



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ANTICUERPOS ESPECIFICOS: INHIBIDORES DE LA
ACTIVIDAD DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE
Taenia solium.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
IARASET BELMONT GUZMAN



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m. 340725



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: Profa. María Dolores Lastra Azpilicueta.

Vocal: Prof. Eleazar Martínez Barajas.

Secretario: Prof. Abraham Landa Piedra.

1er suplente: Profa. Herminia de Jesús Loza Tavera.

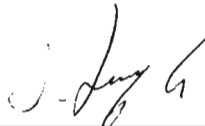
2do suplente: Prof. José Cordero Hernández.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 43806, "Desarrollo de inhibidores específicos contra *Taenia solium*", y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN210603, "Enzimas del metabolismo detoxificante blancos para el desarrollo de nuevos inhibidores contra *Taenia solium*".



Dr. Abraham Landa Piedra
Asesor del tema



Dra. Lucia Jiménez García
Supervisor técnico



Laraset Belmont Guzmán
Sustentante

DEDICATORIAS

A mis padres. Las palabras no son suficientes para agradecer todo su apoyo, entrega, paciencia y confianza, su singular cariño y respeto a mis ideas y decisiones; siempre estaré enormemente agradecida, con todo mi cariño este trabajo es suyo.

A mis abuelos. Por el gran ejemplo que son, por brindarme su cariño y estar a mi lado preocupándose e interesándose por mi bienestar, mil gracias los quiero y adoro.

A mis tías Caro, Yola y Fabiola. Porque en todo el transcurso de mi vida han sido consejeras, amigas y mucho más, por sus cuidados, infinito apoyo y cariño, mil gracias. Las quiero.

A mis hermanos. Mil gracias Itzel por estar siempre a mi lado, escucharme y ser mi mejor amiga. Carlos por tu apoyo y compañía gracias. Son correspondidos con todo cariño.

A mis tíos y primos. Por su cariño, por mostrarme lo importante que es la unión, por los gratos momentos y todo su apoyo gracias, son una familia maravillosa.

A Susi, Toño, Adriana, Ángel, Gisela, Jorge, Milet y Ale.

Quienes han plasmado en mi infinitas sonrisas, instantes maravillosos y mil enseñanzas, por estar siempre a mi lado y por todo lo que son gracias, los quiero, son la mejor parte de mi estancia en la Universidad.

A Yosh.

Por tu cariño, paciencia y apoyo, por permitirme descubrir los colores de la vida y hacer de ella algo sorprendente, por ayudarme a conocer y encontrarme gracias. Te quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Landa, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, consejos, y paciencia. Pero sobre todo por dejar que sus alumnos encuentren en usted un amigo. Enormemente agradecida, es usted un ser excepcional.

A la Dra. Lucía Jiménez por la enseñanza de las técnicas que hicieron posible este trabajo. A Alice por tu apoyo incondicional y por todas tus enseñanzas gracias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Alex, Anayetzin, Felipe, Gaby, Hugo, Isela, José, Martha, y Ricardo por hacer más grata la estancia en el laboratorio, por sus consejos y ayuda, gracias. A Víctor por tu apoyo incondicional, por permitirme conocer y dejarme acercar al maravilloso ser que eres, por plasmar en mi inigualables enseñanzas y vivencias mil gracias, te admiro.

A Charmina, Víctor, Néstor, Iván, Javier, David, Ana, Hugo, Memo (t), Chou, por compartir conmigo gratos momentos, por su inigualable amistad y compañía, gracias. A Alonso por siempre escucharme, enseñarme que existe gente en la que puedo confiar y encontrar una sorpresa, mil gracias.

A Sami, Bere y Rosa por los grandes e inolvidables momentos por todas las sonrisas, y su sincera amistad gracias, las quiero.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Clasificación de <i>Taenia solium</i>	11
2.2 Generalidades	11
2.3 Ciclo de vida	15
2.4 Manifestaciones clínicas	16
2.4.1 Teniosis	16
2.4.2 Cisticercosis	17
2.5 Epidemiología	17
2.5.1 Teniosis	18
2.5.2 Cisticercosis humana	18
2.5.3 Cisticercosis porcina	19
2.6 Diagnóstico	19
2.6.1 Teniosis	19
2.6.2 Cisticercosis	20
2.7 Tratamiento	21
2.7.1 Antihelmínticos	21
2.7.2 Antiepilépticos y corticosteroides	22
2.8 Prevención y control	23
2.9 Metabolismo energético: posible alternativa para el tratamiento y/o control de <i>Taenia solium</i> .	23
2.9.1 Glucólisis en <i>Taenia solium</i>	24
2.10 Triosafosfato isomerasa	24
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo General	29
4.2 Objetivos Particulares	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1 Reactivos	30

5.2 Materiales biológicos	30
5.3 Transformación	31
5.4 Expresión	31
5.5 Purificación de la TPI de <i>Taenia solium</i> (TTPI)	31
5.6 Cuantificación de proteína	32
5.7 Digestión	32
5.8 Purificación del primer tercio de la proteína (1/3NH ₂ de TTPI)	32
5.9 Producción de anticuerpos policlonales	33
5.10 Inmunodetección	33
5.11 Ensayo de inhibición	33
6. RESULTADOS	35
6.1 Producción de la TPI de <i>Taenia solium</i> (TTPI)	35
6.2 Digestión	36
6.3 Purificación del primer tercio de la proteína (1/3NH ₂ de TTPI)	37
6.4 Determinación de anticuerpos anti- 1/3NH ₂ de TTPI	38
6.5 Especificidad de los anticuerpos obtenidos	40
6.6 Inhibición por anticuerpos	41
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES	47
9. ANEXOS	48
10. REFERENCIAS	51

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ATP	Adenosina trifosfato
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
DO	Densidad óptica
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramos
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
hrs	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
IET	Inmunolectrotransferencia
IPTG	Isopropil tio-β-D-galactosidasa
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
TPI	Triosafosfato isomerasa
TTPI	Triosafosfato isomerasa de <i>Taenia solium</i>

RESUMEN

Dado que la cisticercosis y teniosis, causadas por el cestodo *Taenia solium*, representan un problema económico y de salud pública en México y otros países en vías de desarrollo; varios estudios se han enfocado en romper el ciclo del parásito, evitando así la propagación del mismo. Una alternativa viable es la inhibición de enzimas esenciales en el metabolismo energético del parásito, como la Triosafosfato isomerasa (TPI).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar anticuerpos como inhibidores de TPI de *T. solium* (TTPI), además de demostrar su especificidad. Para ello se produjo una TTPI recombinante fusionada a cola de histidinas en la bacteria *Escherichia coli* BL21. Esta TTPI se purificó por cromatografía de afinidad y se sometió a digestiones con la proteasa V8 de *S. aureus*, generando un fragmento correspondiente al primer tercio de la enzima (1/3NH₂ de TTPI) que fue purificado por el mismo procedimiento cromatográfico, dicho fragmento es poco conservado en las TPIs. Con la TTPI completa y el fragmento antes mencionado se generaron sueros anti-TTPI y anti-1/3NH₂TTPI.

El suero anti-TTPI inhibió la actividad de la enzima en 81% y 62% y el suero anti-1/3NH₂TTPI inhibió en 73.7% y 52.8% a las diluciones 1:10 y 1:100, respectivamente. Finalmente, estudios de inmunodetección con los sueros, mostraron ser específicos para la TTPI.

1. INTRODUCCIÓN

La teniosis y 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 cerdo, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza. Bajo estas condiciones, la parasitosis está ampliamente distribuida en el mundo en muchos países en desarrollo, asimismo, en algunos países desarrollados donde se tenía controlada la enfermedad se han presentado casos recientes debido a la migración de portadores de tenias, por lo que se considera a esta parasitosis como remergente¹⁻³.

Algunos fármacos que no fueron diseñados específicamente para combatir a esta parasitosis han tenido buenos resultados; sin embargo los mecanismos de evasión del parásito, la resistencia que los parásitos están desarrollando a los fármacos, así como las reacciones secundarias que los fármacos ocasionan en los hospederos^{15,33} hacen importante la búsqueda de nuevas estrategias en contra de *T. solium*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Clasificación de *Taenia solium*

Reino: Animalia

Phylum: plathelminthos

Clase: cestoda

Orden: cyclophyllidea

Familia: taeniidae

Genero: *Taenia*

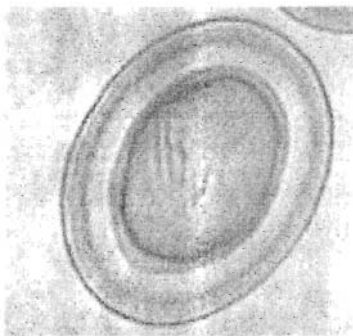
Especie: *solium*

2.2 Generalidades

La *Taenia solium* es un cestodo que presenta tres estadios de vida: huevo, cisticerco o larva y la tenia o adulto. La teniosis es la enfermedad causada por el adulto mientras que la cisticercosis hace referencia al estado larvario de la taenia.

Los huevos tienen forma esférica, miden de 30 a 45 μm de diámetro y adentro se encuentra la oncosfera o embrión hexacanto (llamado así por poseer tres pares de ganchos) envuelta por una membrana llamada embrióforo (Fig 1).

A



B

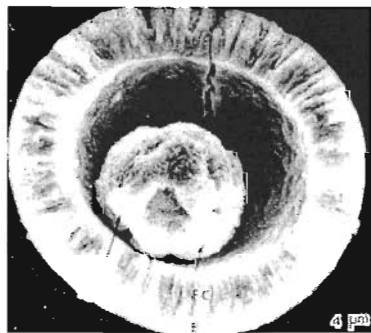


Fig.1 A) Huevo de *Taenia solium* visto mediante microscopía de luz; B) Huevo con oncosfera de *T. solium* visto mediante microscopía electrónica. Tomado de www.cdfound.to.it/HTML/taen1.htm.

Además de los ganchos posee un par de glándulas de penetración que le ayudan en la migración. El embrioforo esta formado por bloques constituidos principalmente de queratina y unidos por una proteína cementante⁴.

El cisticerco tiene forma vesicular y ovoide con un diámetro de 0.5 a 1.5 cm, su pared es semitransparente y su interior se encuentra lleno de un fluido denominado fluido vesicular con un pequeño escólex invaginado, el cual es semejante al del adulto (**Fig. 2**). La superficie externa es un tejido tegumentario similar al del adulto con microvellosidades que protegen del contacto directo con el tejido del hospedero^{4,5}.

