía de un huevo de *T. solium* en el que se observa claramente la oncosfera o embrión hexacanto. B) Fotografía de un huevo en eclosión, el embrión hexacanto ha puesto en movimiento sus ganchos para poder salir de la membrana oncosférica. De www.facmed.unam.mx/grid/fotos.htm

1.2.1.2 Sistema de transporte y excreción/secreción

El cestodo al carecer de órganos digestivos realiza su alimentación absorbiendo los nutrientes ya digeridos por el hospedero a través del tegumento. El tegumento está cubierto por una membrana plasmática o tegumental que rodea a innumerables microtrícas, que aumentan la superficie de absorción. La superficie más externa de la membrana tegumental está llena de un glicocálix compuesto por glucoproteínas producidas activamente por los citones subtegumentales, por debajo de la membrana tegumental se encuentra una gran cantidad de citoplasma perteneciente a los citones subtegumentales lleno de vacuolas de diferentes tamaños. Es por este tegumento que el parásito secreta o absorbe sus requerimientos nutricionales. Su sistema excretor es rudimentario y es referido como sistema protonefridial, esta constituido por células en flama, capilares y tubos colectores. De forma característica, cada gusano tiene un par de tubos colectores longitudinales principales, uno dorsal y uno ventral, localizados sobre los márgenes laterales y que vacían a través de una vejiga terminal.¹⁴

1.2.1.3 Sistema nervioso

El sistema nervioso de los cestodos parte del escólex y presenta el diseño típico ortogón, termino introducido por Reisinger en 1925, el cual describe al sistema nervioso de estos gusanos.¹⁵ El parásito cuenta con un sistema nervioso que consiste en una red rectangular de fibrillas simétricas nerviosas con un ganglio cefálico y un agrupamiento denso de células nerviosas multipolares en un estroma fibrilar que rodea esta área en el escólex.³ Tiene cinco pares de nervios longitudinales que corren desde el ganglio cefálico a través de todo el estróbilo; también cuenta con terminaciones nerviosas laterales en cada uno de los proglótidos, particularmente en el tegumento. El cirro y la vagina están ricamente innervados, y las terminaciones nerviosas alrededor del poro genital son más abundantes que en otras áreas del tegumento estrobilar.⁴ Estudios inmunohistoquímicos han mostrado sitios con actividad de acetilcolinesterasa y la presencia de neuropéptidos y de la 5-hidroxitriptamina (serotonina).¹⁶

1.2.1.4 Sistema muscular

El músculo consiste de dos porciones: las miofibrillas contráctiles y los miocitones no contráctiles, como otros platelmintos, sus músculos no son estriados y carecen de túbulos transversos sarcolémicos (túbulos T). Los miocitones constituyen el volumen del parénquima del gusano y son referidos como células parénquimales.⁴ El sistema muscular del cisticerco muestra una distribución diferente a la del adulto; en éste último, todo es parecido al músculo liso, la característica más sobresaliente es un denso enrejado de miofilamentos de fibras conectivas, cada uno unido a una extensión sarcoplásmica de miocitones, a éste conjunto de estructuras se le denomina unidades miociton-miofilamento-pseudopodo, las cuales están involucradas en el transporte de glucógeno de las células del tejido germinativo hacia los proglótidos maduros; mientras que el primero tiene una variedad de fibras musculares, circular en el rostelo y ventosas, circular, longitudinal y transversal en

el tejido tegumentario y una red subcuticular en el canal en espiral invaginado. La porción contráctil contiene actina, paramiosina y fibrillas de miosina.^{17, 18}

1.2.1.5 Sistema reproductor

Los proglótidos poseen cientos de testículos y un ovario trilobulado (dos grandes y uno pequeño), por lo cual son hermafroditas. El ovario libera los óvulos hacia el oviducto, donde se lleva a cabo la fertilización dentro del mismo proglótido, o podría ser entre diferentes segmentos cuando el parásito se encuentra doblado sobre si mismo, o bien entre proglótidos de diferentes gusanos cuando hay dos o más de ellos en el mismo hospedero.⁵

1.2.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. solium* (Figura 4) incluye a dos hospederos mamíferos: humano y cerdo, el primero el hospedero definitivo, y el segundo el hospedero intermediario. Los humanos también pueden presentar el estadio larvario formando parte del ciclo como hospedero intermediario accidental. Un gusano adulto puede permanecer en su hospedero por cerca de 20 años, induciendo una sintomatología mínima.¹⁹ Las personas portadoras del gusano adulto pueden percatarse de ello, debido a que los proglótidos grávidos son liberados en las heces y son visibles a simple vista, pero, rara vez, saben que los huevos son liberados dentro de los proglótidos, por lo que desconocen su condición y perpetúan la infección.²⁰ Después de la ingestión el embrióforo que protege al embrión (oncósfera) en el huevo de *T. solium* es deshecho en el tracto intestinal, el embrión hexacanto penetra la mucosa y a través de la circulación se sitúa en diferentes tejidos. El cisticerco se desarrolla en aproximadamente 2 meses después de la ingestión de los huevos, la mayoría de las veces en músculo esquelético, el sistema nervioso central y en el ojo.¹⁷

Finalmente, el ciclo se cierra, cuando el hospedero definitivo consume carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida parasitada con cisticercos, condición que permite la viabilidad de estos últimos. Cuando uno de los cisticercos viables entra en contacto con los fluidos gástricos e intestinales

se activa y evagina su escólex,²¹ por medio del cual se adhiere a la pared intestinal con el uso de sus cuatro ventosas y con la inserción de los ganchos en la mucosa intestinal.²² Aproximadamente en un periodo de 12 semanas después de la ingestión del cisticerco, comienzan a aparecer los proglótidos grávidos en las heces.¹⁷

Los cisticercos se mueren a temperaturas de 45-50°C, pero pueden sobrevivir en trozos gruesos de carne si el centro no es cocinado adecuadamente.⁶ Los cisticercos pueden sobrevivir de 26 a 30 días a 4 °C, lo cual indica que la infección puede darse por la ingesta de carne mal cocida o cruda después de haber sido refrigerada a 4 °C en un lapso menor a un mes.²³

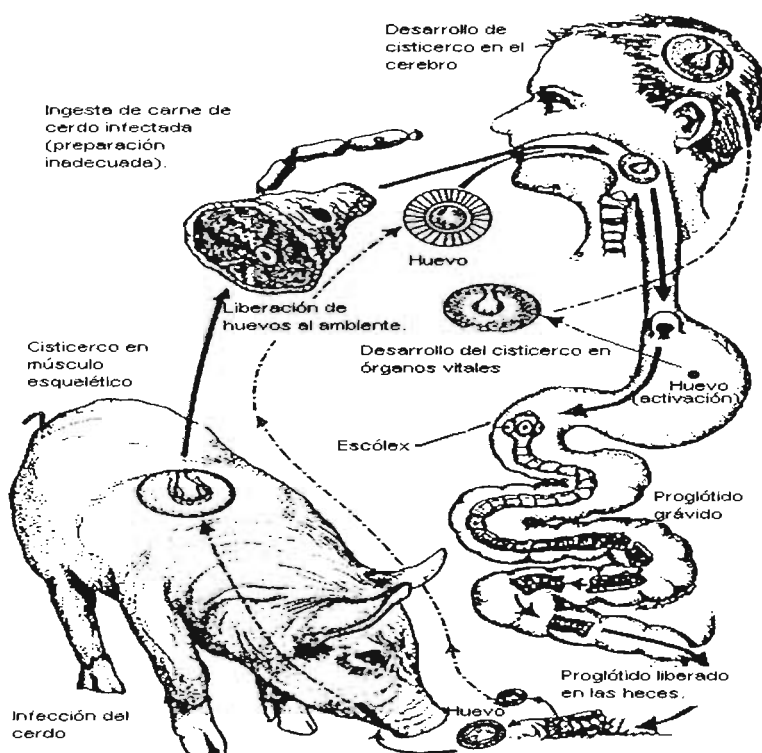


Figura 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Intervienen dos hospederos mamíferos, uno intermediario, el cerdo, y el definitivo y único, el humano, el cual también forma parte del ciclo como hospedero intermediario accidental. Tomado y modificado de: www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/vph/cards/Taenia-solium.

1.2.3 Manifestaciones clínicas

1.2.3.1 Teniosis

Como ya se mencionó anteriormente, el gusano adulto se fija al intestino delgado por medio de sus ventosas y ganchos. Por lo tanto, el gusano sólo causa una ligera inflamación en el sitio de implantación, sin causarle un daño sustancial al intestino.²⁴ Las manifestaciones clínicas son ligeras, produciéndose en 2 a 3 meses después de la ingestión de los cisticercos. Inicia con malestar general, alteraciones del apetito y pérdida de peso. En ocasiones se puede presentar también astenia y adinamia, dolor abdominal, náusea de predominio matutino, diarrea que puede alternarse con periodos de constipación y el prurito anal es frecuente.²⁵

1.2.3.2 Cisticercosis

La forma larvaria comunmente infecta el sistema nervioso central, causando neurocisticercosis; este tropismo se lo ha atribuido a los aspectos biomecánicos de la circulación junto al alto grado de concentración de glucosa o glucógeno del tejido.¹ La neurocisticercosis es una enfermedad pleomórfica, ya que sus manifestaciones principales dependen del número, localización, estadio y tipo de parásitos albergados. El grado de la reacción inflamatoria inducida por el parásito y el estado del hospedero también son factores importantes.⁵

La neurocisticercosis es causa de la epilepsia de aparición tardía en el 58% de los pacientes de nuestro país.²⁶ La práctica de estudios de neuroimagen es de fundamental importancia en todo paciente con epilepsia de inicio tardío con el objeto de confirmar o descartar la sospecha clínica de neurocisticercosis. Los signos clínicos más frecuentes son: déficit motor, signos de liberación piramidal, ataxia cerebelosa, signos de disfunción de tallo cerebral y movimientos involuntarios. Estas manifestaciones usualmente siguen un curso progresivo, por lo que es difícil el diagnóstico diferencial con neoplasias o con otros procesos infecciosos del sistema nervioso.⁸

1.2.4 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

El cisticerco ha elaborado diversos mecanismos para evadir el sistema inmune, entre los cuales destacan, el alojamiento en zonas “inmunológicamente privilegiadas”, como por ejemplo, el ojo. Esto probablemente se deba a las características anatomofuncionales del ojo, tales como la ausencia de un sistema linfático intraocular, la presencia de una barrera hemato-retiniana y de una barrera hemato-acuosa. Estas características hacen del ojo un órgano con respuesta inmune limitada.²⁷ Por otra parte, experimentos realizados en conejos, demostraron que cuando estos son sensibilizados previamente con cisticercos de *Taenia crassiceps*, ya sea por implantación en el peritoneo o por inmunización activa con extractos crudos, al ser infectados con un cisticerco en la cámara anterior del ojo, estos presentan una intensa reacción inflamatoria, neovascularización corneal y edema en el ojo infectado, así como un alto título local de anticuerpos anti-cisticerco, lo que da como resultado, que el cisticerco no logre desarrollarse.²⁸ Otro mecanismo importante es el enmascaramiento del cisticerco con inmunoglobulinas del hospedero. Estudios hechos en cisticercos extraídos de varios órganos humanos, examinados por inmunofluorescencia mostraron la presencia en orden de predominancia de la IgG, IgA, IgM, C3b e IgE.²⁹ Estudios posteriores han demostrado la presencia de un receptor para la fracción Fc de IgG en la superficie del cisticerco,³⁰ en adición, este parásito cuenta con proteasas que digieren a este isotipo de inmunoglobulinas,³¹ para ser utilizadas como nutrientes.

El cisticerco cuenta con mecanismos más finos para evadir al sistema inmune, como la secreción de sustancias específicas, tales como la paramiosina, la cual se une a C1q e inhibe la activación de la vía clásica del complemento;³² la teniastatina que inhibe ambas vías de la activación del complemento³³ y tiene una ligera modulación en la actividad leucocitaria;³⁴ polisacáridos polisulfatados que activan al complemento lejos del parásito.³⁵ El factor de meracostodo (MF), complejo formado por ARN y proteína,³⁶ el cual disminuye la proliferación de linfocitos en

respuesta a mitógenos e inhibe la reacción inflamatoria a la implantación subcutánea de cisticercos en ratones, así como la producción de anticuerpos y de la respuesta celular en contra de antígenos del cisticerco.³⁷ Cuenta con una cisteína proteasa³⁸ que disminuye la cantidad de linfocitos T cooperadores vía apoptosis.³⁹

La participación de enzimas antioxidantes es primordial para la supervivencia del parásito, debido a que estas neutralizan especies reactivas de oxígeno (ERO) provenientes de la respuesta inmune celular (estallido respiratorio), así como a otros xenobióticos y fármacos. Las dos enzimas más importantes son la Superóxido dismutasa⁴⁰ y la Glutación S-transferasa^{41, 42, 43}

1.2.5 Diagnóstico

1.2.5.1 Teniosis

El diagnóstico de la teniosis presenta dos problemas: la baja sensibilidad de la microscopia de luz, y la similitud morfológica entre los huevos de *T. solium* y *T. saginata* (parásito que no causa cisticercosis en humanos). Para hacer el diagnóstico diferencial es necesario encontrar el escólex, y en él poder observar la doble corona de ganchos presente en *T. solium* ó los proglótidos para contar el número de ramas uterinas, más de trece corresponden a *T. saginata* y menos de trece a *T. solium*. Para recuperarlos se recurre al vaciado intestinal con la administración de un purgante inmediatamente después del tratamiento antiparásito, aunque no siempre se obtienen.²³

Existen varias técnicas diagnósticas, pero ninguna de ellas se ha podido implementar para llevar a cabo un diagnóstico masivo, ya que debe tomarse en cuenta que las zonas de mayor prevalencia de la infección son de escasos recursos económicos y el costo de estas técnicas es elevado. Las técnicas que se han desarrollado son: la detección de coproantígenos por un ensayo inmunoenzimático (ELISA), en el cual son detectadas moléculas específicas del cestodo en muestras fecales;^{44, 45} la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar genes mitocondriales del

ADN proveniente de huevos;⁴⁶ e inmunoelctrotransferencia (IET) para detectar moléculas específicas del parásito, como los antígenos de excreción-secreción (TSES33 y TSES38);^{47, 48} la búsqueda de moléculas específicas de este estadio aún continúa.

