



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

*Taenia solium*: anticuerpos como inhibidores  
de la actividad de la Triosafosfato isomerasa (TPI)

**Dr. Víctor Sanabria Ayala**



**Ciencia Nueva**  
SECRETARÍA UNAM

**Dr. Abraham Landa Piedra**  
**Asesor**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

***Taenia solium*: anticuerpos como inhibidores de la actividad de la  
Triosafofato isomerasa (TPI)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**QFB. VICTOR SANABRIA AYALA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2013.**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **SANABRIA AYALA VÍCTOR** con número de cuenta 96124813 con la tesis titulada "**Taenia solium: ANTICUERPOS COMO INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA (TPI)**", realizada bajo la dirección del **DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA**:

Presidente: DRA. GOHAR GEVORGYAN MARKOSIAN  
Vocal: DR. ABEL MORENO CÁRCAMO  
Secretario: DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO  
Suplente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Suplente: DRA. GLADIS FRAGOSO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de agosto de 2013



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue consolidado gracias al Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la formación recibida a través de los tutores integrantes.

Asimismo, agradezco el apoyo recibido a través de la beca recibida para la realización de los estudios de Doctorado del Programa de Becas del CONACyT (No. de becario: 204074), en el Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además, este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el contrato 80134-M, por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con los contratos IN207507-3 e IN206708.

Agradezco a los Doctores Adela Rodríguez Romero y Armando Gómez Puyou, miembros de mi comité tutor, por las observaciones y sugerencias oportunas que enriquecieron este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

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

Al Dr. Abraham Landa Piedra, por la confianza otorgada al permitirme formar parte de su grupo, por el apoyo brindado y los ratos de convivencia.

A la M. en C. Yolanda Medina Flores y la Q. Araceli Zavala Carballo por su asesoría y colaboración en este proyecto, asimismo, agradezco a las autoridades académicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

A los Doctores Gohar Gervorgyan Markosian, Abel Moreno Cárcamo, Adela Rodríguez Romero, Luis Ignacio Terrazas Valdés y Gladis Fragozo González por la revisión exhaustiva y correcciones hechas a este trabajo.

A los Doctores Anayetzin Torres, Felipe Vaca y Ricardo Parra, por todos los momentos amenos, de estrés y de pipeteos que compartimos en el Laboratorio.

A la M. en C. Alicia Ochoa por el apoyo técnico brindado a lo largo de la realización de este proyecto.

A Magaly Ruiz y Odin Pérez, quienes siempre me han recibido cordialmente en el seno de su hogar haciéndome sentir uno de los suyos.

A mis amigos entrañables y los más añejos: Angélica Moscosa y Francisco Gabriel Ojeda.

A los grandes amigos que me ha dado la Universidad, y que siempre han tenido los mejores gestos hacia mi persona: Josué Álvarez, Jocabed Alfaro, Alejandra Campos, Laraset Belmont, Héctor Sucilla, Marco Romo, Luis Zapata, Abril Balandra, Claudia De la Rosa, Lorena De Anda, Blanca E. Hernández G., Viridiana Seng, Ingrid A. Membrillo y Edgar Guerrero.

A la familia Bernardino Rojas: Crisanto, Martha, Rocío, Angélica, Kary, Andrés, Humberto, Daniel, Aldo, Beto, Ángel y Sofía, por compartir conmigo tantos momentos importantes, pláticas afables, enseñanzas, consejos, y por su valiosa amistad y apoyo incondicional.

A mis primos José Luis y Gerardo Jiménez por todos los momentos gratos de convivencia.





# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ABREVIATURAS .....	13
RESUMEN.....	15
ABSTRACT .....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1 <i>Taenia solium</i> .....	18
1.2 Biología de <i>Taenia solium</i> .....	19
1.2.1 Generalidades .....	19
1.2.1.1 Morfología.....	19
1.2.1.2 Sistema de transporte y excreción/secreción .....	22
1.2.1.3 Sistema nervioso.....	23
1.2.1.4 Sistema muscular.....	24
1.2.1.5 Sistema reproductor .....	25
1.2.1.6 Metabolismo .....	25
1.2.2 Ciclo de vida.....	26
1.2.3 Manifestaciones clínicas .....	28
1.2.3.1 Teniosis.....	28
1.2.3.2 Cisticercosis .....	29
1.2.4 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune .....	29
1.2.5 Diagnóstico .....	31
1.2.5.1 Teniosis.....	31
1.2.5.2 Cisticercosis .....	32
1.2.6 Tratamiento .....	33
1.2.6.1 Teniosis.....	33
1.2.6.2 Cisticercosis .....	33
1.2.7 Medidas de control .....	34
1.2.8 Vacunas.....	35
1.3 Vía glucolítica.....	35
1.3.1 Triosafofato isomerasa (TPI).....	37
1.3.1.1 Triosafofato isomerasa en parásitos .....	40
1. 4 Anticuerpos monoclonales .....	42
3. HIPÓTESIS.....	46
4. OBJETIVO .....	47
5. MATERIALES .....	48