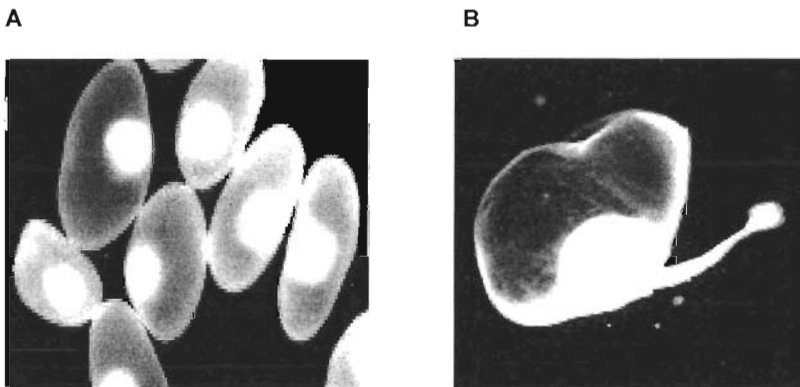


Fig. 2 A) Cisticerco tipo celuloso y B) Cisticerco evaginando. Tomado de www.cdfound.to.it/HTML/taen1.htm.

El adulto es un gusano plano segmentado, que mide de 2 a 5 m de longitud (**Fig. 3**), consta de un:

a) Escólex (órgano de fijación del parásito), mide aproximadamente 1 mm de diámetro con cuatro ventosas y un rostelo armado y una doble corona de ganchos, en número de 22 a 32 con un tamaño de 0.110 a 0.180mm.

b) Cuello, este es corto sin segmentaciones y aquí se encuentran las células pluripotenciales o células madre, responsables de la formación de proglótidos.

c) Estróbilo, conformado por 800 a 1000 proglótidos fusionados, que de acuerdo a su madurez reproductiva y localización se clasifican en inmaduros, maduros y grávidos, los más cercanos al cuello son los inmaduros donde apenas se distinguen las formas celulares que originan los genitales masculino y femenino ya que este parásito es hermafrodita, en la región media se localizan los proglótidos maduros que contienen los órganos reproductores completamente desarrollados y al final se encuentran los proglótidos grávidos que miden 1 cm de largo por 7 cm de ancho y contienen $50-60 \times 10^3$ huevos fértiles dispuestos en 7-13 ramas uterinas^{4,6}.

La *T. solium*, al igual que cualquier otro cestodo carece de sistema digestivo, por lo que la absorción de nutrientes la lleva a cabo a través de su cubierta externa denominada tegumento. A través de él se absorben y excretan selectivamente, ya sea por difusión o por transporte activo las sustancias que requieren para su deshecho, defensa o nutrición. El tegumento está cubierto de microvellosidades llamadas microtricas que aumentan el área de absorción. Las microtricas se encuentran cubiertas por el glicocalix, el cual es una cubierta protectora que inactiva algunas enzimas del hospedero y contiene amilasas utilizadas para degradar azúcares complejos. Además de ser un órgano de protección el tegumento es empleado en la locomoción y contiene varias enzimas y sistemas específicos para el transporte de moléculas e iones⁷.

El sistema muscular está compuesto de miofibrillas y miocitos, estos últimos son parte de la masa del parénquima del cestodo y son la forma contráctil del sistema. El parénquima, cuya función es de sostén, es considerado como centro de síntesis, transporte y almacenamiento de glucógeno y otras proteínas. Este es un tejido sincital y fibroso que limita el tegumento en el que se encuentran incluidos los órganos del aparato reproductor, excretor y los del sistema nervioso, así como dos paquetes de fibras

musculares que dividen el parénquima en dos zonas, la cortical y la medular. Embebidas a través del parénquima se encuentran las células en flama del protonefridio que alimenta los canales principales de excreción, estos canales se encuentran en posición ventrolateral y dorsolateral a lo largo del estróbilo que desemboca en una vejiga con un poro que da hacia el exterior. Los ductos de excreción están alineados con las microvellosidades lo que sugiere que tiene una función de transporte no solo de desechos sino también de fluidos con iones que permiten la osmoregulación, la cual se anota como otra función de la superficie tegumental. Una estructura que se encuentra en la mayoría de los tejidos del cestodo son los cuerpos o corpúsculos calcáreos, la función de estos cuerpos aun no esta definida.

En el escólex se encuentra el principal centro nervioso, de donde parten los ganglios neuronales del cestodo para enervar todo el estróbilo, mediante los nervios longitudinales, donde fluctúan alrededor de 20 diferentes neuropéptidos que desarrollan una función sensorial tacto y quimiorreceptiva. Algunos de los neuropéptidos descritos de importancia en la transmisión de estímulos nerviosos en estos parásitos son la serotonina y la acetilcolina⁷.



Fig 3. Escólex de *T.solium*, visto por microscopía electrónica. Tomado de www.cdfound.to.it/HTML/taen1.htm

2.3 Ciclo de vida

Para que *T. solium* cumpla su ciclo de vida requiere de dos hospederos: el humano, hospedero definitivo de la forma adulta, y el cerdo, que junto con los humanos, pueden actuar como hospederos intermediarios de la forma larvaria, siendo el cerdo el intermediario natural mientras que el hombre actúa como hospedero accidental^{4,7} (Fig4).

Cuando el hombre ingiere carne de cerdo cruda o mal cocida infectada con cisticercos, puede desarrollar teniosis. Al entrar la larva al tracto digestivo, las enzimas proteolíticas y sales biliares la activan y la larva evagina en el intestino delgado; el escólex se adhiere a la mucosa del intestino y comienza a formar proglótidos, 2 meses después de la infección se ha desarrollado una *Taenia* adulta, capaz de producir miles de huevos infectivos por cada proglótido. Los proglótidos grávidos comienzan a desprenderse del extremo distal del adulto y son expulsados a través de las heces, en el medio ambiente se descomponen y liberan a los huevos, los cuales pueden permanecer viables durante largo tiempo^{4,7,8}.

En lugares donde aun la eliminación de excretas es inadecuada, los cerdos se alimentan con heces humanas e ingieren los huevos de *T. solium*. Cuando el cerdo ha ingerido los huevos; los jugos gástricos, enzimas digestivas y sales biliares degradan al embrioforo liberando a la oncosfera, la cual penetra la mucosa intestinal y entra al flujo sanguíneo donde son transportados a tejido muscular, cerebro, ojos, riñones, hígado, etc⁹. En 60 a 70 días la oncosfera se transforma en larva o cisticerco^{4,7,8}.

El hombre puede convertirse en el hospedero intermediario cuando ingiere alimentos o agua contaminada con huevos de *T. solium* o bien por contaminación mano-boca en individuos portadores del parásito adulto (teniosis), en los cuales puede haber autoinfección o infección a otras personas; bajo estas circunstancias se desarrolla la cisticercosis humana. El mecanismo por el cual las oncosferas entran al torrente

sanguíneo y se establecen en tejidos para evolucionar a cisticerco es similar al descrito en el cerdo^{4,7,8}.

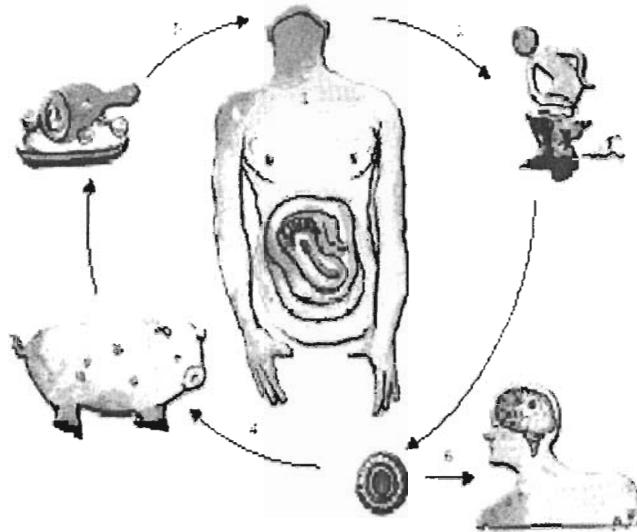


Fig 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. (1)El humano con teniosis; (2) elimina los huevos de *T. solium* en las heces y (3) los huevos se propagan en el medioambiente; (4) El cerdo ingiere huevos del parásito y adquiere cisticercosis; (5) El humano al ingerir carne de cerdo con cisticercos adquiere la teniosis; (6) Los humanos al ingerir huevos de *T. solium* también adquieren cisticercosis⁴.

2.4 Manifestaciones clínicas

2.4.1 Teniosis

La teniosis es caracterizada por ser asintomática o presentar pocos síntomas. Dolor abdominal, distensión, diarrea y náusea han sido síntomas atribuidos a la presencia de la forma adulta de *T. solium*, sin embargo no hay datos de experimentos controlados que

demuestren alguna asociación y muchos de los pacientes con este padecimiento parecen estar libres de síntomas^{3,6}.

2.4.2 Cisticercosis

El período entre la infección inicial y la aparición de síntomas es muy variable; este puede ser de algunos meses o varios años. El cuadro clínico depende de si la cisticercosis es subcutánea, muscular u ocular, aunque en países latinoamericanos la ubicación principal es en el SNC. Cuando afecta al SNC las manifestaciones dependen del número, localización y estado evolutivo del parásito; las más comunes son epilepsia de inicio tardío y cefalea, pero también se pueden presentar cambios en los sistemas sensoriales, hipertensión craneal que incluye vómito y papiledema, epilepsia focal o generalizada, ataxia, síntomas pseudo-apopléjicos, movimientos involuntarios e incluso demencia⁴.

2.5 Epidemiología

La teniosis y cisticercosis afecta principalmente a países en desarrollo, sin embargo también se han visto afectados países desarrollados, debido a la migración de personas provenientes de áreas endémicas³.

La infección con *T.solium* se encuentra ampliamente distribuida por el mundo siendo un problema de salud pública en algunas áreas urbanas y rurales de América Latina, Asia y África, donde esta parasitosis es endémica^{10,11}.

Algunas investigaciones epidemiológicas han identificado varios factores asociados a la infección por *T.solium*, como son: bajo nivel socioeconómico, falta de servicios de drenaje y de agua potable, hábitos carentes de cuidados higiénicos personales, consumo frecuente de carne de cerdo, antecedentes de expulsión de proglótidos, convulsiones, ataques epilépticos, prácticas domésticas de crianza de cerdos con acceso de estos animales a heces de humanos¹²⁻¹⁴.