1.2.5.2 Cisticercosis

El diagnóstico de la cisticercosis más certero se basa en la neuroimagen con ayuda de la serología, y otras como el diagnóstico molecular.

La tomografía axial computarizada (TC) es considerada como una de las técnicas más confiables para apoyar el diagnóstico de la neurocisticercosis. La resonancia magnética nuclear (RMN) al igual que TC permite distinguir los cisticercos en el tejido nervioso. La elección de una u otra depende del estado de la enfermedad y la localización de los parásitos. Ambas técnicas son específicas y sensibles, pero su principal limitación es que tienen un costo muy elevado.¹

En la serología, la búsqueda de anticuerpos específicos se realiza por medio del ELISA utilizando como antígeno extractos crudos del cisticerco o el antígeno B,⁴⁹ esta técnica tiene muchas ventajas y por ello se sigue utilizando, pero su mayor limitación es que presenta reacciones cruzadas.⁵⁰ También se emplea la inmunoelctrotransferencia (IET), con una fracción de glicoproteínas,⁵¹ las LLGP's⁵² (14, 18, 40, 42 y 50 kDa) que permiten obtener una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100% ya que no presentan reacción cruzada con sueros provenientes de individuos infectados con otros parásitos, tales como *T. saginata*, *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *S. boematobium*, *S. mansoni*, *A. lumbricoides* y *Trichinella sp.*

Finalmente, las técnicas de diagnóstico molecular están basadas en el desarrollo de proteínas sintéticas o recombinantes que son combinadas con técnicas inmunológicas, así como las técnicas de hibridación con sondas de ADN o el uso de la PCR para identificar regiones específicas.⁵³ Sin embargo, estas técnicas están aun en desarrollo.

1.2.6 Tratamiento

1.2.6.1 Teniosis

El fármaco de elección es la niclosamida. Actúa directamente en los proglótidos de las tenias, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas. Al emplear las dosis adecuadas, el escólex y los proglótidos pueden estar parcialmente digeridos e irreconocibles. No tiene acción contra los huevos ni contra los cisticercos. Es obligada la administración de un laxante una o dos horas después del tratamiento, con la finalidad de no poner en riesgo al paciente al liberarse los huevos en la luz intestinal.³⁴

1.2.6.2 Cisticercosis

El enfoque terapéutico está condicionado al diagnóstico preciso del tipo de cisticercosis tomando en cuenta los siguientes aspectos: a) la variabilidad que presenta el cuadro clínico de la cisticercosis; b) las diferentes etapas biológicas en la historia natural de la enfermedad (encefalitis, quistes, racimos calcificaciones y otros), y c) la localización y los cuadros patológicos secundarios (meningitis, aracnoiditis, hidrocefalia, vasculitis y otros).

El tratamiento puede ser sintomático, enfocado en el control de crisis convulsivas (antiepilépticos), cefalea (analgésicos), hipertensión intracraneal (esteroides y diuréticos) y alteraciones de la conducta (psicodrogas). El tratamiento quirúrgico varía según la localización y las características anatomopatológicas de la cisticercosis, así como el número y tamaño de los parásitos. El tratamiento farmacológico está basado en un diagnóstico confiable y preciso de todos los aspectos de la enfermedad. Los dos fármacos de elección son el praziquantel y el albendazol, el primero incrementa la permeabilidad de las membranas celulares para el calcio, causando contractura y parálisis del parásito; el segundo, inhibición de formación de citóesqueleto y bloquea la captación de la glucosa. Otros fármacos empleados son el mebendazol, el metrifonato y el flubendazol.⁴²

1.2.7 Medidas de control

Debido a que la teniosis es exclusivamente una enfermedad humana, el hombre es el responsable de difundir la enfermedad. Los factores involucrados en la transmisión de la enfermedad incluyen el contacto de los cerdos con las heces humanas, la carencia de inspección de los cerdos, consumo de carne cruda o mal cocida, falta de higiene personal (lavado inadecuado de manos antes de comer y después de ir al baño), etc.

La *Taenia solium* es vulnerable al control y a una potencial erradicación en base a las siguientes características: 1) el ciclo de vida requiere del ser humano como hospedero definitivo; 2) la teniosis es la única fuente de infección para el hospedero intermediario; 3) los cerdos pueden ser monitoreados, considerando la corta duración de su vida; 4) no hay reservorios salvajes; y 5) el empleo de antiparasitarios seguros y eficaces.

Las medidas preventivas que deben tomarse en cuenta para el control de *Taenia solium* son: el diagnóstico y el tratamiento de los portadores del estadio adulto del parásito, así como la terapéutica masiva;³⁵ la mejora en la crianza de cerdos, en la que debe incluirse, de igual manera, el tratamiento masivo y en el futuro la vacunación, ya que actualmente no se cuenta con una vacuna comercial; una rigurosa inspección en los rastros; el desarrollo e implementación de campañas de educación para la salud³⁶ que promuevan medidas de higiene, así como el conocimiento de la enfermedad.³⁷

1.2.8 Vacunas

Una alternativa viable para el control de la teniosis y cisticercosis es el empleo de una vacuna en cerdos.³⁸ Además una vacuna segura y efectiva en contra de la cisticercosis porcina es obligatoria para la evaluación de vacunas similares de uso humano.³⁹ Se han realizado una gran cantidad de ensayos en la búsqueda de dicha vacuna. La naturaleza del inmunógeno empleado es muy variada, se han utilizado extractos crudos de oncosferas^{60, 61} y cisticercos,^{62, 63} en los cuales se ha encontrado

resultados prometedores, pero también han sido probadas moléculas más específicas, como las provenientes del escólex^{64, 65} o productos de excreción/secreción de oncósferas,⁶⁶ y recientemente se están utilizando antígenos provenientes de otras tenias como *T. crassiceps*⁶⁷ y *T. ovis*³⁹ ya que presentan reacción cruzadas con *T. solium*, con buenos resultados. En la actualidad se ha profundizado la búsqueda recurriendo a la Biología Molecular para obtener proteínas recombinantes⁶⁸ o péptidos sintéticos^{69, 70, 71} e inclusive construcciones de ADN^{72, 73} que confieran una mejor protección en contra del parásito.

1.3 Vía glucolítica

La glucosa normalmente aparece en sangre como resultado de la degradación de polisacáridos complejos o de su síntesis a partir de fuentes distintas de los carbohidratos (gluconeogénesis). La glucosa penetra la mayoría de las células a través de un transportador específico que la traslada desde el exterior de la célula hasta el citosol. La glucólisis convierte la glucosa a dos unidades C₃ (piruvato), de menor energía libre, en un proceso que utiliza la energía para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi. Este proceso requiere una vía de reacciones acopladas químicamente para llevar a cabo la transferencia del grupo fosfato. Así pues, la estrategia química de la glucólisis es: 1) la adición de grupos fosfato a la glucosa, 2) la conversión química de los intermediarios fosfatados a compuestos con elevado potencial de transferencia de dicho grupo, y 3) la subsiguiente hidrólisis de las sustancias reactivas para llevar a cabo la síntesis de ATP.

La glucólisis consta de 10 reacciones enzimáticas (*Figura 5*) que pueden dividirse en dos etapas en base a la inversión y restitución energética respectivamente. En la fase I, una hexosa (la glucosa) es fosforilada y fragmentada, dando lugar a dos azúcares de 3 carbonos la hidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato, este proceso consume dos ATP's; aquí empieza la fase II de la vía, las triosas se convierten a piruvato, con la producción de cuatro ATP's. Por consiguiente, el

rendimiento neto de la glucólisis es de dos ATP's por molécula de glucosa, ya que en la fase I se consumen dos ATP's y la fase II produce cuatro ATP's.⁷⁴ La reacción global de la vía es:

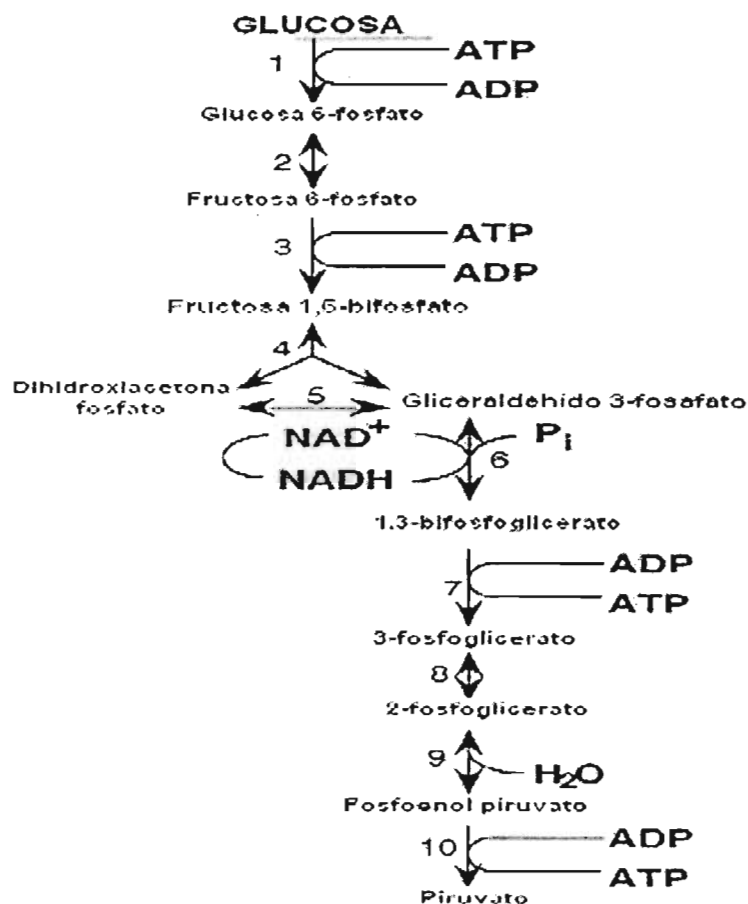


Figura 5. Vía glucolítica. Desplegado de las 10 reacciones enzimáticas participantes. Las enzimas participantes son: 1) Hexoquinasa, 2) Fosfoglucosa isomerasa, 3) Fosfofructoquinasa, 4) Aldolasa, 5) Triosa fosfato isomerasa, 6) Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, 7) Fosfoglicerato cinasa, 8) fosfoglicerato mutasa, 9) Enolasa y 10) Piruvato cinasa. Tomado y modificado de ⁷⁵

1.3.1 Triosa fosfato isomerasa (TPI)

La segunda etapa de la glucólisis comienza por la división de la fructosa-1,6-bisfosfato en gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. El gliceraldehído-3-fosfato se encuentra en la vía directa de la glucólisis, pero no la hidroxiacetona fosfato. Sin embargo, esta última puede convertirse fácilmente en gliceraldehído-3-fosfato. Estos compuestos son isómeros: la hidroxiacetona fosfato es una cetosa, mientras que el gliceraldehído-3-fosfato es una aldosa. La isomerización de los azúcares fosforilados de tres carbonos está catalizada por la triosa fosfato isomerasa (*Figura 6*), su principal importancia radica en no permitir la acumulación de la hidroxiacetona fosfato que es tóxica, por lo que la ausencia de esta enzima es incompatible con la vida. Esta reacción es muy rápida y reversible.⁷⁶

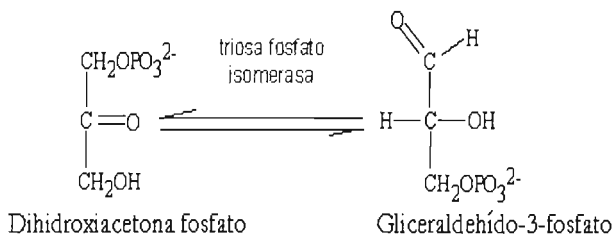


Figura 6. La triosa fosfato isomerasa reconduce la hidroxiacetona fosfato hacia la vía glucolítica principal, de modo que no se requiere una serie separada de reacciones.

La TPI es una enzima homodimérica con subunidades (*Figura 7*) de alrededor de 27 kDa, su estructura de barril ($\alpha\beta$)_n es muy conservada,⁷⁷ no obstante existen variaciones considerables en su secuencia primaria. El mecanismo catalítico de la TPI involucra la química ácido/base, por estudios cristalográficos con rayos X se ha demostrado que el sitio catalítico está conformado por 3 residuos de aminoácidos, el Glutamato 165, la Histidina 95, los cuales participan en la transferencia del protón, y la Lisina 12 que forma un puente salino con el sustrato.⁷⁸ La diferencia en algunos aminoácidos y regiones de la molécula han sido usadas para diseñar inhibidores específicos para inactivar a la enzima.