En México y en algunos otros países, los estudios y estadísticas del porcentaje de población humana y porcina afectada pueden estar subestimados ya que no existe un seguimiento bien documentado de la incidencia y prevalencia de este parásito, así que solo existen estimados provenientes de fuentes diversas como son las investigaciones científicas y las estadísticas oficiales derivadas de estudios hospitalarios y necropsias¹⁵.

2.5.1 Teniosis

Publicaciones científicas reportan que la frecuencia de infección en México oscila entre 0.2-2.4%, observándose una disminución a partir de 1991 donde se notificaron ocho mil casos, según estadísticas oficiales^{15,16}.

Los estudios epidemiológicos informan que el parásito adulto se presenta en todas las edades y que alcanza su pico en grupos de 16 a 45 años (edad económicamente productiva), asimismo que las personas del sexo femenino son las que más frecuentemente presentan este parásito^{1,6,17}.

En países de Latinoamérica como Perú, Bolivia, Ecuador y Guatemala el rango de infección va del 1 al 8.6%¹⁶. En Asia el intervalo de personas infectadas es muy amplio ya que oscila desde 0.1% en China hasta 50% en Nepal¹⁸. En África no existen estadísticas actuales, solo algunos conteos en países como Kenia donde se indica un aproximado del 2% en el reporte anual del Ministerio de Salud del 2001 de este país¹⁹.

2.5.2 Cisticercosis humana

La cisticercosis humana en México, según estudios epidemiológicos realizados en varias comunidades, esta presente en un intervalo que oscila del 3.7% al 12.2% de la población¹⁶. En hospitales neurológicos de México el 12% de las camas ocupadas son por pacientes con neurocisticercosis siendo esta la manifestación más grave de la

cisticercosis humana²⁰. Estadísticas similares muestran 30-50% de neurocisticercosis en los casos atendidos por epilepsia^{21,22}.

El intervalo de cisticercosis humana en países de América latina oscila entre 5 al 24%¹⁶. En Asia este intervalo es de 1.7 al 13%¹⁸, y en África presumiblemente el 10% de la población presenta cisticercosis¹⁹.

En los últimos años la neurocisticercosis se ha convertido en un padecimiento común en hospitales de los EUA que atienden a población latinoamericana, tal es el caso de las áreas de Los Ángeles, San Diego, Nuevo México y Houston^{2,3}. En hospitales de los Ángeles y Nuevo México, se encontró que el 10 y 6% respectivamente, de los pacientes que recurrían a estudios de neuroimagen, se debían a neurocisticercosis²³.

2.5.3 Cisticercosis porcina

El registro de la frecuencia de cisticercosis en cerdos sacrificados en rastros varía entre 0.004 % y 12%; sin embargo, en la población porcina que es sacrificada sin inspección sanitaria la frecuencia de cisticercosis puede ser mayor y alcanzar un 35%^{16,24}.

En países de Latinoamérica como Perú, se reporta hasta un 61% de cisticercosis porcina¹⁶. En Asia, China reporta incidencias por encima del 40% y África en países como Mozambique reporta incidencias del 33%^{18,19}.

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Teniosis

La teniosis se diagnostica por la identificación de proglótidos o huevos excretados en las heces por microscopía mediante técnicas de sedimentación y flotación.

La morfología de los genitales maduros en los proglótidos proporciona la identificación de la especie (*T. solium* o *T. saginata*), pero raramente se obtienen

proglótidos o huevos en las heces del paciente, lo cual hace que su utilización para el diagnóstico sea difícil, además los huevos de las tenias son muy similares entre sí²⁵. Este método diagnóstico tiene baja sensibilidad y especificidad por lo que ha puesto a esta técnica en desventaja y su uso se ha visto disminuido.

Con la finalidad de desarrollar pruebas rápidas, sensibles y específicas que permitan detectar a los portadores de *T.solium*, se ha estandarizado un ELISA de captura de antígenos de tenia en las heces de personas infectadas, esta técnica de coproantígenos ha resultado ser muy efectiva²⁶. También se cuenta con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando genes mitocondriales a partir de DNA aislado de huevos e inmunoelectrotransferencia utilizando una fracción de excreción – secreción^{27,28}.

2.6.2 Cisticercosis

Cuando la cisticercosis es ocular, los cisticercos son visualizados mediante examen oftalmoscópico y en los músculos esqueléticos o el tejido celular subcutáneo puede identificarse mediante radiografías simples e incluso mediante palpación.

Para el caso de la cisticercosis en SNC, existen dos tipos de técnicas usadas como apoyo diagnóstico: las de imagen y las inmunológicas. Las de imagen como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM), tienen alta resolución y sensibilidad pero no son 100% específicos²⁹, permiten visualizar el número y localización de los parásitos así como su estado evolutivo. Sin embargo estos métodos son costosos y solo están disponibles en algunos centros hospitalarios, resultando inaccesibles para la mayoría de los pacientes de los países más afectados⁸.

En busca de pruebas diagnósticas económicas, prácticas y confiables, se han desarrollado técnicas orientadas en la identificación de anticuerpos anticisticercos en suero, saliva y LCR, entre las que destacan, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la

inmunoelctrotransferencia (IET). La técnica que actualmente ha mostrado mayor sensibilidad y especificidad es la IET que utiliza una fracción de glicoproteínas unidas a una matriz de nitrocelulosa³⁰. La práctica de pruebas inmunológicas con LCR suele ser más confiable que en suero, sin embargo la sensibilidad de dichas pruebas se relaciona directamente con la viabilidad y localización de los cisticercos.

2.7 Tratamiento

2.7.1 Antihelmínticos

Para el tratamiento de la teniosis se ha utilizado la niclosamida, que actúa directamente sobre el tegumento de los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero. Dicho fármaco puede exponer al paciente al riesgo de contraer cisticercosis, pues destruye los proglótidos y libera los huevos dentro de la luz intestinal; por lo que su uso ha sido discontinuado en algunos países, incluyendo el nuestro³¹. Actualmente el prazicuantel es uno de los fármacos en uso, este es una pirazino-isoquinolina que lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva interfiriendo con los canales iónicos principalmente los de calcio. Se sugiere una dosis de 10 mg/ Kg de peso como dosis única para el tratamiento de la teniosis³², ya que dosis más altas produce reacciones indeseables cuando hay cisticercos alojados en el SNC.

El albendazol también es un fármaco de elección, sobre todo en menores de cinco años, para el caso de la teniosis³², este es un carbamato benzimidazolico cuya acción se ejerce sobre la tubulina, inmovilizando y matando al parásito. Inicialmente se utilizó en dosis de 15 mg/Kg./día durante 30 días; sin embargo estudios posteriores demostraron que la duración del tratamiento podía ser reducida a 8 días con iguales resultados para el caso de la cisticercosis. El albendazol destruye el 75% a 90% de los cisticercos y es más

utilizado que el prazicuantel por su menor costo y mayor eficacia en contra de la cisticercosis³².

Debido al pleomorfismo clínico que presenta la neurocisticercosis, no es posible que un solo esquema de tratamiento sea útil en todos los casos. Por consiguiente, el tratamiento debe ser el estudio riguroso del paciente, basado en la localización, viabilidad y número de cisticercos en el SNC²⁵.

Estudios acerca de los efectos secundarios a largo plazo de estos fármacos, no han sido realizados, pero se ha observado que el prazicuantel ocasiona la pérdida de material genético en una línea celular, mientras que el albendazol induce el retraso de la cinética de proliferación de linfocitos de sangre periférica³³. Asimismo, se han presentado casos de resistencia a este fármaco en infecciones por otros helmintos como *Schistosoma*.

2.7.2 Antiepilépticos y corticosteroides

Un fármaco antiepiléptico de primera línea como la carbamazepina, fenitoina o fenobarbital, produce un control adecuado de las crisis en pacientes con epilepsia secundaria a calcificaciones. Los pacientes con quistes viables deben recibir primero un curso de tratamiento con fármacos antihelmínticos para lograr un control posterior de crisis con fármacos antiepilépticos⁴.

Los corticosteroides son fármacos frecuentemente utilizados en pacientes con neurocisticercosis, usando dosis altas de dexametasona (24-32 mg/día). Se ha sugerido su empleo solo para neurocisticercosis donde los cisticercos no conviene que sean destruidos o bien para disminuir los efectos adversos que puedan ocurrir durante el tratamiento con albendazol y prazicuantel, por lo que existen indicaciones absolutas para el uso simultáneo de corticosteroides y antihelmínticos⁴.

2.8 Prevención y control

Existen características que hacen a *T. solium* vulnerable: a) su ciclo de vida requiere necesariamente a los seres humanos como sus hospederos definitivos; b) la teniosis es la única fuente de infección para el hospedero intermediario; c) el cerdo puede ser controlado y d) no existen reservorios silvestres para este parásito³⁴.

Actualmente, algunas de las medidas que se han propuesto para controlar y prevenir la teniosis y cisticercosis en zonas endémicas son: campañas educativas que incluyan la información para prevenir la adquisición del parásito, hábitos de higiene, identificación de carne infectada, cocimiento de ésta, evitar el fecalismo al aire libre, la vacunación de cerdos, el tratamiento de cerdos con medicamentos antiparasitarios, tratamiento humano en masa para la erradicación del parásito adulto en los portadores, campañas de salud que incluyan inspecciones rigurosas en los rastros, modernización de la crianza de cerdos, creación de mejores condiciones sanitarias y sistemas epidemiológicos para identificar a los portadores del parásito adulto³⁵.

2.9 Metabolismo energético: posible alternativa para el tratamiento y/o control de

Taenia solium.

Los helmintos son organismos que consumen grandes cantidades de glucosa, de la cual obtienen su energía a través de la vía glucolítica³⁷. Por lo que varios autores han considerado que las enzimas involucradas en la glucólisis serían blancos importantes para destruir a estos organismos^{47, 58, 59}, en el caso de *T. solium* pocos son los estudios que se refieren al metabolismo energético pero en uno de ellos se ha encontrado que la Triosafosfato Isomerasa podría ser utilizado como blanco para destruir a este parásito⁴⁷.

2.9.1 Glucólisis en *Taenia solium*

Para los helmintos la glucólisis es un proceso metabólico importante, ya que para su crecimiento obtienen del hospedero sus nutrientes y muchos de sus elementos estructurales; sin embargo es a través de procesos metabólicos como la glucólisis que generan su propia energía. Aunque los helmintos en su forma adulta poseen mitocondria, su metabolismo es predominantemente anaeróbico al estar dentro del hospedero³⁷.