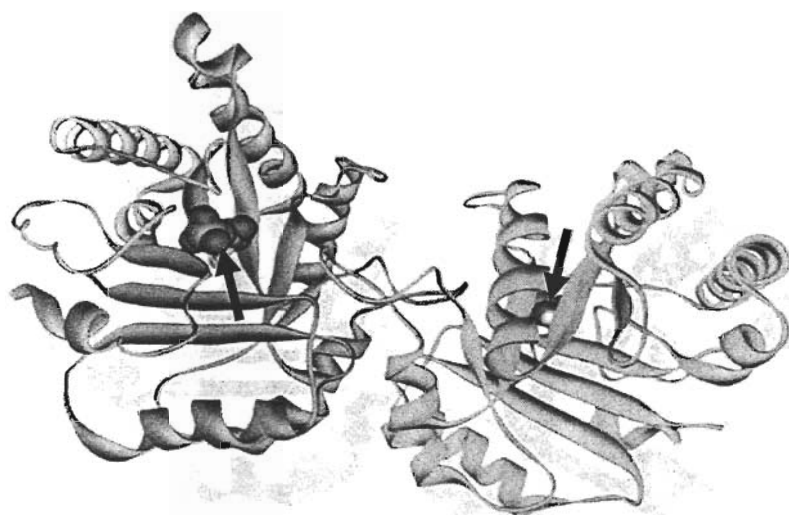


Figura 7. Monómero de la TPI. Consta de un núcleo central formado por ocho hebras β paralelas rodeadas por ocho hélices α . Este patrón estructural es llamado barrilete $\alpha\beta$.⁷⁸ Las flechas indican la posición del sustrato en el sitio catiónico. Tomado de www.cclrc.ac.uk/Activities/Gallery/Quasispr.jpg

1.3.1.1 Triosafosfato isomerasa en parásitos

La enzima ha sido estudiada en *Schistosoma mansoni* por clonación del ADNc y subsiguiente expresión,⁷⁹ lo cual demostró que la TPI correspondía al antígeno de 28 kDa presente en todos los estadios del parásito y para el cual ya se había encontrado un anticuerpo monoclonal (M.1)⁸⁰ que confiere resistencia parcial a la infección en ratones. Estudios acerca del análisis estructural han demostrado que la interfase es el blanco para desarrollar inhibidores específicos tales como péptidos.^{81, 82} En adición, un residuo de cisteína no conservado presente en la interfase ha sido propuesto como blanco. Esta cisteína está presente en varios parásitos como *Trypanosoma brucei* (Cis14), *Trypanosoma cruzi* (Cis15), *Leishmania mexicana* (Cis16), *Plasmodium falciparum* (Cis13) y *Entamoeba histolytica* (Cis14). El tiosulfonato de metilmetano es capaz de modificar la conformación estructural de la vecindad de la cisteína, dando como resultado una disminución de la actividad,

siendo la de humano la menos afectada.⁸³ Para *Plasmodium falciparum* se ha encontrado una familia de colorantes sulfonados que son efectivos en la inhibición⁸⁴ y para *Trypanosoma cruzi* se ha encontrado un compuesto [ácido 3-(2-benzothiazolilto)-1-propanesulfónico] que abate la actividad con un alto nivel de selectividad por unión a la interfase.⁸⁵

Para el caso de la TPI de *Taenia solium* (TTPI) se ha clonado, expresado y caracterizado una TPI recombinante,⁸⁶ y la búsqueda de inhibidores específicos aún se encuentra en fase temprana.

1.4 Metabolismo destoxificante

Tanto los organismos de vida libre como los parásitos están expuestos a xenobióticos en sus ambientes. Muchos de estos xenobióticos son tóxicos para las funciones normales del metabolismo, son lipofílicos y son absorbidos al interior de las células por difusión pasiva. Pocos xenobióticos son eliminados sin cambio alguno, y algunos otros sufren una biotransformación catalizada por enzimas, haciéndolos generalmente más solubles en agua que el compuesto original, para facilitar su eliminación. Sin embargo, hay excepciones a la regla y algunas veces, los xenobióticos son metabolizados a productos más reactivos que son tóxicos.

Las rutas del metabolismo para destoxificar xenobióticos pueden ser divididas en dos grupos de reacciones. Fase I del metabolismo en la que se incluyen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, estas son llamadas reacciones de “funcionalización”, porque un grupo funcional polar es introducido a la molécula. Los principales representantes de esta fase son: el citocromo P450, la sulfoxidasa, las peroxidases, la xantina oxidasa, y la monoamina oxidasa. La fase II del metabolismo incluye varias reacciones de síntesis entre un grupo funcional polar del xenobiótico (sustrato) y un cosustrato endógeno, tales como el glutatión reducido (GSH), UDP-ácido glucurónico o glicina, resultando la formación de un enlace covalente, es por ello que estas reacciones son referidas como reacciones de conjugación y los productos de reacción como conjugados. La principal representantes

de esta fase son las Glutación S-transferasas (GST's), una familia de enzimas multifuncionales, la mayoría de ellas se encuentran en el citosol, han sido ampliamente estudiadas ya que se encuentran presentes en la mayoría de los organismos, desde protozoarios hasta vertebrados.⁸⁷

1.4.1 Glutación S-transferasas (GST's)

Estas enzimas catalizan la conjugación de glutación (GSH) a una variedad de sustratos electrofílicos (*Figura 9*), realizando sustituciones nucleofílicas aromáticas, adiciones de Michael para cetonas α , β -insaturadas y reacciones de apertura del anillo epóxido, todas de las cuales resultan en la formación de GSH conjugados y la reducción de hidroperóxidos, dando a su vez la formación de GSH oxidado (GSSG).⁸⁸ Muchas de las GST's existen como enzimas solubles, aunque existen GST's microsomales y una GST mitocondrial. En humanos y roedores, las GST's solubles son expresadas colectivamente en gran cantidad, constituyendo cerca del 4 % de la proteína soluble total en el hígado.⁸⁹

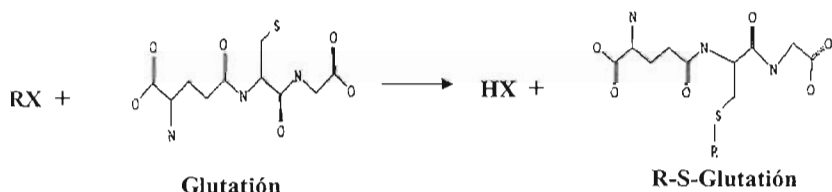


Figura 8 Reacción de catálisis de la Glutación S-transferasa, en donde R puede ser un grupo alifático, aromático o heterocíclico; y X un grupo polar, como sulfato, nitrilo o un halógeno.

Las GST's son enzimas dimericas (*Figura 8*) con masas moleculares monoméricas que van desde los 13 a los 28 kDa. Cada subunidad tiene un sitio activo compuesto de dos distintas regiones funcionales: el sitio-G hidrofílico, el cual se une glutación, y un sitio-H adyacente, el cual provee un ambiente hidrofóbico para la unión de diversos sustratos electrofílicos. El sitio-G está altamente conservado entre todas las GST's debido a su alta especificidad por el glutación, mientras que el sitio-

H es divergente entre las diferentes GST's, y exhibe una amplia y variable especificidad de unión a sustrato.⁷⁰

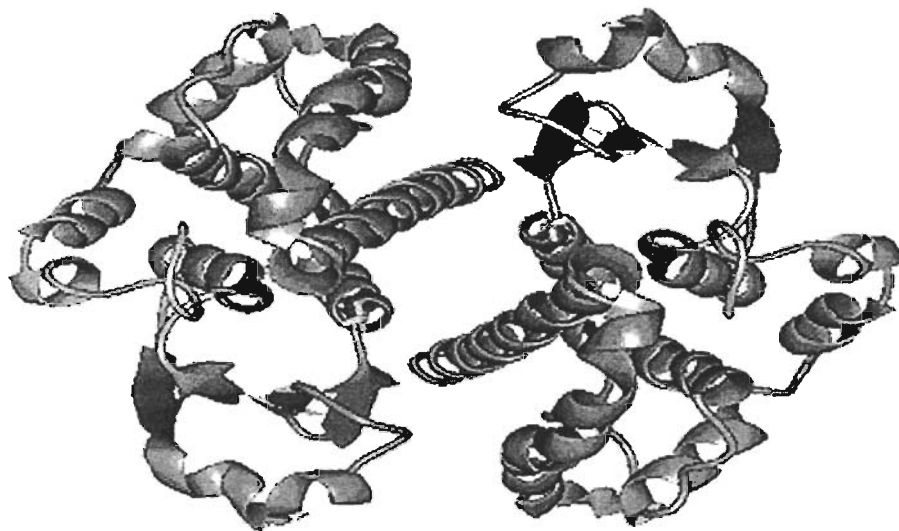


Figura 9. Modelo de cintas del dímero de una Glutatión S-transferasa humana de clase Theta. Tomado y modificado de: <http://depts.washington.edu/wmatkins/lab.html#Biophysical>

1.4.1.1 Glutatión S-transferasa en parásitos

La interacción de la GST con algunos fármacos antiparasitarios contribuye a la detoxificación y sobre todo a la resistencia farmacológica. Se ha observado que la distribución de GST's en helmintos es mucho mayor en tremátodos digéneos y cestodos intestinales que en nemátodos. De los helmintos analizados, los esquistosomas muestran el nivel de actividad más alto, además de que han sido las enzimas más estudiadas, por ejemplo, las de *S. mansoni* y *S. japonicum*. También han sido identificadas en algunas especies de protozoarios, incluyendo a *T. cruzi* y algunas especies de *Acanthamoebas*, pero no se ha detectado su actividad en *Entamoeba histolytica*, *G. intestinalis* o *T. vaginalis*.⁷⁵

En el caso particular de *T. solium*, hasta la fecha han sido descritas dos isoformas de la GST, una de 25,500 Da de clase Mu y otra de 26,500 Da de clase alfa. Ensayos de vacunación en el modelo *Taenia crassiceps*-ratón con estas GST's, produjeron un 90 % de protección, y por separado, la de 26.5 kDa 74 % y la de 25.5 kDa 46 %, ^{41, 42} por lo que se les ha considerado como en otros parásitos, potenciales candidatos para el desarrollo de una vacuna.

1.5 Despliegue en fagos (PhD)

La tecnología de despliegue en fagos fue descrita por vez primera por George P. Smith en 1985, en la cual empleó fagos filamentosos de *Escherichia coli* (M13, fd y f1) como vehículos para expresar diversas proteínas o secuencias peptídicas como parte de las proteínas de su cubierta. Esta tecnología ha tenido un auge muy importante en las áreas de la Inmunología, Biología celular, Farmacología e investigación de fármacos. La técnica es una herramienta muy poderosa para identificar y caracterizar interacciones de polipéptidos recombinantes con sus blancos de unión. Su aplicación potencial incluye identificación de moléculas líderes para su uso en terapéutica.⁹¹

1.5.1 Fagos filamentosos

Bacteriófagos son virus que infectan una variedad de bacterias Gram-negativas usando el pili como receptor. Los fagos filamentosos que infectan a la *E. coli* consisten de una cadena sencilla de ADN (ADNcs). El genoma total del fago consiste de 11 genes. Un fago viable expresa cerca de 2700 copias de la proteína 8 (pVIII) y 3 a 5 copias de la proteína 3 (pIII) en su conformación estructural (Figura 6).⁹²

Los fagos filamentosos no producen una infección lítica en *E. coli*, pero si inducen un estado en el cual la bacteria infectada produce y secreta las partículas virales sin sufrir lisis. Por cada división celular son liberadas cerca de 100 partículas virales, lo que da como resultado una disminución considerable de ésta; en cultivos sólidos puede observarse una placa turbia que contiene un

aproximado de 10^8 partículas de fagos. La infección es iniciada por la unión de la proteína III al extremo del pili f de *E. coli* (ejemplo, cepa TG1). La unión induce la retracción del pili y la subsiguiente inyección del ADN del fago. Sólo el ADNcs circular del fago es introducido a la bacteria, donde es convertido por la maquinaria de replicación del hospedero a la forma replicativa (RF). La RF experimenta replicación para hacer el ADNcs y también sirve como templado para expresar las proteínas VIII y III. La progenie del fago es ensamblada por empaquetamiento del ADNcs dentro de las proteínas de cubierta, y expulsada al medio a través de la membrana bacteriana.⁹³

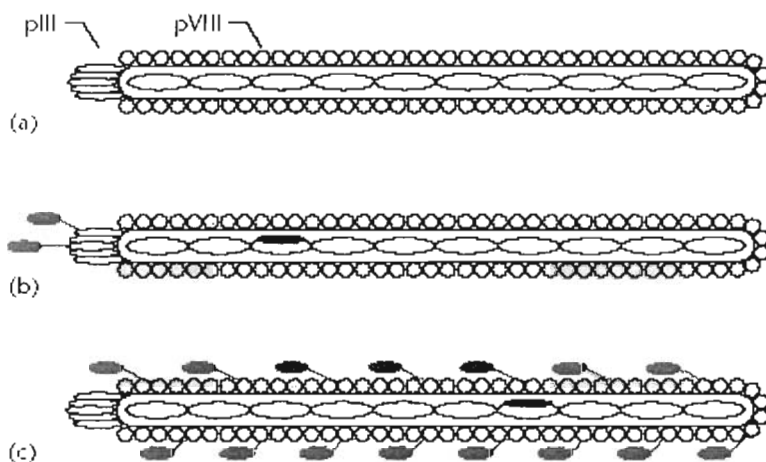


Figura 10. Representación esquemática de (a) el fago silvestre, (b) un péptido desplegado en pIII, y (c) un péptido desplegado en pVIII.⁹³

1.5.1.1 Proteína III

Está constituida de 406 residuos de aa, es la proteína de cubierta que se encuentra en menor proporción, pues solo está presente en 3 a 5 copias por fago. La proteína puede ser dividida en dos dominios: el C- terminal, que interactúa con la pVIII para mantenerse unida a la cubierta del fago; y

el N-terminal, dos tercios de la proteína forman una estructura abultada que median la unión al pili F, esencial para la infección. La inserción de péptidos en el dominio N-terminal regularmente no interfiere con la capacidad infectiva. Por manipulación genética han sido insertados péptidos espaciadores flexibles (ejemplo, GGGGSGGGGS) ó el flanqueo con cisteínas que al plegarse forman puentes disulfuro, los cuales mantienen separado el péptido desplegado del resto de las proteínas de cubierta (*Figura 9*), haciéndolo más accesible para interactuar con el receptor de interés.⁸³

1.5.1.2 Proteína VIII

Es la proteína principal de la cubierta, es un polipéptido de sólo 50 residuos de aa, y forma el cuerpo del fago. El número de copias de la pVIII depende de la longitud de la partícula del fago, la cual depende a su vez del tamaño del genoma. Generalmente, una molécula de la pVIII es requerida para envolver 2.3 nucleótidos, lo cual corresponde a 2800 copias para un genoma de 6.5 kb. Al igual que la pIII, oligonucleótidos aleatorios pueden ser clonados en el gen para la pVIII y expresados como una proteína de fusión al dominio N-terminal que es proyectado hacia al exterior de la superficie del fago. Debido a que pVIII compone casi en su totalidad de la cubierta del fago, las proteínas de fusión deben ser distribuidas a lo largo de la longitud del cuerpo del fago (*Figura 5*). La adición de más de cinco aminoácidos en el dominio N-terminal se vuelve tóxico para el ensamblaje de la cápside del fago, disminuyendo su infectividad⁸³

2. HIPÓTESIS

- Los anticuerpos desarrollados en contra de mimótopos de enzimas, identificados con anticuerpos inhibidores modificaran la actividad de las mismas.

3. OBJETIVO

- Evaluar la capacidad de inhibición de la actividad de la Triosa fosfato isomerasa con anticuerpos contra mimótopos de esta enzima, así como identificar mimótopos de dos isoformas de la Glutación-S transferasa (GST) de *Taenia solium*.

3.1 Objetivos particulares

- Amplificación de fagos con los mimótopos de TTPI.
- Producción de anticuerpos contra mimótopos de la TTPI.
- Purificar las IgG's dirigidas contra mimótopos de la TTPI.
- Ensayos de la actividad enzimática de la TTPI con sueros e IgG's purificadas.
- Identificar mimótopos de dos isoformas de la Glutación S-transferasa (GST_{25.5} y GST_{26.5}).
- Desarrollar anticuerpos en contra de los mimótopos de las dos isoformas de la GST.
- Hacer una caracterización inmunológica parcial de los anticuerpos anti-mimótopos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Todos los materiales usados en esta tesis, así como sus especificaciones han sido incluidos en la descripción del método en que fueron requeridos. Los animales empleados para las inmunizaciones fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Las centrifugaciones menores a 3700 rpm se hicieron en una centrifuga modelo Centra CL2 de IEC, y las mayores a 10 000 rpm en una microfuga modelo 5415C de eppendorf.

4.2 Métodos

4.2.1 Reamplificación y titulación de fagos

Las clonas de los fagos que contienen los mimótopos de la TTPI (previamente identificados) se muestran en la Tabla 1. Estos fagos se utilizaron para generar los sueros anti-mimótopos de la TTPI, siguiendo el método descrito en la siguiente sección. Los fagos fueron reamplificados colocando 20 μ L de la suspensión de los fagos en 50 mL de medio LB y 1 mL de cultivo (D.O._{600nm} = 0.8) de *E. coli* cepa TG1 (*ver Anexos*), e incubando a 37 °C con agitación durante 5 horas. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 3700 rpm durante 30 minutos, al sobrenadante recuperado, se le agregaron 8 mL de una solución de PEG 20 %/NaCl 2.5 M, y se guardaron a 4 °C toda la noche. Los fagos fueron concentrados centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos y resuspendiendo el botón en 1 mL de TBS pH 7.5 (Stock). El remanente de bacterias fue retirado centrifugando a 14,000 rpm por 10 minutos. La titulación de los fagos se realizó con diluciones (10^{-6} a 10^{-10}) seriadas realizadas con el sobrenadante stock. Se tomaron 10 μ L de las diluciones y con ellas se infectaron 200 μ L de un cultivo de *E. coli* cepa TG1 (D.O._{600nm} = 0.8), a 37 °C durante 30 minutos. Después fueron diluidos en 3 mL de medio Top SOB (45 °C) y vertidos en cajas con medio SOB.

Finalmente, las cajas fueron incubadas a 37 °C por toda la noche. Al día siguiente, se realizó el conteo de placas para determinar el título.

Ts 1	TPDMMMMRPGVR
Ts 6	MPPGMHQPPPSA
Ts 11	DANKHKQELPHF
Ts 13	FTSQNTIGSDVI
Ts 15	TQQQQCCTSQIE
Ts 16	DSVTPTSVMAVA

Tabla 1. Secuencia de los mimótopos de la TTPI.

4.2.2 Inmunización de animales

Se utilizaron ratones Balb/C hembras de seis semanas de edad, cinco por cada grupo. Cada ratón se inóculo con 10^{12} fagos en 200 μ L de PBS 1X estéril y 1 μ g de saponina, se realizaron cuatro inmunizaciones subcutáneas a intervalos de una semana. Se incluyó un grupo control positivo inmunizado con 20 μ g TTPI y 1 μ g de saponina, y dos grupos control negativo, uno inoculado sólo con PBS 1X estéril y otro con el fago silvestre (M13KE). Una semana después del último refuerzo, los ratones fueron sangrados a blanco por punción en el plexo retrorbital (Kakaturu et al. 2003).²⁴

Para el caso de los conejos, se utilizaron hembras de la cepa Nueva Zelanda de 3 meses de edad, uno por cada antígeno. El inóculo de fagos fue de 10^{14} pfu en 200 μ L de PBS 1X estéril (sin adyuvante), para el caso de las proteínas (control positivo) se utilizó 250 μ g de TTPI 1:1 con adyuvante completo de Freund para la primera vez y posteriormente tres refuerzos con el adyuvante incompleto. Se incluyeron los mismos controles negativos que en los ratones. El tipo de inmunización fue subcutánea con intervalos de 15 días cada una. Una semana después del último refuerzo, los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardíaca.

4.2.3 Purificación de IgG's de conejo

Las IgG's se purificaron por una columna de afinidad de Protein A-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech) la cual fue estabilizada pasando por ella 5 mL de una solución de fosfato de sodio 0.02 M pH 7.0 (solución I). Un mL de suero fue diluido en 1 mL de solución I y pasado por la columna. La columna fue lavada con 15 mL de solución I. La elución de las IgG's se llevó a cabo pasando por la columna 5 mL de una solución de ácido cítrico 0.1 M pH 4.0 y recibiendo el eluido en 5 mL de una solución de Tris-HCl 1.0 M pH 9.0 para neutralizar la solución. La elución neutralizada fue dializada y concentrada, para después determinar su cantidad de proteína por el método de Lowry (*ver Anexos*) y ajustarlas a 1 mg/mL. Finalmente, la columna fue estabilizada con la solución I para pasar más suero o lavada en PBS 1X para ser guardada en frío hasta nuevo uso.

4.2.4 Inmunoelectrotransferencia (IET)

Se preparó un gel de acrilamida preparativo al 12.5 % (*ver Anexos*), en el cual fue cargada una cantidad de 100 ng de proteína/mm. Previo al cargado, la proteína fue diluida (1:1) en solución de amortiguador de cargado (Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 4 %, azul de bromofenol 0.2 % y glicerol 20 %) e incubada a 100 °C durante 5 minutos. El proceso de electroforesis se llevó a cabo a 100 V, dándole el tiempo suficiente para que el azul de bromofenol llegara a 1.0 cm antes del final del gel.

La inmunoelectrotransferencia se realizó colocando el gel frente a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en una cámara de inmunoelectrotransferencia (BioRad) a una diferencia de potencial de 100 V durante una hora. La membrana se bloqueó con BLOTTO (leche descremada 10 % y NaN_3 0.2 %) y los sueros y las IgG's (1 mg/mL) obtenidos de los ratones y conejos fueron probados a una dilución 1:10, 1:100 y 1:500. Los anticuerpos unidos a la membrana fueron revelados con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón o de conejo según el caso, acoplados a peroxidasa (Life Technologies) a una dilución 1:2000 y con diaminobencidina (Sigma).

4.2.5 Obtención de anticuerpos específicos para la TTPI

Se hizo una inmunoelectrotransferencia con 2 mg de la TTPI, siguiendo el protocolo que se describe en el apartado anterior. La membrana después de ser bloqueada con BLOTTO se incubó con 2 mL del anticuerpo anti-TTPI diluido 1:50 en PBS-Tween 0.3 % durante 2 horas. Al término de la incubación, se hizo un lavado exhaustivo con PBS 1X pH 7.2. Los anticuerpos unidos a la membrana fueron eluidos con 5 mL de una solución de glicina 100 mM/ NaCl 150 mM por 5 minutos y neutralizados con 10 mL de PBS 10 X pH 7.4. Los anticuerpos fueron probados por IET y cuantificados por el método de Lowry (*ver Anexos*).

4.2.6 Ensayos de actividad de la TTPI

Primeramente la enzima purificada fue cuantificada tomando en cuenta su absorbancia a 280 nm y usando el coeficiente de absorción molecular $\epsilon = 1.3414 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La actividad de la TPI fue determinada en la dirección de gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato. La actividad fue medida a pH 7.4 en 1 mL de mezcla que contenía, amortiguador TED 100/10/1 (Trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, DTT 1 mM), 1 mM de gliceraldehído 3-fosfato (Sigma), 0.2 mM de β -NADH (Sigma), 2.5 unidades de α -glicerofosfato deshidrogenasa (Sigma) y 30 ng de la enzima (10 μL de la preincubación), la cinética fue monitoreada por el decremento de la absorbancia a 340 nm en función del tiempo en un espectrofotómetro (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech).

4.2.7 Ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI

Se hizo una preincubación con 300 ng de la enzima, para el control positivo solo se puso la enzima (100% de la actividad), y para las demás determinaciones se colocó junto con 10 μL de los sueros o de las IgG's purificadas (1 mg/mL), en los ensayos se incluyó un control experimental, la TPI de *Sus scrofa*. La mezcla de preincubación se hizo en un volumen final de 100 μL , en el cual está

incluida la enzima, los anticuerpos, BSA al 1% y amortiguador TED 10/1/1 (Trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM). La mezcla fue incubada a 37 °C durante 1 hora y después 30 ng fueron ensayados para determinar su actividad. Se utilizaron como controles negativos de la inhibición sueros antiM13KE (fago silvestre), normales de ratón o conejo e IgG's normales de conejo.

4.2.8 Selección de mimótopos

Dos placas con 8 pozos (Costar) fueron sensibilizadas con 100 µL las IgG's de conejo (100 µg/mL) en cada pozo diluidas en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.6 a 4°C por toda la noche en una cámara húmeda. Al día siguiente, fue retirado el exceso de anticuerpos y las placas fueron bloqueadas con una solución de BSA al 1% y Tween al 0.1% en TBS pH 7.5 por 30 minutos en cámara húmeda con agitación. La solución bloqueadora fue descartada e inmediatamente se hicieron seis lavados con una solución de TBS-Tween al 0.01%. Se usaron 10 µL una biblioteca de péptidos de 12 aa. desplegados en el fago M13KE (PhD12, New England Biolabs) que se diluyeron 1:160 con TBS pH 7.5. Se adicionaron 100 µL en cada pozo y las placas se incubaron en cámara húmeda con agitación durante 1 h. El exceso de fagos fue recuperado y las placas se lavaron 6 veces con una solución de TBS-Tween al 0.05%. Se preparó una solución de trietilamina 100 mM (Sigma) para hacer la elución de los fagos, para ello se colocaron 100 µL de la solución en cada pozo e incubando en una cámara húmeda con agitación por 20 minutos. Al término de la incubación, se recuperó el volumen total de la elución (800 µL de cada placa) y se neutralizó con 400 µL de una solución de Tris-HCl 1 M pH 8.0. Los fagos recuperados en esta ronda fueron amplificados y titulados. Posteriormente, se realizó una segunda y tercera ronda de selección, pero utilizando 10¹¹ fagos por pozo y utilizando una solución de lavado de TBS-Tween al 0.1% y 0.2 % respectivamente.