Los carbohidratos son una fuente esencial de energía para los helmintos y la glucólisis es la vía más importante para generar ATP, así como otros intermediarios tales como el fosfoenolpiruvato y NADH, los cuales son usados en otras reacciones de metabolismo³⁸.

En general la glucólisis es un proceso metabólico que tiene lugar en el citosol donde se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones enzimáticas, dando dos moléculas de piruvato. Dicho proceso está catalizado por diez enzimas citosolicas y todos los intermedios son compuestos fosforilados. Consta de dos fases, cada una de ellas constituida por cinco reacciones; la fase preparatoria de la glucólisis, donde la glucosa es fosforilada y la fase de beneficios, donde tiene lugar el retorno energético. El rendimiento neto de esta serie de reacciones es de dos moléculas de ATP. El destino del piruvato varía con la capacidad enzimática de la especie y la cantidad de oxígeno molecular. Los productos finales de las reacciones anaeróbicas son el lactato o el alcohol etílico, pero en presencia de oxígeno molecular el piruvato es descarboxilado y se forma Acetil-coenzima A³⁶.

2.10 Triosafosfato Isomerasa

La triosafosfato isomerasa es una enzima homodimérica cuyos monómeros pesan alrededor de 27 kDa cada uno, y cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a su isomero D-gliceraldehido 3 fosfato (D-GAP) (Fig 5), esta reacción es

reversible y tiene un importante papel en la glucólisis, gluconeogenesis, síntesis de ácidos grasos y la vía de las pentosas^{39,40}.

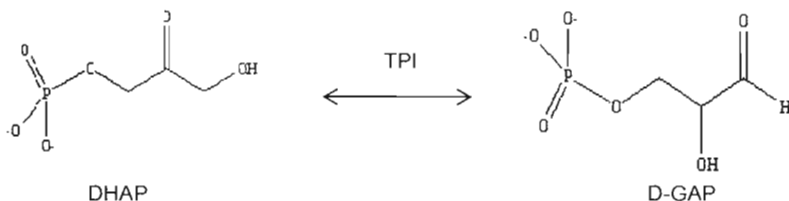


Fig 5. Reacción catabolizada por la Triosafosfato Isomerasa.

La triosafosfato isomerasa, cataliza la transferencia del hidrógeno pro-R del C1 de DHAP al C2 de D-GAP. El ácido glutámico 165 es el responsable de la extracción del protón-R del DHAP y la inserción del mismo en carbono 2 en la formación de D-GAP⁴⁰. Ambos compuestos existen en solución como una mezcla de especies hidratadas y libres, pero la TPI solo utiliza las formas libres como sustrato. El mecanismo de reacción ha sido muy estudiado por diferentes técnicas tales como mutagénesis dirigida y cristalografía⁴¹. La actividad de la TPI es muy alta y adopta un plegamiento(α/β)₈, es decir 8 cadenas β ordenadas en círculo y conectadas una con la otra por medio de una hélice α , común en varias enzimas que catalizan reacciones muy diversas⁴² (**Fig 6**).

Los sitios activos están localizados en los C-terminales de la estructura de barril y los residuos involucrados son Lys 13, His 95, Glu 165. Los dos sitios activos, uno en cada monómero parecen ser cinéticamente independientes; sin embargo por medio de ensayos de renaturalización y mutagénesis se ha encontrado que la actividad catalítica requiere de la asociación de los monómeros. Mientras el dímero presenta una V_{max} elevada, los monómeros separados no presentan actividad^{43,44}. La TPI no utiliza cofactores o iones metálicos.

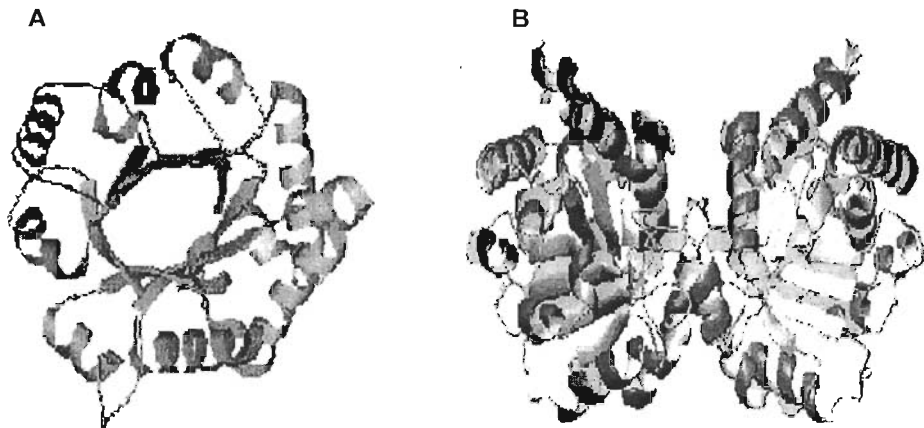


Fig 6. A) Monómero de TPI; B) Dímero de TPI que muestra dos monómeros idénticos. Tomado de <http://www.prot.tpi./html>

El papel que juega la TPI en el desarrollo de diferentes organismos es de suma importancia, se ha observado que la deficiencia de TPI (menos de un 50% de lo normal) provoca complicaciones en el desarrollo, las cuales derivan en la muerte ya que al no haber TPI suficiente que catalice la interconversión de DHAP, esta se acumula siendo tóxica para el organismo⁴⁵. Otras consecuencias de la deficiencia de TPI son: disfunción muscular progresiva, cardiomiopatía e incremento de la susceptibilidad a infecciones⁴⁶.

La distribución y localización de TPI en cestodos no es conocida, esta enzima es probablemente esencial para el parásito, ya que no existe evidencia de que otra enzima realice función catalítica similar a la de la TPI.

Las TPIs son muy conservadas en sus propiedades bioquímicas⁴⁸ y a nivel de estructura sin embargo, existen aa o regiones de aa no conservadas a nivel de estructura primaria que pueden ser utilizadas para su inhibición selectiva^{47,49}. A este respecto se han identificado aa no conservados entre especies que son importantes para mantener la estructura y actividad de la TPI⁴⁹. Un ejemplo, son estudios realizados en la TPI de

protozoarios como Tripanosomas, Leishmanias y *Entamoeba histolytica*, los cuales identifican una cisteína de interfase en posición 14, que no esta presente en mamíferos, y que al reaccionar con agentes sulfidriilo, afecta la estabilidad y actividad de la TPI, provocando una inhibición dependiente de la concentración y del tiempo^{44, 49, 50, 51}.

Estudios en *T. cruzi* en los que se llevo acabo la sustitución de una histidina de interfase (His 47) por una asparagina⁵², o la exploración de sitios de unión en la interfase del dimero de TPI⁵³, así como el cambio de una leucina en la posición 183 de la TPI de *P. falciparum* por glutamato mostraron cambios en la estructura y actividad de la enzima por lo que se han considerado sitios potenciales para la inhibición⁵⁴. Además moléculas aniónicas como colorantes (rojo congo, rojo 75, amarillo 50 etc.), son inhibidoras de la TPI de *P. falciparum*, ejerciendo su acción de inhibición por unión al sitio activo de la TPI variando la conformación e interfiriendo con el acceso del sustrato a los residuos catalíticos⁵⁵.

La TPI de *T. solium* ha sido parcialmente caracterizada y se ha demostrado que el sistema inmune es capaz de reconocer y montar una respuesta contra esta enzima; ensayos de vacunación usando un modelo murino de cisticercosis mostraron que al inmunizar con esta enzima, la carga parasitaria de los animales infectados se reduce en un 50%⁵⁶. Al igual que las otras TPIs la TTPi es muy conservada en su estructura, sin embargo, existen regiones no conservadas que pueden ser responsables de la inhibición selectiva, como la que corresponde al primer tercio de la molécula que es la región menos conservada entre las especies, por lo que también ha sido sugerida como un blanco para el desarrollo de inhibidores selectivos⁵⁶.

3. HIPOTESIS

Dado que el primer tercio de la TTPI, es una región poco conservada; los anticuerpos creados en contra de esta región de la enzima reconocerán solo a la TPI de *T. solium*, inhibiendo selectivamente su actividad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar si los anticuerpos creados en contra del primer tercio de la TPI de *T. solium* (TTPI) inhiben la actividad de la enzima y evaluar la especificidad de dichos anticuerpos.

4.2 Objetivos Particulares

- Producir una TTPI recombinante en un sistema de expresión bacteriano.
- Producir un fragmento de 1/3 NH₂-terminal de la TTPI (1/3NH₂-TTPI).
- Generar anticuerpos policlonales contra el fragmento 1/3NH₂-TTPI y la TTPI.
- Realizar ensayos de inhibición enzimática de la TTPI, con los anticuerpos generados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

5.1 Reactivos

El Isopropil- β -tiogalactosidasa (IPTG), los reactivos para medir la actividad enzimática (gliceraldehido 3-fosfato, NADH, α -glicerofosfato deshidrogenasa, trietanolamina, DTT), la proteasa V8 tipo XVII-B de *Staphylococcus aureus* y el adyuvante saponina fueron adquiridos de la casa Sigma Chemical Co. Las membranas de nitrocelulosa (NC) fueron de la marca Hybond de Amersham Biosciences. Las columnas de resina acopladas a metales-níquel (HiTrap Chelating) fueron de la casa Amersham Biosciences. El resto de los reactivos fueron de la más alta calidad disponible en diversas casas comerciales.

5.2 Materiales biológicos

Los conejos utilizados fueron de la cepa Nueva Zelanda, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. La cepa de *E.coli* utilizada fue la **BL21DE3** (*hsdS gal λ clts857 ind 1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1*) deficiente en proteasas de la marca comercial InVitrogen Corp. El plásmido de expresión fue el pRSET que contiene el promotor fuerte para T7 que se induce con IPTG, además que permite expresar proteínas recombinantes fusionadas a 6 histidinas que facilita la purificación de la proteína. Los sueros anti-TPI de *S.scrofa*, *S.mansoni*, *E.histolytica* fueron generados en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina.