4.2.9 Selección de clonas de fagos

Después de realizar la tercera ronda de selección, los fagos se reamplificaron y titularon siguiendo el procedimiento previamente descrito, pero con una ligera variante que permitió seleccionar las clonas de fagos que tienen inserto. Antes de sembrar las bacterias con los fagos se adicionaron 200 μ L de una solución de IPTG 200 mM (Invitrogen)/X-gal 100 mM (Invitrogen) en dimetilformamida (Sigma). Las clonas que tienen inserto llevan a cabo un proceso denominado α -complementación,⁹³ y se muestran azules debido a la hidrólisis de X-gal. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se recuperaron las clonas azules y se almacenaron en 100 μ L de TBS pH 7.5 a 4°C.

4.2.10 Preparación del ADN de fagos para secuencia

Para la preparación de los templados se usó 1.1 mL del amplificado de fagos y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante (1 mL) se transfiere a un tubo nuevo, al cual se le adicionaron 300 μ L de una solución de PEG 20%/ NaCl 2.5 M y se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los fagos fueron recuperados centrifugando a 14,000 rpm por 10 min y descartando el sobrenadante. Los fagos precipitados se resuspendieron en 100 μ L de TE y un volumen igual de fenol saturado con TE (Gibco/BRL) fue utilizado para extraer el ADN, la mezcla se agitó fuertemente, se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos. Se recuperó la fase acuosa y un volumen igual de cloroformo fue adicionado (100 μ L), la mezcla se agitó, se centrifugó como antes y se recuperó la fase acuosa, este paso se repitió una vez más para retirar las impurezas del ADN del fago. La fase acuosa con el ADN del fago se concentró por precipitación usando 10 μ L acetato de sodio 3M y 250 μ L de etanol absoluto y congelando a -70 °C durante toda la noche. El ADN fue obtenido por centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos, la cual permitió obtener un botón con el ADN, que posteriormente fue resuspendido en 25 μ L de TE. Con el propósito de determinar la pureza y

concentración del templado, 1 μL del ADNcs fue corrido en un gel de agarosa al 1.5% con TAE y teñido con bromuro de etidio.

4.2.11 Determinación de la secuencia del ADN de fagos

La secuenciación del ADN de los fagos se hizo manualmente acorde al procedimiento descrito por Sanger, para lo cual se utilizaron los reactivos del estuche de secuencia Secuensa versión 2.0 (USB Co.) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para cada muestra de ADNcs se hizo lo siguiente: 4 tubos eppendorf de 0.6 mL se rotularon con las letras A, C, G y T respectivamente y se les adicionaron 2.5 μL de la mezcla nucleótidos conteniendo el dideoxinucleótido trifosfatado correspondiente (terminador: ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP).

Alineación: En un tubo eppendorf de 1 mL se colocaron 5 μL del ADNcs (1 μg), 2 μL de H_2O , 2 μL del amortiguador de la Secuensa y 1 pmol del oligonucleótido -28 pIII (5'-GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C-3'), dicha mezcla fue incubada a 65°C durante 2 minutos, posteriormente se dejó enfriar gradualmente hasta alcanzar la temperatura de 35°C, se pasó a hielo.

La mezcla de marcaje (labeling mix) fue diluida 1:5 en H_2O , asimismo, la T7 Polimerasa fue diluida 1:8 con amortiguador de dilución (T7 dilution buffer) y se mantuvo en hielo hasta su utilización. La Mezcla maestra se preparó con: 1 μL de DTT, 2 μL de la mezcla de marcaje (1:5), 0.5 μL de la marca radiactiva $\alpha^{32}\text{S}$ [dATP] (Amersham Biosciences) y 2 μL de la T7 sequenasa por diluida. A cada tubo del paso 2, les fueron adicionados 5.5 μL de la mezcla maestra, y fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Entonces 3.8 μL de esta mezcla fueron adicionados a los tubos del paso 1 y estos se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, la reacción fue detenida con la solución de paro, la cual contiene formamida y dos marcadores de corrida, el azul de bromofenol y el cianol xileno. Los tubos fueron mantenidos a -20 °C hasta su uso. Las reacciones se cargaron siguiendo el orden A, C, G y T en un gel de acrilamida al 6 % (*ver Anexo*) en una cámara

para electroforesis de secuencia (Life Technologies). La electroforesis se realizó a 2100 V y a 60 W durante 3 horas aproximadamente, tiempo necesario para que el azul de bromofenol migre a la mitad del gel y el cianol xileno a $\frac{1}{4}$ del gel (corrida corta). Al término de la electroforesis, los geles fueron fijados en una solución de ácido acético y metanol al 10 % y secados a 45 °C toda la noche. La exposición del gel se hizo en placas para rayos X Omat (Kodak) a -70 °C durante 2 días. Posteriormente, las placas se revelaron con Dektol (Kodak) y finalmente las secuencias nucleotídicas fueron leídas y analizadas con el programa informático PC/GENE.

4.2.12 Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

La especificidad y título de los sueros se evaluó mediante un método inmunoenzimático en placa (ELISA). Para esto se sensibilizó una placa de 96 pozos (Maxisorb, Nunc) con 100 μ L de la proteína a estudiar a una concentración de 1 μ g/mL en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 durante toda la noche a 4 °C. La placa se lavó 5 veces con 200 μ L por pozo de PBS-Tween al 0.05 % y fue bloqueada con una solución de BSA al 1 % en PBS-Tween al 0.05 % a 37 °C durante 30 minutos. Se efectuaron cinco lavados como antes y se adicionaron los sueros de ratón o conejo diluidos 1:50 y 1:500 en PBS-Tween 0.05% y se incubó la placa a 37 °C durante 1 hora. Se efectuaron cinco lavados, se adicionaron 100 μ L de un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG ratón o conejo acoplados a peroxidasa (Life Technologies) a una dilución 1:2000, e incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se hicieron los lavados correspondientes, se agregó el sustrato o-fenilendiamina (Sigma) al 0.04 % en fosfato de sodio 26 mM, ácido cítrico 25 mM y H₂O₂ 0.45 %, y después de 15 minutos la reacción fue detenida con ácido sulfúrico al 5 %. La placa se leyó a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplacas (modelo 550, BioRad).

5. RESULTADOS

5.1 Inhibición de la Triosafosfato isomerasa por anticuerpos

Basándonos en los antecedentes de que el suero contra la TTPI inhibe la actividad de la enzima,⁹⁶ en esta tesis se purificaron las IgG's a partir de los sueros anti-TTPI y se obtuvieron anticuerpos específicos anti-TTPI., con la finalidad de conocer si esta molécula es la responsable de la inhibición. La *Figura 11*, muestra que las IgG's anti-TTPI inhiben un 60%, mientras que los anticuerpos específicos sólo un 30%, respecto a un control que sólo contenía a la enzima (100% de actividad) y un control negativo, en el cual se hizo la preincubación de la enzima con IgG's normales de conejo. Asimismo, se incluyó un control del experimento, una TPI de *Sus scrofa* (cerdo), la cual solo sufrió una ligera disminución de actividad con las IgG's anti-TTPI y no con las IgG's normales ni con los anticuerpos específicos.

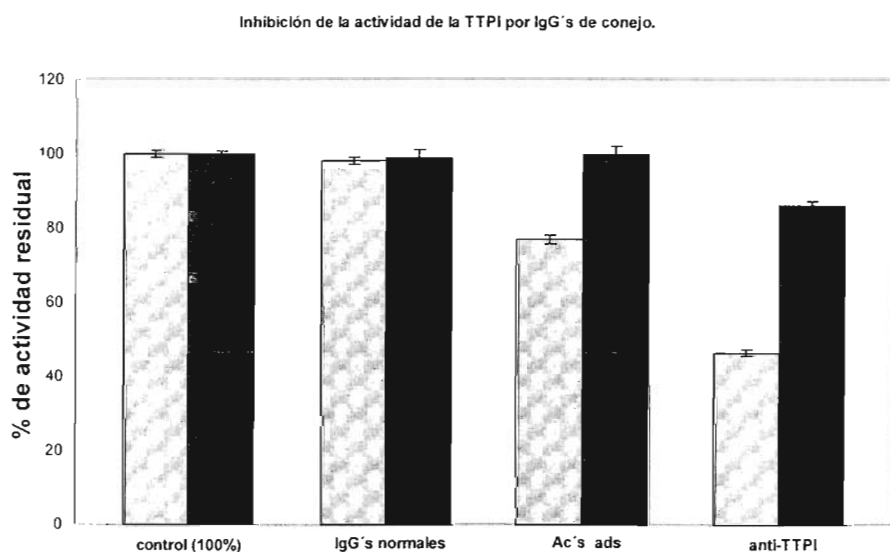


Figura 11 Ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI con IgG's y anticuerpos específicos anti-TTPI. Las barras claras corresponden a la TPI de *Taenia solium* y las oscuras a la de *Sus scrofa*.

5.1.1 Inmunoelectrotransferencia de la TTPI con sueros de ratón

En el laboratorio ya se había hecho una selección de clonas de fagos conteniendo mimótopos con suero hiperinmune anti-TTPI. Estas clonas se utilizaron para producir antisueros contra cada uno de los mimótopos (Ts1, Ts6, Ts11, Ts13, Ts15, Ts16) de la *Tabla I*. Los antisueros (Ts1, Ts6, Ts11, Ts13, Ts15, Ts16) hechos en ratón fueron evaluados por medio de una inmunoelectrotransferencia con la TTPI. En la *Figura 12* se observa que los seis sueros antimimótopos reconocen a la TTPI, en contraste el suero normal de ratón y el suero antiM13KE no reconocen a la TTPI. El control positivo (carril 1) suero hiperinmune de ratón anti TTPI reconoce a la enzima.

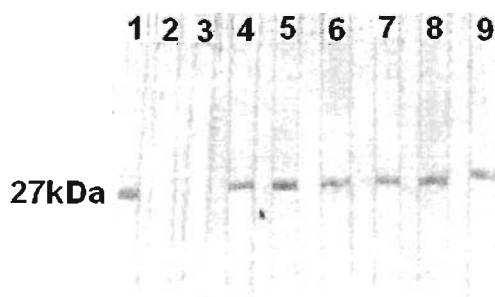


Figura 12. Inmunoelectrotransferencia de los sueros de ratón antimimótopos frente a la TTPI. 1) hiperinmune de ratón anti-TTPI (control positivo), 2) normal de ratón,, 3) anti-M13KE, 4) antiTs1, 5) antiTs6,6) antiTs11,7) antiTs13, 8) antiTs15 y 9) antiTs16. Los sueros fueron diluidos 1:10.

5.1.2 Ensayos de actividad de la TTPI con sueros de ratón antimimótopos

Habiendo demostrado que los sueros antimimótopos reconocían a la TTPI, se hizo el ensayo de la actividad con estos sueros. En la *Figura 13* se observa que ninguno de los sueros antimimótopos abate la actividad de la enzima TTPI, en contraste tres de ellos la aumentan como el antiTs6 un 20

%, el antiTs15 un 35 % y el antiTs16 un 27 %. Al realizar el mismo ensayo con los sueros antiTs15 y antiTs16 simultáneos se encontró un valor de aumento de la actividad muy cercano al que se obtuvo con Ts15 solo. Otro hecho importante que puede observarse en la figura es que el suero hiperinmune de ratón dirigido contra la enzima no disminuye su actividad más allá del 11 %, contrario a lo observado en el suero de conejo que fue de 60%. Los sueros, normal y anti-M13KE no modificaron la actividad de la enzima.

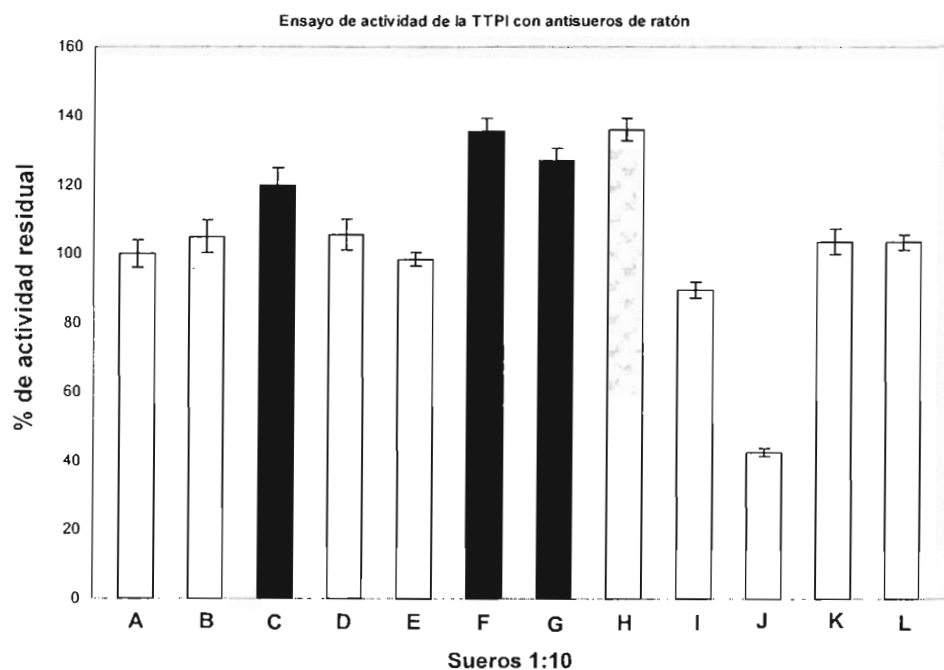


Figura 13. Gráfico de actividad de la TTPI con los distintos antisueros de ratón, A) control del 100% de actividad, B) antiTs1, C) antiTs6, D) antiTs11, E) antiTs13, F) antiTs15, G) antiTs16, H) antiTs15 + antiTs16, I) anti-TTPI de ratón, J) anti-TTPI de conejo, K) anti-M13KE y L) suero normal de ratón. Las barras oscuras corresponden a los sueros que más aumentaron la actividad.