MÉTODOS

5.3 Transformación

Se adicionó a 100 μ l de células competentes BL21DE3, 0.05 μ g de DNA del plásmido que contiene la región codificante de la TTPI fusionada a histidinas. La mezcla se incubó durante 30 min en hielo y enseguida se sometió a un choque térmico de 42° C durante 30 seg, posteriormente se adicionó 200 μ l de medio SOC y se incubaron 30 min a 37°C en agitación, al termino de este tiempo las bacterias transformadas se adicionaron a 10 mL de medio LB+ampicilina (50 μ g/ml) y se dejó crecer toda la noche a 37° C en agitación.

5.4 Expresión

El cultivo de toda la noche fue agregado a 300 mL de medio LB+ampicilina (50 μ g/ml) e incubado a 37° C en agitación, hasta que el crecimiento bacteriano llegó a una $DO_{600\text{ nm}} = 0.6$, en ese momento se indujo con IPTG a concentración final de 1 mM e incubándose durante 6 hrs a 37° C en agitación. Pasadas las 6 hrs el cultivo se centrifugó 3400 rpm, 10 min. Y el precipitado bacteriano obtenido se lavó con PBS 1x y se conservó a -70 °C hasta su uso.

5.5 Purificación de la TPI de *Taenia solium* (TTPI)

El precipitado bacteriano obtenido en la expresión se resuspendió en 10 mL de PBS 1X, se lisaron las células con un Polytron a máxima velocidad tres veces, en intervalos de un minuto sobre hielo, la suspensión fue centrifugada a 3400 rpm 10 min. Y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 30 % toda la noche a 4° C. Al siguiente día se centrifugó a 3400 rpm, 10 min, y se realizó una segunda precipitación con sulfato de amonio al 60% a 4°C durante 3 hrs, pasado este tiempo se centrifugó a 10000 rpm 10 min., el pellet obtenido se resuspendió en 3 mL de PBS 1X y se dializó toda la noche

contra PBS 0.1X. La muestra dializada se pasó por una columna HiTrap Chelating (ver anexo) y la proteína unida a la columna se eluyó con amortiguador de PBS-EDTA 50mM, la proteína eluida se dializó contra PBS 1x y conservo a 4°C hasta su uso. La pureza de la enzima purificada se determinó por medio de SDS-PAGE al 12% y tinción de Coomasie.

5.6 Cuantificación de proteína

Fue realizada por espectroscopia a DO_{280} nm diluyendo la proteína 1:100 en amortiguador PBS 1x. La Abs obtenida se dividió entre el coeficiente de absorción de la TTPI (1.3413) calculado en base a su número de aminoácidos aromáticos ⁵⁷. El resultado se multiplicó por el factor de dilución.

5.7 Digestión

Se digirieron 965 µg de TTPI con 150µg de la proteasa V8 tipo XVII-B de *S.aureus* en 1.5 mL de amortiguador para dicha enzima (ver anexo) e incubando a diferentes tiempos de 2 hasta 32 hrs a 37°C.

5.8 Purificación del primer tercio de la proteína (1/3NH₂ de TTPI)

La TTPI digerida se pasó por una columna HiTrap Chelating, a la que previamente se le unió Ni ²⁺ (ver anexo). La proteína unida a la columna se eluyó con un gradiente conteniendo diferentes concentraciones de imidazol en PBS 1X (0.01, 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 M). Una solución de PBS 1X con EDTA 50 mM se utilizo para eluir por completo la proteína. Por medio de SDS-PAGE al 15% y tinción de plata o por inmunoelectrotransferencia (IET) con los sueros anti-TTPIs, se determinó en que fracción se estaba eluyendo el primer tercio de la proteína.

5.9 Producción de Anticuerpos Policlonales.

Para la producción de anticuerpos en contra de la TPI completa y del primer tercio de la TTPI. Se inmunizaron conejos con 100 µg de cada proteína, tres veces con intervalo de 15 días, usando como adyuvante 10 µg de saponina. Una semana después de la tercera inmunización el conejo fue sangrado y el título de anticuerpos en el suero se determinó por IET. Finalmente el suero se obtuvo permitiendo a la sangre coagularse y por centrifugación a 3400 rpm por 30 min. El suero se guardó en alícuotas a -20°C.

5.10 Inmunodetección

Se preparó un gel de poliacrilamida con SDS al 12%, cargando en los pozos TPI de diferentes especies en una concentración de 500 ng de proteína por mm de gel; otro gel al 15% se cargó con el fragmento correspondiente al primer tercio de la TTPI. Después de la electroforesis los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa a 100 V durante 45 min. La membrana fue incubada con el suero anti-TTPI completa a dilución 1:500 y con el suero anti-1/3 NH₂ de TTPI a dilución 1:2000 por 1 hr. Se lavó tres veces con PBS-Tween 0.3% y se incubó durante 1 hr con un segundo anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa. La membrana se lavó como en el paso anterior y fue revelada con diaminobencidina (4 ng/10 mL) en PBS y 1 µL de peróxido de hidrógeno. Suero de conejo preinmune se utilizó como control negativo.

5.11 Ensayo de inhibición

Para este ensayo se utilizó la proteína recombinante completa: 300 ng de enzima se incubaron con cada uno de los sueros (anti-TTPI, anti-1/3NH₂TTPI y normal) a diluciones 1:10 y 1:100 en amortiguador de trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM (TED) durante una hora a 37° C. Como control de actividad se empleó enzima incubada bajo las mismas condiciones pero sin suero. La actividad enzimática de la TPI se midió a 25°C en

1 mL de reacción mediante la reacción reversa, usando como sustrato al gliceraldehído 3-fosfato empleando: 30 ng de TTPI incubada + 1 mM de G3P + 2 mM α GHD + 0.2 mM NADH en amortiguador trietanolamina 100 mM, EDTA y DTT 1 mM. El decremento en la DO del NADH fue observado a 340 nm.

6. RESULTADOS

6.1 Producción de la TPI de *Taenia solium*

Las bacterias con el vector pRSET conteniendo la región codificante del cDNA para la TPI de *T. solium* (pRSET-TTPI) fueron crecidas e inducidas a producir la TTPI recombinante fusionada a una cola de 6 histidinas. La **Figura 7**, muestra un SDS-PAGE de la expresión y purificación de la TPI recombinante.

El carril 1 muestra un extracto total de bacteria que contiene el plásmido que produce la enzima recombinante sin inducir; se observa que la fracción esta compuesta por un gran número de proteínas bacterianas en un rango de 10-200 kDa. El carril 2 muestra a la bacteria inducida con IPTG para producir la enzima recombinante, se observan las mismas proteínas del carril 1, resaltando la expresión de una proteína de 27 kDa. Finalmente, el carril 3 muestra una sola banda de 27 kDa, que corresponde al peso molecular de la proteína purificada (TTPI), la cual se obtuvo por cromatografía de afinidad a una columna Hitrap Chelating conteniendo níquel.

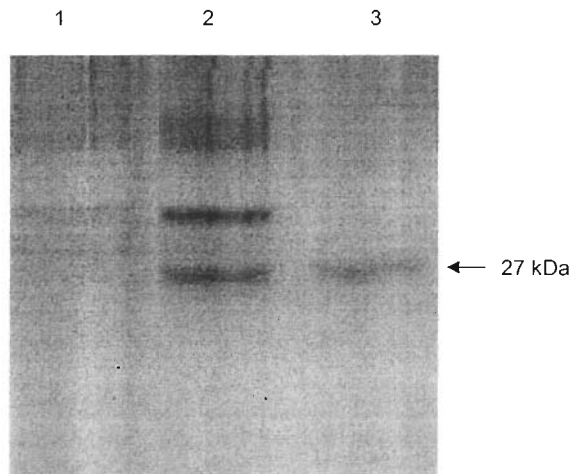


Fig 7. SDS-PAGE al 12%. Tinción de Coomassie. 1) Extracto crudo de *E.coli* sin inducir; 2) Extracto crudo de *E.coli* inducido; 3) TPI de *T. solium* purificada por cromatografía de afinidad.

La purificación por este método permitió obtener una TPI recombinante de *T.solium* cuyo PM fue de 27 kDa y el proceso permitió un rendimiento de 10 mg/L de cultivo.

6.2 Digestión

Puesto que se conoce la secuencia primaria de la TTPI⁴⁷, se realizó un análisis computacional de digestión con el programa PC/Gene para conocer el número de sitios probables de corte por la proteasa V8 de *S. aureus.*, encontrando 25 cortes en diversas regiones de la enzima, los que generaban fragmentos menores a 3.5 kDa.

Para obtener y purificar el péptido 1/3 amino terminal de TTPI se procedió a digerir la enzima producida, con la proteasa V8 de *S. aureus.* Para determinar el tiempo óptimo de digestión de la TTPI que generará la mayor cantidad del fragmento correspondiente al primer tercio de la proteína, se realizaron varios ensayos de una cinética de digestión.

La **figura 8** muestra las digestiones a diferentes tiempos hechas con la proteasa V8; en el carril 1 se muestra la digestión de la TTPI por 2 horas, donde se observa una banda muy fuerte de la TTPI (27 kDa) que comienza a digerirse mostrando una banda muy tenue de aproximadamente 20 kDa, el carril 2 muestra el tiempo de digestión por 4 horas, en el se observa la TTPI continua digiriéndose y se observan 2 péptidos de 11 y 20 kDa. Un patrón similar se observa en el carril 3, el cual muestra la digestión por 8 horas. En el carril 4 se muestra la digestión por 16 horas, donde se aprecia con menor intensidad la TTPI, los péptidos de 11 a 20 kDa siguen observándose pero también comienza a aparecer una banda de un tamaño menor a 11 kDa; la digestión de 24 hr se muestra en el carril 5, donde se observa que la banda de la TTPI desaparece en un 85% y aparece con mayor intensidad un péptido de 11 kDa, además de los péptidos vistos en los carriles 2-4, el carril 6 muestra la digestión por 32 horas, en la que se observa la desaparición de la TTPI y el enriquecimiento del péptido de 11 kDa, así como otros de menor peso.

Cabe mencionar, que la digestión por más de 32 horas digería completamente la TTPI a fragmentos menores a 3.5 kDa. Eligiendo para futuros experimentos la digestión de la TTPI por 32 horas a 37°C. Finalmente en el carril 7 se observa una sola banda de 27 kDa perteneciente a la TTPI sin digerir.