5.1.3 Inmunoelectrotransferencia de la TTPI con sueros de conejo

Con los antecedentes del experimento realizado con los antisueros de ratón que aumentaron la actividad de la enzima, se escogieron los tres fagos con los mimótopos que más aumentaron la actividad y con ellos se inmunizaron conejos. Se obtuvieron antisueros contra los mimótopos TS6, Ts15 y TS16. En la *Figura 14* se muestran los antisueros de conejo (Ts6, Ts15 y Ts16) diluidos 1:500 y enfrentados a la TTPI por medio de una inmunoelectrotransferencia. Se observó que los tres sueros antimimótopos reconocen a la enzima, al igual que el suero hiperinmune antiTTPI, en contraste, el suero normal y antiM13KE no la reconocieron.

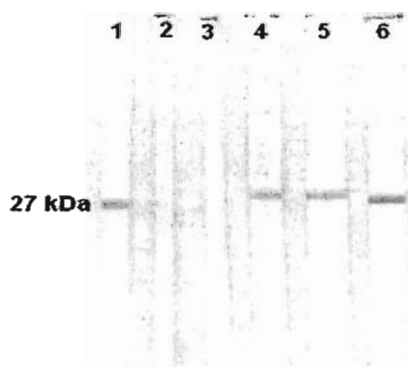


Figura 14. Inmunoelectrotransferencia con sueros de conejo antimimótopos. 1) hiperinmune anti-TTPI (control positivo), 2) normal de conejo, 3) antiM13KE 4) antiTs6, 5) antiTs15, y 6) antiTs16. Todos los sueros fueron diluidos 1:500.

5.1.4 Ensayos de actividad de la TTPI con sueros e IgG's de conejo

Se realizó un ensayo de actividad de la TTPI con los sueros e IgG's de conejo antimimótopos de Ts6, Ts15 y Ts16, manteniendo las mismas condiciones a los realizados con los sueros antimimótopos de ratón. Como muestra la *Figura 15* se observa la misma tendencia a lo encontrado en ratón, un aumento de la actividad, aunque los valores son ligeramente más bajos, el aumento fue de 10%, 29% y 21 % para antiTs6, antiTs15 y antiTs16, respectivamente. Este

experimento también se realizó con IgG's purificadas de cada suero antimimótopos (Ts6, Ts15, Ts16) usando una dilución 1:10 de las IgG's (1 mg/mL). No se encontró una variación significativa respecto a lo encontrado en los sueros.

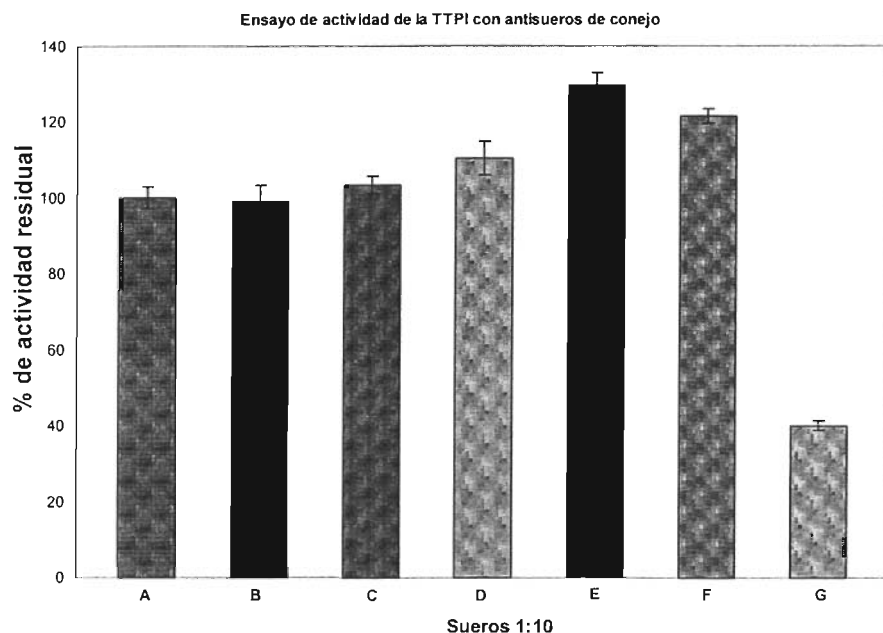


Figura 15. Ensayo de actividad de la TTPI con sueros de conejo, A) Sin suero (control del 100% de actividad). B) normal de conejo, C) antiM13KE, D) antiTs6, E) antiTs15, F) antiTs16 y G) hiperinmune antiTTPI

5.2 Identificación y caracterización parcial de mimótopos de las isoformas de GST_{25.5} y GST_{26.5}

Utilizando la técnica de selección de fagos con anticuerpos policlonales antiGST_{25.5} y antiGST_{26.5}, se aislaron e identificaron las secuencias peptídicas de los mimótopos para cada una de las isoformas de estas GSTs. En la *Figura 16* se resumen las secuencias encontradas para cada

isoforma. Un análisis de la estructura primaria de las clonas de los mimótopos encontrados, determinó que en ninguno de ellos hay correspondencia.

GST _{25.5}	GST _{26.5}
251: IPNNSTDPAAALHA	271: QHNPLELHHTTL
253: NAHLQSDALP-T	272: IDTRVPWSTMQM
254: DARIVSPHTY-T	273: IHAALMPLTTLT
256: YAESVRRPVTDL	274: AINAHSIT-AAT
257: WGQTLAASSRE	275: TLNWTPGQQPEP
2512: STTTSGLSRSAI	278: TSPLSEELLAL

Figura 16. Secuencias de mimótopos aislados. Nótese que las clonas 253, 254 y 274, tienen una línea, lo cual representa el único codón de termino que hay en la biblioteca (TAG), pero la cepa bacteriana en la que fue replicada decodifica este codón como una Glutamina (Q) para darle continuidad a la traducción.

Obtenidos los mimótopos, se produjeron sueros antimimótopos contra cada uno de ellos y se evaluaron mediante un ELISA. Se escogió este método debido a su alta sensibilidad y a que los sueros antimimótopos no lograron detectar a las GSTs en ensayos de inmunoelectrotransferencia. En la *Figura 17* podemos observar que los seis sueros antimimótopos de la isoforma de 25.5 kDa reconocen muy bien a la fracción nativa que contiene a ambas isoformas, por otra parte, sólo cuatro de los sueros antimimótopos contra la isoforma de 26.5 kDa tuvieron un buen reconocimiento, no así los antimimótopos 273 y 278 que muestran valores muy bajos (no hay diferencia estadística) al compararlos con los controles negativos (suero normal y antiM13KE de ratón).

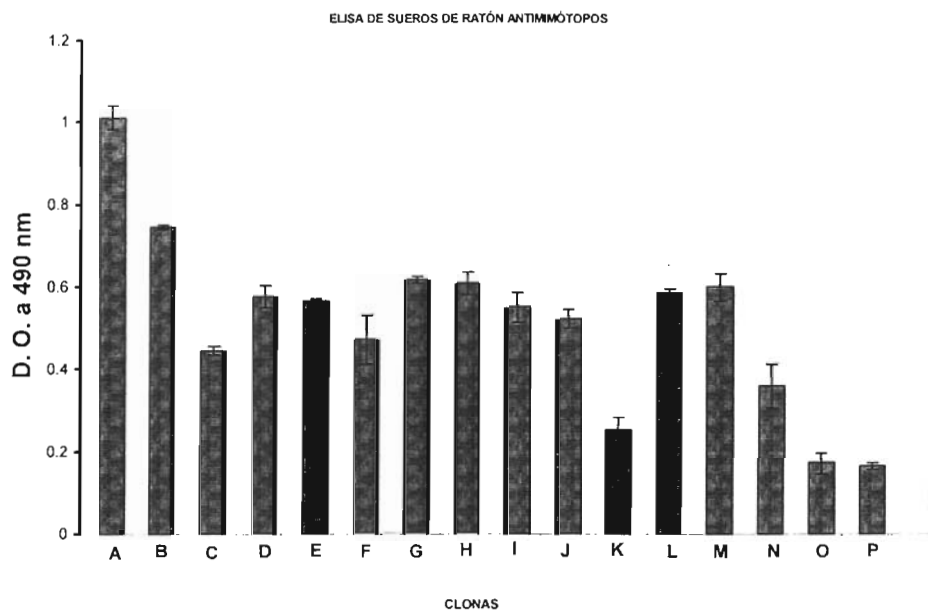


Figura 17. Inmunodetección de los sueros antimimótopos de las dos isoformas de la GST por ELISA utilizando una FGST. A) suero hiperinmune de conejo anti-FGST, B) suero de hiperinmune de ratón anti-FGST, C) anti251, D) anti253, E) anti254, F) anti256, G) anti257, H) anti2512, I) anti271, J) anti272, K) anti273, L) anti274, M) anti275, N) anti278, O) antiM13KE y P) suero normal de ratón..

6. DISCUSIÓN

La tecnología de despliegue en fagos ha adquirido gran relevancia en todas las áreas de la Biología, ya que es una herramienta muy efectiva para la investigación, dado que ofrece grandes ventajas, tales como la especificidad y bajo costo. En adición, los anticuerpos son otra herramienta de primera necesidad, ya que permiten hacer estudios muy finos. En la actualidad, se construyen bibliotecas de péptidos aleatorios o proteínas en fagos usando oligonucleótidos sintéticos clonados en los genes que codifican para proteínas de la cápside del fago y que se expresan como fusión con las proteínas (pIII y pVIII) de la cápside del fago M13. Los péptidos en el fago tienen un alto potencial de mimetismo para los epítopes lineales, conformacionales o no proteicos. Diferentes ligandos pueden ser usados para seleccionar o aislar péptidos de estas bibliotecas mencionadas, como por ejemplo, el uso de anticuerpos específicos para seleccionar péptidos de un blanco particular. En el caso particular donde los péptidos seleccionados no se parecen al péptido natural, pero que son reconocidos por el ligando, son referidos como mimótopos.

En este trabajo se evaluó la capacidad de inhibición de anticuerpos dirigidos contra mimótopos de la TTPI, asimismo, con la ayuda de anticuerpos específicos contra las dos isoformas de la TGST, se identificaron y caracterizaron parcialmente mimótopos para cada una de ellas.

Un reporte previo que utilizó un suero hiperinmune de conejo anti-TTPI, mostró una efectiva disminución de la actividad de la enzima TTPI.⁹⁷ Para explicar si las inmunoglobulinas eran las responsables de este efecto, se purificó de este suero de conejo anti-TTPI la fracción IgG y se realizó un ensayo de inhibición de la actividad de la enzima. El resultado muestra que en efecto son las IgG's las responsables de la disminución de la actividad y no algún otro componente del suero (*Figura 11*). También se probaron anticuerpos específicos en contra de la enzima, éstos obtenidos por medio de una adsorción/elución con la TTPI. Estos anticuerpos específicos anti-TTPI también disminuyen la actividad de la enzima, aunque 30% menor que las IgG's anti-TTPI (*Figura 11*). Esta

diferencia puede ser debida a que estos anticuerpos específicos fueron obtenidos con una proteína desnaturalizada, y tal vez sólo reconocen epítopes lineales; por lo que la diferencia del 30% de la inhibición que producen las IgG's antiTTPI, podría corresponder a anticuerpos dirigidos contra epítopes conformacionales.

Con el conocimiento del resultado antes obtenido, se realizó el aislamiento de mimótopos de la TTPI utilizando la fracción IgG's antiTTPI. Se obtuvieron al final del tercer episodio de selección solo 6 fagos con los mimótopos (Ts1, Ts11, Ts13, Ts6, Ts15 y Ts16) y se prepararon suero antimimótopos en ratón.⁹⁷ Los ensayos de actividad con los sueros antimimótopos de ratón, mostraron que tres de ellos (Ts1, Ts11 y Ts13) no modificaban en lo más mínimo la actividad y los otros tres (Ts6, Ts15 y Ts16), contrario a lo que se esperaba, la aumentaron en un 20, 35 y 27 % respectivamente.

Para verificar este hallazgo, se prepararon sueros en conejo contra los 3 mimótopos que aumentaban la actividad de la TTPI (Ts6, Ts15 y Ts16) y se realizó un ensayo de actividad para la TTPI usando dichos sueros y la fracción IgG proveniente de éstos, el resultado fue similar aunque la inhibición fue ligeramente menor en los antisueros e IgG's del conejo. Asimismo, un ensayo en el que se probaron los sueros antiTs15 y antiTs16 en conjunto, la actividad no se vio aumentada más allá de los valores individuales, es decir, entre ellos no hay una sinergia.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad para la TTPI donde se usaron los sueros hiperinmunes de ratón antiTTPI que no disminuyen la actividad de la enzima (contrario a lo que se encontró con el suero de conejo antiTTPI que si la disminuye considerablemente), puede explicarse, debido a que la respuesta inmune en contra de la TTPI puede ser diferente en cada especie por el fondo genético, o a que la TTPI (antígeno) puede ser reconocida y procesada diferente por sus sistemas inmunológicos. Por lo que en este caso se sugiere que el ratón esté pasando por alto algunos epítopes importantes para la catálisis de la enzima.