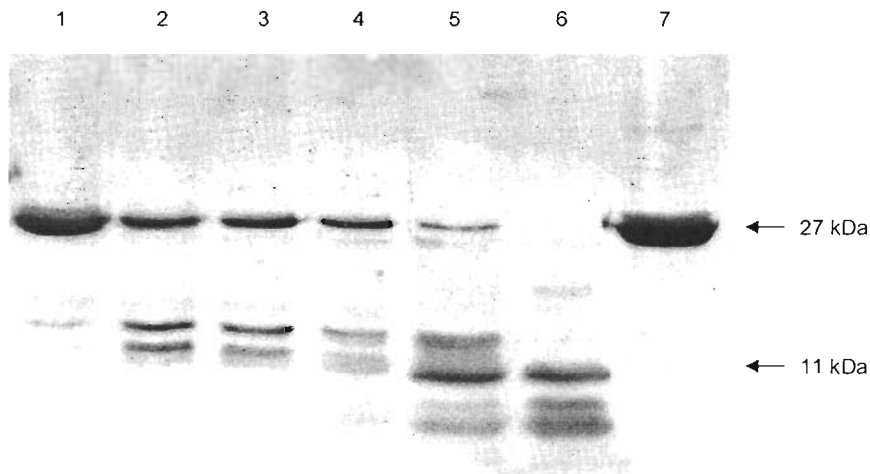


Fig 8. SDS-PAGE al 15% Tinción de Plata. Cinética de digestión de la TTPI con la proteasa V8 tipo XVII-B de *S. aureus*. Tiempo en horas: 1) 2, 2) 4, 3) 8, 4) 16, 5) 24, 6) 32, 7) TTPI sin proteasa.

6.3 Purificación del primer tercio de la proteína (1/3NH₂ de TTPI)

Después de las 32 horas de digestión, la proteína digerida se pasó inmediatamente a través de una columna HiTrap Chelating y se realizó un gradiente de elución con imidazol y PBS-EDTA. La **Figura 9** muestra en el carril 1 la proteína completa antes de ser digerida con un peso molecular de 27 kDa, el carril 2 muestra la elución de las proteínas digeridas con proteasa V8 unidas a la columna y eluidas con 0.05 M de imidazol, se observan varios péptidos de diferentes tamaños en un rango de 11 a 20 kDa, el carril 3

muestra la elución con 0.25 M de imidazol, en el se observa solo un péptido de 11 kDa con buena concentración, en el carril 4 se muestra la elución correspondiente a 0.5 M de imidazol y en el carril 5 se muestra la elución con PBS-EDTA 50 mM, en ambos casos no se observan ningún péptido en el carril. Cabe mencionar que en ninguna de las eluciones se observaron péptidos menores a 11 kDa, sin embargo bandas menores fueron producidas durante la digestión de 32 horas de la TTPI (ver carril 6, **Fig 8**).

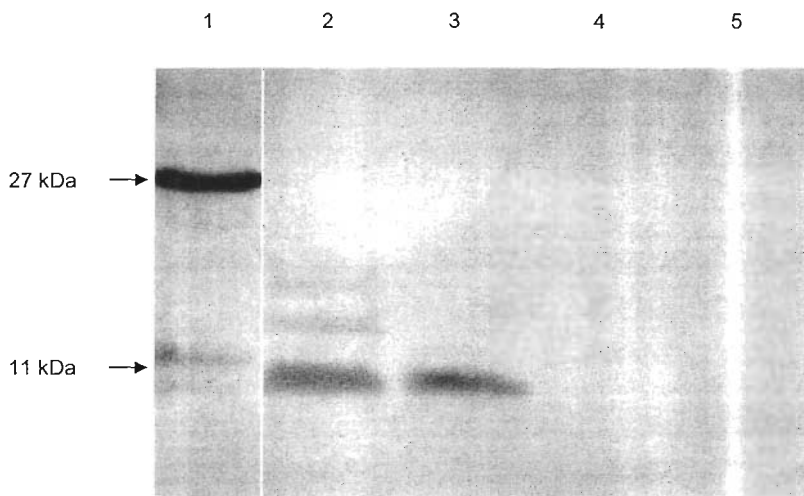


Fig 9. Purificación del primer tercio de la TTPI: 1) TTPI; 2) elución con imidazol 0.05 M; 3) elución con imidazol 0.25 M; 4) elución con imidazol 0.5 M; 5) elución con EDTA 50 mM.

6.4 Determinación de anticuerpos anti- 1/3NH₂ de TTPI

Una vez purificada la TTPI completa y el fragmento correspondiente al 1/3NH₂-TTPI se inmunizaron conejos para la producción de los anticuerpos de interés, tal como se describe en la metodología.

La presencia de anticuerpos en el suero anti-1/3NH₂TTPI se probó en un ensayo de inmunodetección el cual se muestra en la **figura 10**. En el carril 1 se muestra una membrana de nitrocelulosa con TPI de *T.solium* sin digerir, en la que el suero anti-1/3 NH₂TTPI reconoció una banda de 27 kDa. El carril 2 muestra una membrana con una digestión parcial (24 h) de la TTPI con proteasa V8, en la que el mismo suero reconoce bandas de péptidos generados por la digestión en un rango de 11 a 20 kDa, sin reconocer bandas por debajo de 11 kDa; en el carril 3 se muestra una membrana con el primer tercio de la TTPI purificado con la columna de Hitrap, donde se observa que el suero anti-1/3NH₂TTPI reconoce fuertemente esta banda de 11 kDa. Finalmente en el carril 4 se muestra una membrana con el péptido de 1/3 de la TTPI incubada con suero preinmune de conejo, en donde no se observa reconocimiento de bandas.

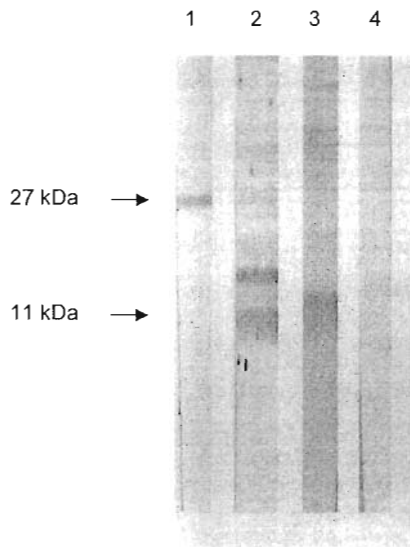


Fig 10. Inmunodetección. Fracciones de la purificación de fragmento de 1/3NH₂TTPI incubados con el suero anti-1/3NH₂TTPI. Membranas con:1) TTPI completa; 2) Digestión parcial de TTPI 24 horas; 3) fragmento del 1/3NH₂TTPI purificado por cromatografía de afinidad y 4) membrana con 1/3NH₂TTPI incubada con suero preinmune de conejo.

6.5 Especificidad de los anticuerpos obtenidos

Para evaluar la especificidad de los anticuerpos obtenidos contra diversas TPIs se realizó un ensayo de inmunodetección el cual se muestra en la **figura 11**.

En la sección A se muestran TPIs de diferentes especies enfrentadas a sueros con anticuerpos dirigidos contra cada una de ellas. En el carril 1 se muestra una membrana con TPI de *T. solium* incubada con suero anti-TTPI, en el se observa el reconocimiento de una sola banda con peso molecular alrededor de 27 kDa, el carril 2 se observa una banda del mismo peso molecular que corresponde al reconocimiento de la TPI de *S. scrofa* (cerdo) por su suero anti-TPI de cerdo, en el carril 3 se muestra una banda similar (TPI de *S. mansoni*) que corresponde al reconocimiento del suero anti-TPI de *Schistosoma mansoni*, y finalmente en el carril 4, se observa el reconocimiento de una banda de 27 kDa (TPI de *E. histolytica*) por el suero anti-TPI de esta especie. En la sección B de la figura 11 se muestran membranas incubadas con suero anti-1/3NH₂TTPI, en el carril 1 se observa una banda de 27 kDa, dicha banda pertenece a la TPI de *T. solium*, reconocida por el suero anti-1/3NH₂TTPI. Los carriles 2, 3 y 4 pertenecientes a membranas con TPI de *S.scrofa*, *S.mansoni*, *E.histolytica* respectivamente no muestran banda alguna al usar el mismo suero. Por último en el carril 5 se muestra una membrana con TPI de *T. solium* incubada con suero preinmune de conejo, donde no se observan bandas.

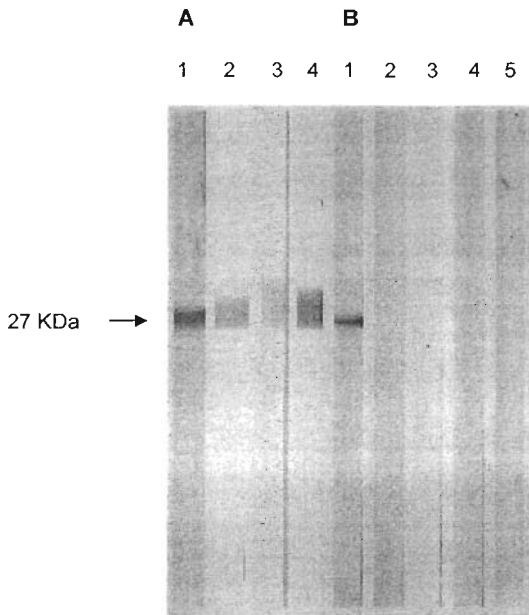


Fig 11. Inmunodetección de TPI de diferentes especies: 1) *T. solium*; 2) *S. scrofa*; 3) *S. mansoni*; 4) *E. histolytica*, sección A: TPIs incubadas con sueros anti-TPI de cada especie y sección B: TPIs incubadas con suero anti-1/3NH₂TPI de *Taenia solium*. 5) membrana con TPI de *T. solium* incubada con suero preimmune de conejo.

6.6 INHIBICIÓN POR ANTICUERPOS

Respecto a la inhibición por anticuerpos encontramos que cuando 300 ng de TTPI recombinante fueron incubados con el suero anti-TTPI y el suero anti- 1/3NH₂TTPI a una dilución 1:10 se presentó una inhibición en la actividad de la TTPI del 81% y 73.7%. En una dilución 1:100 de ambos sueros, se observó que inhibieron a la TTPI en 64.0% y 52.8%, respectivamente. Como control de un 100% de actividad de la TTPI, utilizamos una TTPI incubada sin suero. Como control del ensayo utilizamos una TTPI con un suero normal de conejo a las mismas diluciones antes mencionadas, donde se observó que la

actividad aumentaba un 9% a la dilución 1:10 y disminuía un 3.7% a la dilución con respecto al control de 100% de actividad. Estos datos se muestran en la gráfica de la **figura 12**.

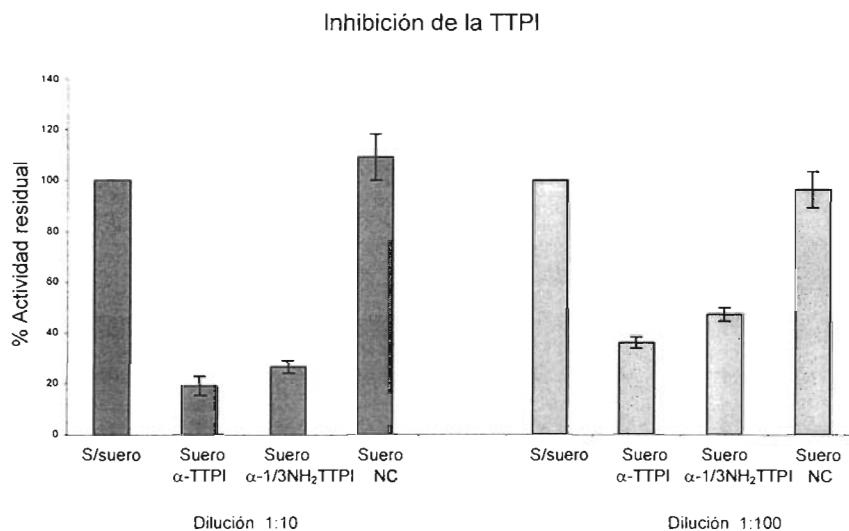


Fig 12. Inhibición de la actividad enzimática de TTPI por sueros. El eje Y muestra el % residual de la actividad enzimática de la TTPI. El eje de las X muestra los tratamientos con sueros.

DISCUSIÓN

Es indudable que México es un país que ha estado a la vanguardia en el estudio del complejo teniosis y cisticercosis causado por *Taenia solium* en todos sus aspectos, ya que este representa un gran problema de salud que repercute en la economía del país¹⁵. Por lo que son muchos los estudios que se han realizado con el único fin de entender y lograr erradicar dicha enfermedad.

Por otro lado en los últimos años el diseño de fármacos utilizando como blanco, enzimas del metabolismo energético, ha tomado gran importancia para combatir parásitos que generan enfermedades importantes como es el caso de la teniosis y la tripanosomiasis solo por poner un par de ejemplos^{49,50,51,54}.

El propósito de este trabajo fue evaluar si anticuerpos en contra de la TTPI producían un efecto inhibitorio en la actividad de la TPI de *T. solium* y de esta manera contribuir al diseño de un tratamiento farmacológico y/o inmunológico en contra de la *T. solium*.

El primer paso para realizar lo antes mencionado fue la producción de una TTPI recombinante; la producción de una proteína recombinante es de suma importancia ya que la cantidad de TPI que se obtiene a partir de cisticercos es poca, 10 µg a partir de 10 gr de cisticercos, por lo que en trabajos anteriores⁴⁷ se realizaron varias formas de TPI recombinantes funcionales de *T. solium* con propiedades bioquímicas características de TPIs de otros organismos ya reportadas⁵⁶.

En esta tesis se logró purificar una TTPI recombinante fusionada en su parte amino-terminal a una cola de 6 histidinas. Esta característica nos permitió purificarla en un solo paso utilizando una cromatografía de afinidad con metales, aprovechando la propiedad de las histidinas de unirse a los mismos, como el níquel²⁺, y la propiedad del EDTA de quelar metales para eluir a la TTPI con histidinas de la columna. Este método de

purificación resultó fácil, rápido y permite obtener un alto rendimiento de la proteína (10 mg/L), con un alto grado de pureza, libre de proteínas bacterianas y con un peso molecular de aproximadamente 27 kDa (Fig 7), peso que corresponde a una de las subunidades de la enzima que conforman el dímero, dicho resultado concuerda con lo reportado en la literatura ^{41,42}.

La obtención del primer tercio de la TTPI se llevó a cabo mediante la digestión de la enzima TTPI con la enzima V8 de *S. aureus*. La elección de esta proteasa se realizó mediante un estudio computacional de digestión que se basó en la composición de la estructura primaria de la TTPI, así como a la propiedad de la proteasa V8 de digerir en los sitios carboxilo de la Asp y Glu. Este estudio predijo alrededor de 25 cortes que generarían péptidos menores a 3.5 kDa, los cuales no visualizamos en el sistema de SDS-PAGE, sin embargo observamos que la proteasa generó péptidos de mayor tamaño (5-11 kDa) a las 32 horas, lo que puede ser explicado por la estructura de la enzima que hasta ese tiempo protegía sitios de corte no expuestos para la V8.

La purificación del péptido amino terminal de la TTPI producido por la digestión de la TTPI con la proteasa V8 por 32 horas, se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia de la cromatografía de afinidad con metales utilizada para purificar a la TTPI. Un péptido de 11 kDa fue purificado por este método (Fig 9) lo que sugiere que este péptido corresponde al primer tercio de la TTPI pues se encontraba unido a las histidinas. Cabe mencionar que dicho péptido se eluyó con imidazol 0.25 M a diferencia de la TTPI que se eluía con EDTA-PBS 50 mM, dicha diferencia se debe tal vez a las propiedades estructurales que cambiaron con el tratamiento de la digestión.

Este péptido y la TTPI completa mezclados con saponina como adyuvante se usó para inmunizar conejos. La saponina se utilizó ya que estimula la respuesta inmune tanto humoral como celular y tiene la capacidad de llevar a los antígenos directamente al citosol de las células presentadoras de antígeno.

Los sueros producidos contra el 1/3NH₂ de TTPI y la TTPI completa reconocieron específicamente a la TTPI (**Fig 10**) y fuertemente al péptido correspondiente al primer tercio de la TTPI, así como a varios péptidos generados por las digestiones , lo antes mencionado resulta lógico ya que la región amino terminal de la TTPI sufre al mismo tiempo varios cortes en diferentes partes por la enzima. Sin embargo, es importante mencionar que ambos sueros producidos contra la TTPI no reconocen bandas por debajo de 11kDa, a pesar que en la digestión por 32 horas se observa la presencia de péptidos menores que no se unieron a la columna de metales, lo que sugiere que dichos péptidos no pertenecen al 1/3 NH₂ de TTPI.

En cuanto a la especificidad de los anticuerpos obtenidos observamos que son sumamente específicos pues no se presentó reacción cruzada con las TPIs de otros organismos a pesar de ser una enzima muy conservada; por mencionar un ejemplo: la identidad encontrada en la secuencia de aa de la TTPI y la TPI del humano, hospedero definitivo del parásito es del 59% ^{47,48} (**Fig 11**).

Ensayos de inhibición mostraron que los anticuerpos presentes en el suero anti-TTPI completa y anti-1/3 NH₂TTPI inhiben específicamente la actividad de la enzima en un alto porcentaje y que el suero normal de conejo aumenta en 9% la actividad de la TTPI, respecto al control, sin embargo este dato no es estadísticamente representativo pues la desviación estándar que presenta es muy alta(dato no mostrado).

Estos resultados de inhibición y la especificidad que muestran los anticuerpos de los sueros anti-TTPI, sugieren que estos no dañarían a las TPIs de otros organismos, como a las del cerdo y humano hospederos de *T. solium*. Por otro lado, puesto que el porcentaje de inhibición por ambos anti-sueros es muy similar, nos hace pensar que la región 1/3 NH₂ de TTPI es importante para estabilización y/o función catalítica de la enzima, aunque más estudios deben realizarse para esclarecer lo antes mencionado.

Podemos concluir que los resultados obtenidos en este estudio muestran que los anticuerpos podrían ser utilizados como inhibidores específicos de la TPI, abriendo las puertas para el diseño de nuevas moléculas inhibitoras que puedan ser utilizadas para el tratamiento y control del binomio teniosis-cisticercosis.

8. CONCLUSIONES

- Se encontró que los anticuerpos presentes en los sueros anti-TTPI y anti-1/3NH₂-TTPI son inhibidores específicos de la actividad de la TTPI.
- Se determinó que el primer tercio de la TTPI es una región importante para la función catalítica y/o estabilidad de la enzima.
- Se sugiere al primer tercio de la TTPI como un buen candidato para el diseño de inhibidores especie-específicos que permitan erradicar a la *T.solium*.

9. ANEXOS

Medios de cultivo, soluciones y amortiguadores.

MEDIO LB

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

Los componentes se disuelven y se aforan a un litro de agua, y el pH se ajusta a 7.0, se esteriliza en autoclave por 20 min a 15 Lb de presión en ciclo líquido.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO pH 7.4 (PBS), 1 L.

NaCl	137 mM
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	4.3mM
KH ₂ PO ₄	1.4mM

AMORTIGUADOR DE CARGADO PARA PROTEINAS

H ₂ O desionizada	3.8mL
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.0mL
SDS 10%	1.6mL
2-mercaptoetanol	0.4mL
Azul de bromofenol	50µg

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS 10X, 1L

Tris base	30.2 g
Glicina	188.0 g
SDS 10%	100 mL

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA PARA PROTEINAS, 1L

Metanol	20%
Tris base	25mM
Glicina	192mM

AMORTIGUADOR PARA PROTEASA TIPO XVII-B DE *S.aureus*, 10 MI

PBS 2X	2 mL
SDS 10%	0.2 mL
Glicerol 20%	2 mL
2-mercaptoetanol 2mM	1.4 μ L

AMORTIGUADOR TED 100/10/1, 100mL, pH 7.4.

Trietanolamina 100 mM	1.857 g.
EDTA 10 mM	2 mL de Stock 0.5 M
DTT 1mM	100 μ L de Stock 1M

Aforar al volumen indicado con agua bidestilada y ajustar el pH si es necesario.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

GEL DE POLIACRILAMIDA

Gel separador

	12%	15%
Acrilamida	2.1mL	2.6 mL
Tris-HCl	1.25 mL	1.5 mL
H2O	1.3 mL	1.5 mL
SDS 10%	100 μ L	120 μ L
Persulfato de amonio 10%	33 μ L	40 μ L
Temed	3.3 μ L	4 μ L

Gel concentrador

	12%	15%
Acrilamida	650 μ L	800 μ L
Tris-HCl	750 μ L	900 μ L
H2O	1.4 mL	1.65 mL
SDS 10%	30 μ L	36 μ L
Persulfato de amonio 10%	10 μ L	12 μ L
Temed	1.5 μ L	1.8 μ L

COLUMNA CHELATING HITRAP

1. Lavar con 2-5 mL de H₂O
2. Pasar 1 mL de níquel ²⁺ e incubar 2 minutos.
3. Lavar con 2 mL de H₂O.
4. Equilibrar con 5 mL de PBS-NaCl 0.5 M
5. Pasar la proteína
6. Lavar con 5 mL de PBS-NaCl 0.5 M
7. Eluir con 1 mL de imidazol 0.01M, 0.05M, 0.1 M, 0.25M y 0.5M.
8. Eluir con 3 mL de PBS-EDTA 50 mM.
9. Lavar la columna con 5 mL de H₂O.
10. Guardar la columna con etanol al 10 %, si no se va utilizar la columna por un tiempo prolongado.