Haciendo referencia a los tres mimótopos que generan anticuerpos que son capaces de aumentar la actividad de la TTPI (Ts6, Ts15 y Ts16), este hallazgo resulto muy interesante ya que esta enzima posee una de las más altas eficiencias catalíticas muy conservada a través de la evolución, cayendo casi en la perfección.⁹⁸ Explicaciones posibles a este resultado es que la unión del anticuerpo modifica la estructura de tal forma que aumenta la oportunidad de interacción entre el sitio catalítico y el sustrato. Algunos autores ya han reportado hallazgos de este tipo en donde los anticuerpos aumentan la actividad de enzimas recombinantes, el caso más drástico es el de una β -galactosidasa, en la que un anticuerpo específico aumenta su actividad en un 200 %.^{99, 100}

Esta enzima es esencial para los organismos, y las Tenias no son la excepción, ya que un ensayo de vacunación realizado con la TTPI en el modelo ratón-*T. crassiceps*, redujo la carga parasitaria en un 52 %.⁹⁷ Por otro lado, los anticuerpos juegan un papel importante en la protección contra la cisticercosis ya que los anticuerpos y complemento destruyen a los estadios oncosferales.¹⁰¹

La otra fase de este trabajo de tesis fue identificar mimótopos para dos isoformas de la TGST, una de 25.5 kDa y otra de 26.5 kDa, en ensayos de protección la segunda demostró ser la más efectiva (70% de protección), pero también se encontraron buenos resultados al administrar las dos en conjunto (> a 90% de protección),⁴⁸ y bajo esta premisa nos encausamos a buscar mimótopos para cada una. La selección se hizo con la fracción IgG's proveniente de sueros anti cada isoforma de GST, se aislaron 12 clonas para cada isoforma. El análisis de cada una de ellas, comparando con las secuencias primarias de las GSTs de *T. solium*, mostró que no tenían identidad con éstas, reforzando así su condición de mimótopos. Se produjeron anticuerpos contra cada uno de los mimótopos. Los anticuerpos antimimótopos de las GSTs no reconocieron a ninguna isoforma de la GST en los ensayos de inmunoelectrotransferencia, por lo que la inmunodetección se hizo por medio de un ELISA, usando como antígeno la fracción purificada de la TGST que contiene las 2 isoformas, se encontró que los seis sueros anti-mimótopos de la GST_{25.5} y sólo cuatro de los

antimimótopos de la GST_{26.3}, reconocen su isoforma en la fracción TGST. Puesto que ninguno de los sueros antimimótopos de ambas GSTs reconocieron a la enzima en IET, pero si en ELISA, este resultado sugiere que reconocen epítopes conformacionales.

Varios estudios han demostrado que los anticuerpos son efectivos inhibiendo enzimas, pero algunas veces presentan limitantes, ya que algunos epítopes se encuentran ocultos o impedidos para interaccionar con los anticuerpos. Por lo que se ha sugerido utilizar anticuerpos o fracciones de ellos para mejorar estas funciones de inhibición o activación de las enzimas.

Esta tesis y sus hallazgos en la activación e inhibición hecha por los anticuerpos sobre la TTPI, abre la posibilidad de utilizar a estas moléculas como herramientas para el estudio de los mecanismos de activación o inhibición de las enzimas en patógenos y sus hospederos, con el objetivo de diseñar moléculas o identificar regiones específicas para destruir su función y por ende al parásito, en este caso a la *T. solium*.

7. CONCLUSIONES

- Anticuerpos antiTTPI pueden aumentar o inhibir la actividad de la enzima.
- La propiedad de inhibición de los anticuerpos es dependiente de la especie que los produce.
- Se identificaron secuencias (mimótopos) importantes para la función catalítica de la TTPI.
- Los anticuerpos desarrollados contra ciertos mimótopos de la TPI aumentan la actividad de la enzima.
- Se identificaron mimótopos para dos isoformas de la GST.
- Los anticuerpos antimimótopos contra las isoformas de GST reconocen epítopes conformacionales.

8. ANEXOS

Preparación de soluciones.

PBS.

Para un litro:

NaCl	8 g.
KCl	0.2 g.
Na ₂ HPO ₄	1.44 g.
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar.

TE

Para un litro:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

PEG 20 %/NaCl 2.5 M

Para un litro:

Polietilenglicol 8000	200 g.
NaCl	146.1 g.

TBE.

Para un litro:

Tris-Base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	4 mL

TBS pH 7.5

Para un litro:

Tris-HCl	12.11 g
----------	---------

NaCl 5 M	60 mL
----------	-------

TED 10/1/1

Para 200 mL:

Trietanolamina	371 mg
----------------	--------

EDTA 0.5 M	400 μ L
------------	-------------

Ditiotreitol	31 mg
--------------	-------

TED 100/10/1

Para 200 mL:

Trietanolamina	3.71 g.
----------------	---------

EDTA 0.5 M	4 mL
------------	------

Ditiotreitol	31 mg.
--------------	--------

IPTG 200 mM/ X-gal 100 mM

Para 25 mL:

IPTG	1.25 g
------	--------

X-gal	1 g
-------	-----

Disolver en 25 mL de Dimetilformamida, proteger de la luz y almacenar a -20 °C.

Amortiguador para electroforesis de proteínas.

Para un litro:

Tris-Base	15.1 g.
-----------	---------

Glicina	94 g.
---------	-------

SDS 10 %	50 mL
----------	-------

Amortiguador para transferencia de proteínas.

Para un litro:

Tris-Base	3.08 g.
Glicina	14.48 g.
Metanol abs.	200 mL

Preparación de medios.

Medio LB

Para un litro:

Triptona	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
NaCl	10 g.

SOB

Para un litro:

Triptona	20 g.
Extracto de levadura	5 g.
NaCl	0.5 g.
KCl 250 mM	10 mL
Agar	15 g.
Sulfato de magnesio 2 M	5 mL

Para hacer medio Top SOB agregar 10.5 g

Medio mínimo (M9)

Para un litro:

Sales 5X M9	200 mL
Glucosa 20 %	20 mL

Sulfato de magnesio 1 M	2 mL
CaCl ₂ 1 M	0.1 mL

***Escherichia coli* cepa TG1.**

Genotipo: *supE hsd Δ 15 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15]*

Par inducir la formación del pili F debe ser cultivada en cajas de medio adicionado con vitamina B1 al 0.5 %.

Preparación de gel de acrilamida para electroforesis de proteínas (12.5 %)

Cantidades para dos geles:

Gel separador:

Mezclar perfectamente 4.2 mL de acrilamida 30 %/bis-acrilamida 0.8 %, 2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 2.4 mL de H₂O, 200 μ L de SDS 10 %, 66 μ L de persulfato de amonio 10 %, 6.6 μ L de Temed y cargar en los vidrios. Adicionar H₂O hasta el tope de los vidrios.

Gel concentrador:

Mezclar perfectamente 1.3 mL de acrilamida 30 %/bis-acrilamida 0.8 %, 1.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 2.7 mL de H₂O, 60 μ L de SDS 10 %, 20 μ L de persulfato de amonio 10 %, 3 μ L de TEMED y cargar encima del gel separador ya polimerizado. Colocar el peine.

Preparación de gel de secuencia (acrilamida 6 %).

Mezclar 33.75 g de urea, 18 mL de H₂O desionizada, 11.25 mL de acrilamida 40 %/bis-acrilamida 2 %, 13.5 mL de TBE 5X y 800 μ L de persulfato de amonio al 10 % con agitación hasta disolución total. Filtrar la solución a través de una membrana Millipore de 0.45 μ m. Agregar 8 μ L de TEMED, homogenizar bien la solución. Con ayuda de una jeringa, vaciar en los vidrios y colocar los peines. Se deja polimerizar toda la noche.

Preparación de gel de agarosa al 1.5 % + bromuro de etidio.

Para cuatro geles: Disolver 2.4 g de agarosa en 160 mL de TAE 1X, adicionar 36 μ L de bromuro de etidio, mezclar bien y verter en los moldes. Dejar solidificando a 4 °C.

Cuantificación de proteínas (Folin-fenol o Lowry).

La muestra deberá estar diluida en PBS 1X en un volumen final de 1 mL. Para la curva patrón se coloca 1 mL de la concentración correspondiente en cada tubo.

Solución Lowry:

Na_2CO_3 anhidro al 2 % e n NaOH 0.1M	9.8 mL
---	--------

Tartrato de sodio y potasio al 2 %	0.1 mL
------------------------------------	--------

Sulfato cúprico al 1 %	0.1 mL
------------------------	--------

Agregar 4 mL de solución Lowry a cada tubo, agitar e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Agregar 0.4 mL de reactivo Folin & Ciocalteu (Sigma) diluido 1:1 en agua, agitar e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Leer a una longitud de onda de 600 nm, el blanco es PBS 1X y la curva patrón es una dilución seriada de BSA iniciando con una concentración de 1000 μ g/mL.

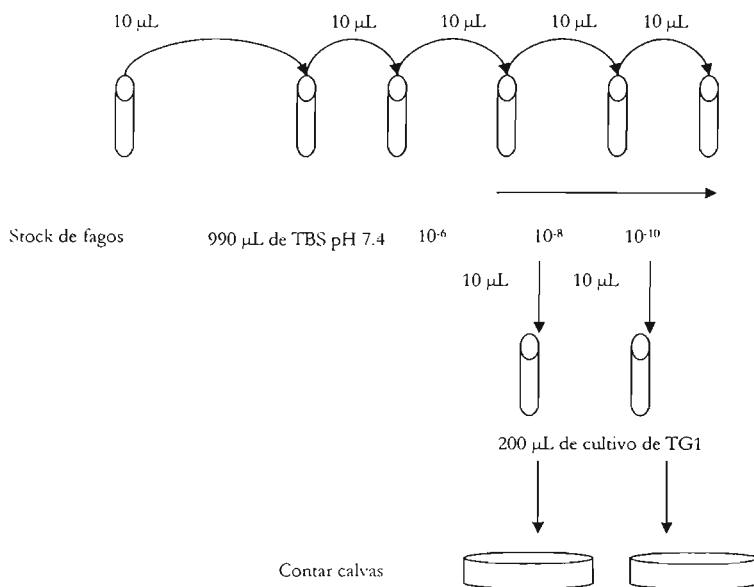
IET

1. Bloquear las tiras de la transferencia con 600 μ L de BLOTTO (leche descremada 10 % y NaN_3 0.2 %) en PBS-Tween 0.3 %. Incubar a temperatura ambiente y agitación durante 15 minutos.
2. Adicionar el suero a probar, haciendo los cálculos pertinentes para que la dilución sea la adecuada, generalmente se utiliza una dilución 1:500. Incubar durante 1 hora.
3. Hacer 3 lavados con PBS-Tween 0.3 % dando agitación de 5 minutos entre cada uno de ellos.

4. Adicionar 600 μL del 2do anticuerpo (dirigido contra el primero y acoplado a peroxidasa) diluido 1:2000 en PBS-Tween 0.3 %. Incubar 45 minutos. Al termino de la incubaci3n, hacer 3 lavados igual que en 3, y un 3ltimo s3lo con PBS 1X.

5. Adicionar 600 μL de una soluci3n reveladora de diaminobencidina 0.02 % y H_2O_2 0.001% en PBS 1X. Incubar de 3 a 5 minutos y parar la reacci3n con agua.

Diluci3n de fagos para titulaci3n y c3lculos para la obtenci3n del t3tulo.



C3lculo del t3tulo: $\# \text{ de calvas} \times 100 \times (\text{diluci3n})^{-1} = \text{pfu/ mL}$

REFERENCIAS

- ¹ Alarcón G (ed), et al. (1999). Cisticercosis del Sistema Nervioso, Instituto Ecuatoriano de Salud Pública y Universidad de Guayaquil, Ecuador. pp 21-26.
- ² Schantz PM, Moore AC, Munoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A (1992). Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City, N. England J. Md.; 327:672-675.
- ³ Wallin MT, Kurtzke JF (2004). Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. Neurology; 63(9):1559-1564.
- ⁴ Gimenez-Roldan S, Diaz F, Esquivel A (2003). Neurocysticercosis and immigration. Neurologia; 18(7):385-388.
- ⁵ Flisser A, Madrazo I, Delgado H (1997). Cisticercosis Humana. Manual Moderno, México, D.F. pp. 5-64.
- ⁶ Roberts L, Janovy J (2000). Foundations of Parasitology, McGraw Hill, Boston. pp 299-323.
- ⁷ Sciutto E, Frago G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Microbes and infection; 2:1875-1890.
- ⁸ Webbe G (1994). Human Cysticercosis: Parasitology, Pathology, clinical manifestations and available treatment. Pharm. Ther; 64:175-200.
- ⁹ Salazar-Schettino MP, de Haro-Arteaga I (1990). Biología del binomio teniasis-cisticercosis. Bol Chil Parasitol.; 45(3-4):73-6.
- ¹⁰ Rabiela MT, Rivas A, Flisser A (1989). Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol. Today; 5 (11): 357-359.
- ¹¹ Grau E, Garrido F, Cañedo L (1982). Calcification of the cysticerci of *Taenia solium* in the human brain. En: A Flisser, K Willms, JP Laclette, C Larralde, C Ridaura; F Beltrán (eds.). Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York, pp. 499-516.
- ¹² Rabiela-Cervantes MT (1989). Patología de la neurocisticercosis benigna y grave. En: A Flisser, F Malagón (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, Mexico, D.F. pp. 107-124.
- ¹³ Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: A Flisser, K Willms, JP Laclette, C Larralde, C Ridaura; F Beltrán (eds.). Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York, pp. 375-388.
- ¹⁴ Beaver P. C., et al. (2003). Parasitología Clínica de Craig Faust, 3a ed., Editorial Masson Doyma, México.
- ¹⁵ Reuter M, Mantyla K, Gustafsson MK (1998). Organization of the Orthogon- main and minor nerve cords. Hydrobiologia; 383: 175-182.
- ¹⁶ Gustafsson MK, Halton DW, Kreshchenko ND, Movsessian SO, Raikova OI, Reuter M, Terenina NB (2002). Neuropeptides in flatworms. Peptides; 23: 2053-2061.
- ¹⁷ Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez H, Correa-Piña D, González-Malerva L, Cruz-Rivera M, Flisser A (2003). Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. Cell Biology International; 27: 727-733
- ¹⁸ Willms K, Robert L, Caro JA (2003). Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. Parasitol Res; 89: 308-316.
- ¹⁹ Flisser A, Plancarte A, Correa D (1991). *Taenia solium* cysticercosis: a review. Research and Reviews in Parasitology; 51 (1-4): 17-23.
- ²⁰ López-Cepeda L, Proaño J, Ambrosio J, Ávila-Ramírez G, Flisser A () Estudio de individuos con teniosis y su relación con enfermos con neurocisticercosis.
- ²¹ Rabiela MT, Ornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del-Rosal E, Flisser A (2000). Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. Arch Med Res.; 31(6):605-607.
- ²² Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K (1998). *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. J Parasitol.; 84(4):681-685.
- ²³ Fan PC, Ma YX, Kuo CH, Chung WC (1998). Survival of *Taenia solium* cysticerci in carcasses of pigs kept at 4 C. J Parasitol.; 84(1):174-175.
- ²⁴ García H, González A, Evans C, Gilman R (2003). Cysticercosis. The Lancet; 361: 547-556.
- ²⁵ Tay-Zavala J (ed) (1992). Microbiología y Parasitología Médicas. Méndez Editores. México 2003. 541-542.

- ²⁶ Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J (1990). Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Inter Med*; 150: 325-327.
- ²⁷ Cárdenas F, Quiroz H, Meza A, Plancarte A, Dalma A, Flisser A (1989). Cisticercosis intraocular. En: A Flisser, F Malagón (eds.). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa-Noriega, Mexico, D.F. pp. 107-124.
- ²⁸ Cárdenas F, Plancarte A, Quiroz H, Rabiela MT, Gómez-Leal A, Correa D, Flisser A (1989). *Taenia crassiceps*: experimental model of intraocular cisticercosis. *Experimental Parasitology*; 69: 324-329.
- ²⁹ Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodezky C, Flisser A (1985). Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J Parasitol.*; 71(5):535-541.
- ³⁰ Mandujano A, Vela M, Alcántara P, Correa D (1990). Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium* cysticerci. Abstracts VII International Congress Parasitology. Bulletin de la Société Française de Parasitologie, 8, suppl. 1:578.
- ³¹ White AC Jr, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA. (1992). Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacystode proteases. *J Parasitol.*;78(2):281-287.
- ³² Landa A, Lacleite JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB (1993). cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol.*;60(2):343-347.
- ³³ Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L (1987). Parasite defense mechanism for evasion of host attack: a review. *Vet. Parasitol.*; 25: 147-162.
- ³⁴ Leid RW, Grant RF, Suquet CM (1987). Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol.*;17(7):1349-1353.
- ³⁵ White AC Jr, Robinson P, Kuhn R (1997). *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol.*;66:209-230.
- ³⁶ Tato P, Castro AM, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL (1995). Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacystode. *Parasitol Res.*; 81(3):181-187.
- ³⁷ Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P (1998). A *Taenia solium* metacystode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol. Res.*; 84: 117-122.
- ³⁸ Molinari JL, Mejía H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P (2000). *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacystodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol.*; 94(3):133-142.
- ³⁹ Tato P, Fernandez AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepulveda J, Molinari JL (2004). A cysteine protease from *Taenia solium* metacystodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res.*;92(3):197-204.
- ⁴⁰ García-Castellanos A, Jiménez L, Landa A (2002). Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol.*;32: 1175-1182.
- ⁴¹ Vibanco-Pérez N, Jiménez L, Merchant MT, Landa A (1999). Characterization of a glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.*; 85(3): 448-453.
- ⁴² Vibanco-Pérez N, Jiménez L, Mendoza-Hernández G, Landa A (2002). Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.*; 88: 389-404.
- ⁴³ Plancarte A, Rendón JL, Landa A (2002). Purificación, caracterización and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol. Res.*;93: 137-144.
- ⁴⁴ Allan JC, Avila G, García Noval J, Flisser A, Craig PS (1990). Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*; 101(3):473-477.
- ⁴⁵ Allan JC, Mencos F, García-Noval J, Sarti E, Flisser A, Wang Y, Liu D, Craig PS (1993). Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. *Parasitology*;107 (Pt 1):79-85.
- ⁴⁶ Gonzalez LM, Montero E, Harrison LJ, Parkhouse RM, Garate T (2000). Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *J Clin Microbiol*; 38: 737-744.
- ⁴⁷ Min Z, et al. (2004). Characterization, cloning, and expresión of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. *J. Parasitol.*; 90(3): 631-638.
- ⁴⁸ Wilkins PP, Allan JC, Verastegui M, Acosta M, Eason AG, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VC (1999). Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg.*60(2):199-204.
- ⁴⁹ Espinoza B, et al. (1986). Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.*; 24: 536-541.
- ⁵⁰ Olivo A, Plancarte A, Flisser A (1988). Presence de antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminths. *Int. J. Parasitol.*; 18: 543-545.
- ⁵¹ Tsang V, Brand AJ, Boyer AE (1989). An enzyme immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human *Taenia solium* cysticercosis. *J. Infect. Dis.* ; 159: 50-59.

- ⁵² Ryan M, et al. (2000). *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18- kDa related, diagnostic antigens. J. Parasitol.; 86(5): 1001-1007.
- ⁵³ Harrison L, Delgado J, Parkhouse RM (1988). DNA probes in the differentiation of human taenia saginata and Taenia solium infection. Roy. Soc. Trop. Med. And Hyg.; 82: 939.
- ⁵⁴ Escobedo F (1989). Tratamiento de Cisticercosis/Taeniasis humana. En: A Flisser, F Malagón (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, Mexico, D.F. pp. 199-204.
- ⁵⁵ Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A (2000). Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Trans R Soc Trop Med Hyg.; 94(1):85-89.
- ⁵⁶ Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P (1997). Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am J Trop Med Hyg.; 56(2):127-32.
- ⁵⁷ Sarti E, Rajshekhar V (2003). Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. Acta Tropica; 87: 137-143.
- ⁵⁸ Lightowlers MW (1999). Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. Int J Parasitol.; 29(6):811-7.
- ⁵⁹ Flisser A, Lightowlers MW (2001). Vaccination against *Taenia solium* Cysticercosis. Mem Inst Oswaldo Cruz; 96(3): 353-356.
- ⁶⁰ Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowlers MW (1999). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. Int J Parasitol.; 29(4):643-7.
- ⁶¹ Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A, Garcia HH, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Arana Y, Tsang VC (2002). *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. Vet Parasitol.; 108(1):49-62.
- ⁶² Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, A rechavaleta F, Solano S (1997). Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. Vet Parasitol.; 69(1-2):55-63.
- ⁶³ Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A (1993). Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. Am J Trop Med Hyg.; 49(4):502-512.
- ⁶⁴ Kumar D, Gaur S, Pathak M (1987). Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and second peaks of *cysticercus cellulosae* scolex antigen. Indian J Anim Sci 57: 932-935.
- ⁶⁵ Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA (1995). Effective immune protection of pigs against cysticercosis. Vet Immunol Immunopathol.; 45(1-2):127-37.
- ⁶⁶ Pathak K, Gaur S (1990). Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. Vet Parasitol.; 34: 353-356.
- ⁶⁷ Sciutto E, et al. (1995). Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. Vet Parasitol.; 60(1-2):53-67.
- ⁶⁸ Flisser A, et al. (2004). Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. Infect Immun.; 72(9):5292-7.
- ⁶⁹ Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E (1996). Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. J Parasitol.; 82(2):250-4.
- ⁷⁰ Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciutto E. (1996). Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. Immunol Lett.; 49(3):185-9.
- ⁷¹ Huerta M, et al. (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. Vaccine.; 20(1-2):262-266.
- ⁷² Guo Y J, et al. (2004). Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. Vaccine; 22(29-30):3841-3847.
- ⁷³ Wang QM, Sun SH, Hu ZL, Wu D, Wang ZC (2003). Immune response and protection elicited by DNA immunisation against *Taenia* cysticercosis. Vaccine; 21(15):1672-1680.
- ⁷⁴ Voet D, Voet J (1990). Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 458-476.
- ⁷⁵ Oppendoerfer F. et al. (2001). Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. Int. J. Parasitol.; 31: 482-490.
- ⁷⁶ Stryer L (1995). Bioquímica. 4ta ed. Editorial Reverté. España. pp. 487-488.
- ⁷⁷ Kallenbach N (2001). Breaking open a protein barrel. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.; 98(6):2958-2960.
- ⁷⁸ Derreumaux P, Schlick T (1998). The loop opening/closing motion of the enzyme Triosephosphate Isomerase. Biophysical J.; 74: 72-81.

- ⁷⁹ Shoemaker C. et. al. (1992). cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 89: 1842-1846.
- ⁸⁰ Ham D. et. al. (1992). A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. J. Immunol.; 148: 5562-5567.
- ⁸¹ Kuntz, D. et. al. (1992). Inhibition of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with cyclic hexapeptides. Eur. J. Biochem.; 07:441-447.
- ⁸² Singh, S. et. al. (2001). Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. FEBS Letters;501:19-23.
- ⁸³ Rodríguez-Romero A, et. al. (2002). Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. J. Mol. Biol.; 322: 669-675
- ⁸⁴ Joubert F, et al. (2001). Structure-Based Inhibitor Screening: A Family of Sulfonated Dye Inhibitors for Malaria Parasite Triosephosphate Isomerase. PROTEINS; 45:136-143 (2001)
- ⁸⁵ Tellez-Valencia A, et al. (2004). Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. J. Mol. Biol.; 341, 1355-1365.
- ⁸⁶ Jiménez L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, Landa A (2000). Cloning, expresión and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. Int. J. Parasitol.; 30: 1007-1012.
- ⁸⁷ Tracy JW, Vande Waa EA, (1995). Xenobiotic Metabolism. En: Marr J. J, Muller M, Marr J (eds). Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Academic Press Ltd. New York, 161-174.
- ⁸⁸ Sheenan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J;360:1-16
- ⁸⁹ Eaton DL, Bammler TK (1999). Concise review of the Glutathione S-Transferases and their significance to Toxicology. Toxicological Sciences; 49: 156-154.
- ⁹⁰ van Bladeren PJ (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. Chemico-Biological Interactions; 129: 61-76.
- ⁹¹ Smith G. P, Petrenko V (1997). Phage Display. Chem. Rev.; 97: 391-410
- ⁹² Stricker N, Li M (2001). Phage Display Technologies. Encyclopedia of Life Sciences/ Nature Publishing Group: 1-5.
- ⁹³ Azzazy H. M, Highsmith E (2002). Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. Clin. Biochem; 35:425-445.
- ⁹⁴ Kakuturu V., Rao Y, Ramaswamy K (2003). Expression of a 28-Kilodalton Glutathione S-Transferase Antigen of *Schistosoma mansoni* on the Surface of Filamentous Phages. Clin. & Diagnos. Lab. Immunol.; 10(4): 536-541.
- ⁹⁵ Twyman R. M. (1998). Advanced Molecular Biology. BIOS Scientific Pub. New York, 330.
- ⁹⁶ Jimenez L, Fernandez-Velasco DA, Willms K, Landa A (2003). A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. J Parasitol.;89(2):209-214.
- ⁹⁷ Herrera M. (2005). Identificación de mimótopos de la Triosafosfato isomerasa (TPI) de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- ⁹⁸ Knowles JR (1991). Enzyme catalysis: not different, just better. Nature; 350: 121-124.
- ⁹⁹ Benito A, Feliu JX, Villaverde A (1996). Beta-galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. J Biol Chem.;271(35):21251-6.
- ¹⁰⁰ Shami EY, Ramjeesingh M, Rothstein A, Zywluko M (1991). Stabilization of enzymes by their specific antibodies. Enzyme Microb Technol.;13(5):424-429.
- ¹⁰¹ Williams JF (1979). Recent advances in the immunology of cestode infections. J Parasitol.;65(3):337-349.