NOTA: para evitar la formación de burbujas, ejercer presión constante al adicionar las soluciones.

10. REFERENCIAS

1. SARTI E. La teniosis y cisticercosis en México. *Salud Pública Mex* 1986; 28: 556-563.
2. WHITE AC Jr. neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med* 2000; 51: 187-206.
3. SCHANTZ P.M, WILKINS P.P, TSANG V.C.W. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: Scheld wm, Craig WA, Hughes jm, EDS. *EMERGING INFECTIONS 2*. Washington: ASM Press, 1998: 213-241.
4. CARPIO A. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 751-762.
5. BARRY M, KALDJIAN LC. Neurocysticercosis. *Sem Neurol* 1993.
6. FLISSER A. Taeniasis y cisticercosis due to *T.solium*. *Progress in clinical parasitology*. Boca Ratón (FL): CRC Press Inc., 1994; 4: 77-116.
7. SCHMIDTT GD, ROBERTS LS. Cestoidean: Form, function, and classification of the tapeworms. *Foundations of parasitology*. Idem, 6a, Mc Graw Hill, USA, 200.
8. DAVIS LE, KORNFELD M. Neurocysticercosis: neurologic, pathogenic, diagnostic and therapeutic aspects. *Eur Neurol* 1991.
9. NASH TE, NEVA FA. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cisticercosis. *N Engl J Med* 1984;311: 1492-1496.
10. ANTONIUK S. Epidemiología de la neurocisticercosis. *Rev Neurol* 199;29:331-334.
11. ROMAN G, SOTELO J, DEL BRUTO O. A proposal to declare neurocisticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ* 200; 78:399-406.

12. SÁNCHEZ A L, MEDINA M T, LJUNGSTRÖM I. Prevalence of taeniasis and cisticercosis in a population of urban residence in Honduras. *Acta Trop* 1998; 69: 141-149.
13. RODRÍGUEZ R, FRASSER A, ALLAN J C et al. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93: 57-67.
14. SÁNCHEZ A L, LINDBÄCK J, SCHANTZ P et al. A population- based, case-control study of *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93:247-258.
15. SARTI E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*. 1997; 3: 225-231.
16. FLISSER A, SARTI E, LIGHTOWLERS M, SCHANTZ P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Tropica*. 2003; 87: 43-51.
17. Organización panamericana de la Salud. Epidemiología y control de la teniosis y cisticercosis en América Latina. Washington, D.C; OPS/OMS; 1994.
18. RAJSHEKHAR V, JOSHI D.D, DOANH N. Q, VAN DE N, XIAONONG Z. *Taenia solium* taeniosis/cisticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Tropica*. 2003; 87: 53-60.
19. MAFOJANE N. A, APPLETON C.C, KRECEK R.C, MICHAEL L.M, WILLIGHAM A.L. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern of Africa. *Acta Tropica*. 2003; 87: 25-33.
20. FLISSER A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitology Today* 1988; 4: 131-137.
21. MEDINA MT, ROSAS E, RUBIO-DONNADIEU F, SOTELO J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Butern Med* 1990; 150: 325-327.

22. GARCIA HH, GILMAN RH, TSANG VC, GONZALEZ AE. Clinical significance of neurocysticercosis in endemic village. *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 176-178.
23. ONG S, TALAN DA, MORAN GJ, et al. Neurocysticercosis in radiographically image seizure patients in US emergency departments. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 608-613.
24. MARTINEZ J J, JARAMILLO C, ALUJA A et al. Epidemiología de la cisticercosis en cerdos de una comunidad rural del estado de Guerrero, México. *Vet Méx* 1997; 28: 281-286.
25. GARCIA H H, GONZALEZ A E, EVANZ C A, GILMAN R H. *Taenia solium* cisticercosis. *The Lancet*. 2003; 361:547-556.
26. ALLAN JC, AVILA G, GARCIA-NOVAL J, FLISSER A. Immunodiagnosis of teniosis by coproantigen detection. *Parasitology*. 1991; 101: 473-477.
27. CHAPMANA, VALLEJO V, MOSSIE KG, ORTIZ D, AGABIAN N, FLISSER A. Isolation and characterization of specie-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in egg detection assay. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 1283-1288.
28. ALLAN JC, WILKINS PP, TSANG VC, CRAIG PS. Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Trop* 2003;87(1):87-93.
29. CREASY JL, ALARCONJJ. Magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. *Topics in Magnetics Resonance Imaging* 1994.
30. TSANG VC, BRAND JA, BOYER AB. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis. *J. Infectd. Dis* 1989; 59:50-59.
31. SARTI E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Publica de México* 1997; 39(3): 225-231.

32. NOM-021-SSA2-1994, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DEL BINOMIO TENIOSIS/CISTICERCOSIS EN EL PRIMER NIVEL DE ATENCIÓN MÉDICA. Secretaría de Salud 1994.
32. CRUZ M, CRUZ I, HORTON J. Albendazole vs praziquantel in the treatment of cerebral cysticercosis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991.
33. HERRERA L, RAMÍREZ T, ROCRIGUEZ U, CORONA T, SOTELO J, LORENZO M, RAMOS F, VERDOFER I, GEBHART E, OSTROSKY P. Possible association between *Taenia solium* and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2000.
34. SCHANTZ P, CRUZ M, SARTI E, PAWLOSKI Z. Potencial erradicability of teniosis and cisticercosis. *Bull Panam Health Organ* 1993; 27: 397-403.
35. SARTI E, RAJSHEKHAR V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cisticercosis. *Acta Tropica* 2003; 87: 137-143.
36. LEHNINGER A et al. principios de Bioquímica. Barcelona 1995, 2ª edición, pp 400-421
37. TIELENS AGM. Energy generation in parasitic helminths. *Parasitology today* 1994; 10: 346-352.
38. KOMUNIECKI R, B G HARRIS. Carbohydrate and energy metabolism in helminths. In *Biochemistry and molecular Biology of parasites*, J.J.Marr and M. Müller (eds). Academic Press. NY 1995; pp 49-66.
39. SMYTH JD, McMANUS DP. The adult: carbohydrate metabolism. In: SMYTH JD, McMANUS DP, editors. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press 1989; pp 77-113.
40. ALBERT T, BANNER DW, BLOOMER AC, et al. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triosaphosphate isomerase. *Philos Trans R Soc Lond B* 1981; 293:159-171.

41. WIERENGA RK, NOBLE MEM & DAVENPORT RC. Comparison of the refined crystal structure of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J.Mol. Biol* 1992; 224:1115-1126.
42. BRÄNDÉN CI. The TIM barrel- The most frequently occurring folding motif in proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 1991; 1:978-983.
43. BORCHERT TV, ABAGYAN R, JAENICKE R , WIERENGA RK. Design, creation and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc Natl. acad.sci* 1994;91: 1515-
44. LANDA A, ROJO-DOMINGUEZ- JIMÉNEZ L, FERNÁNDEZ-VELASCO A. Sequencing, expression and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *Eur J Biochem* 1997; 247: 348- 355.
45. MAQUAT LE, CHILCOTE R, RYAN PM. Human triosephosphate isomerase cDNA and protein structure. *J. Biol Chem* 1985.
46. OROSZ FBG, VERTESSY S, HOLLAN M, HORANYI and J OVADI. Triosephosphate isomerase deficiency: Predictions and facts. *Journal of Theoretical Biology*; 182: 437-447.
47. JIMÉNEZ L, VIBANCO-PEREZ N, NAVARRO L, LANDA A. cloning, expression and characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology* 2000; 30: 1007-1012.
48. MAES D, JP ZELLEN, N THANKY, N BEAUCAMP, M ALVAREZ, MM THI, J BACKMANN, JA MARTIAL, L WYNS, R JAENICKE, RK WIERENGA. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structure. *Protein* 1999; 37: 441-453
49. GOMEZ-PUYOU A, SAAVEEDRA-LIRA E, BECKER I, ZUBILLAGA RA, ROJO-DOMINGUEZ A, PEREZ-MONTFORT R. Using evolutionary changes to achieve species-

specific inhibition of enzyme action- studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry and Biology* 1995; 2: 847-855.

50. WIERENGA R, HOL W. Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. *EMBO J* 1987; 6: 215-221.

51. RODRIGUEZ-ROMERO A, HERNANDEZ-SANTOYO A, DEL POZO L, KORNHAUSER A, FERNÁNDEZ-VELASCO A. Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol* 2002; 322: 669-675.

52. OSTOA-SALOMA P, GARZA-RAMOS G, RAMIREZ J, BECKER I, BERZUNZA M, LANDA A, GOMEZ-PUYOU A, PEREZ-MONTFORT R. Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Biochem* 1997; 244:700-705.

53. ESPINOSA-FONSECA LM, TRUJILLO-FERRARA JG. Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-tri-panosomal drug design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14:3151-3154.

54. VELANKER S, RAY S, GOKHALE R, BALARAM H, MURTHY M. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 1997; 5: 751-761.

55. JOURBERT F, NEITZ AWH, LOUW AI. Structure Based Inhibitor Screening: A Family of Sulfonated Dye Inhibitors for malaria Parasite Triosephosphate Isomerase. *Proteins* 2001; 45: 136-143.

56. JIMÉNEZ L, FERNÁNDEZ-VELASCO A, WILLMS K, LANDA A. A comparative study of biochemical and immunological properties of Triosephosphate Isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *J. Parasitol* 2003; 89 (2): 209-214.

57. PACE CN, VAJDOS F, FEE L, GRIMSLEY G, GRAY T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 1995; 4: 2411-2423.

58. BAKKER BM, WESTERHOFF HV, OPPERDOES FR, MICHELS PAM. Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2000; 106:1-10.
59. OPPERDOES FR, MICHELS PAM. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *International Journal of Parasitology* 2001; 31: 482-490.