<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
6.1 Obtención de antígenos .....	48
6.1.1 TTPI recombinante.....	48
6.1.2 Fragmento 1/3NH <sub>2</sub> TTPI .....	49
6.2 Obtención de anticuerpos monoclonales .....	49
6.3 Caracterización de anticuerpos monoclonales .....	50
6.4 Isotipificación.....	51
6.5 Obtención de los fragmentos de unión a antígeno (Fabs).....	51
6.6 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	52
6.7 Obtención de mimótopos .....	52
6.8 Selección de clonas de fagos. ....	53
6.9 Preparación del ADN de fagos para secuencia .....	54
6.10 Reamplificación y titulación de fagos .....	54
6.11 Obtención de anticuerpos policlonales contra mimótopos, proteínas y péptidos sintéticos .....	55
6.12 Purificación de anticuerpos. ....	56
6.13 Ensayo inmunoenzimático (ELISA). ....	56
6.14 Inmunoelectrotransferencia (IET). ....	57
6.15 Ensayos de actividad de la TTPI.....	57
6.16 Ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI .....	58
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
7.1 Primera parte.....	59
7.1.1 Obtención de clonas de anticuerpo monoclonal .....	59
7.1.2 Caracterización general del anticuerpo monoclonal 4H11D10B11.....	61
7.1.3 Ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la TTPI con el AcMo 4H11D10B11 y Fabs.....	63
7.1.4 Cinética de inhibición .....	65
7.1.5 Identificación del epítipo del AcMo 4H11D10B11 .....	66
7.2 Segunda parte.....	69
7.2.1 Obtención del fragmento 1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	69
7.2.2 Mimótopos de 1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	72
7.2.3 Ensayo de actividad con anticuerpos anti-mimótopos del 1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	74

7.2.4 Identificación de epítomos .....	75
8. DISCUSIÓN.....	79
9. CONSIDERACIONES.....	90
10. CONCLUSIONES .....	92
11. ANEXOS .....	93
11.1 Apéndice I: Anticuerpos.....	93
11.1.1 Paratopo .....	94
11.1.2 Epítopo .....	95
11.1.3 Mimótopos.....	96
11.2 Apéndice II: Despliegue en fagos (PhD).....	97
11.2.1 Fagos filamentosos .....	97
11.2.2 Proteína III.....	98
11.2.3 Proteína VIII .....	99
11.3 Apéndice III: Preparación de soluciones, medios y geles. ....	100
11.3.1 Soluciones.....	100
11.3.2 Medios .....	102
11.3.3 Geles .....	102
11.4 Apéndice IV: Técnicas .....	103
12. BIBLIOGRAFÍA.....	104

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1A</b> Adulto de <i>Taenia solium</i> .....	20
<b>Figura 1B</b> Morfología del escólex de <i>Taenia solium</i> .....	20
<b>Figura 2A</b> Cisticerco celuloso.....	21
<b>Figura 2B</b> Cisticerco racemoso.....	21
<b>Figura 3A</b> Micrografía de un huevo de <i>Taenia solium</i> .....	22
<b>Figura 3B</b> Eclosión de huevo de <i>Taenia solium</i> .....	22
<b>Figura 4</b> Microtricas .....	23
<b>Figura 5</b> Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .....	28
<b>Figura 6</b> Glucólisis.....	37
<b>Figura 7</b> Reacción enzimática de la TPI.....	38
<b>Figura 8</b> Triosafosfato isomerasa.....	39
<b>Figura 9</b> Tamizaje de hibridomas .....	60
<b>Figura 10</b> Inhibición de la actividad de la TTPI por sobrenadantes.....	60
<b>Figura 11</b> Especificidad del AcMo 4H11D10B11.....	62
<b>Figura 12</b> Inmunolocalización de la Triosafosfato isomerasa de <i>Taenia solium</i> (TTPI).....	62
<b>Figura 13</b> Ensayos de actividad de la TTPI con el AcMo 4H11D10B11.....	63
<b>Figura 14</b> Inhibición de la actividad de la TTPI por Fabs.....	64

<b>Figura 15 A</b>	Análisis cinético de la inhibición de la actividad de la TTPI.....	65
<b>Figura 15 B</b>	Análisis cinético de la inhibición de la actividad de la TTPI.....	66
<b>Figura 16</b>	Identificación del sitio de unión del AcMo 4H11D10B11.....	67
<b>Figura 17</b>	Alineación de secuencias de mimótopos con TPI-56.....	68
<b>Figura 18</b>	Unión del AcMo 4H11D10B11 a mimótopos.....	69
<b>Figura 19</b>	Obtención del fragmento 1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	70
<b>Figura 20</b>	Especificidad de los anticuerpos anti-1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	71
<b>Figura 21</b>	Inhibición de la actividad de la TTPI por anticuerpos anti-1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	71
<b>Figura 22</b>	Consenso de los mimótopos pertenecientes a la región 1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	73
<b>Figura 23</b>	Inmunoelectrotransferencia de sueros anti-mimótopos con la TTPI.....	74
<b>Figura 24</b>	Inhibición de la TTPI por los anticuerpos anti-mimótopos.....	75
<b>Figura 25</b>	Identificación del sitio de unión de los anticuerpos anti-PDTS16.....	76
<b>Figura 26</b>	Ubicación de consensos en el fragmento 1/3NH <sub>2</sub> TTPI.....	77
<b>Figura 27</b>	Alineación de consensos con péptidos sintéticos.....	78
<b>Figura 28</b>	Estructura de un anticuerpo .....	95
<b>Figura 29</b>	Despliegue de péptidos en fagos.....	98

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AcMo	Anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ADNc	Ácido desoxirribonucleíco complementario
ADNcs	Ácido desoxirribonucleíco 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'-dideoximidina trifosfato
EDTA	Ácido etiledinitrilo tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
GST <sub>25</sub>	Glutación transferasa de 25 kDa
kDa	kiloDaltones
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	medio Luria-Bertani
μL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
μm	Micrómetros

NADH	Nicotinamida Adenina dinucleótido (forma reducida)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
PBS	Amortiguador salino de fosfatos, pH 7.4
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol 8000
ufp	Unidad formadora de placa
pH	Potencial de Hidrógeno
P <sub>i</sub>	Ortofosfato inorgánico
pmol	Picomoles
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador Tris-HCl/NaCl
TE	Amortiguador Tris-HCl/EDTA, pH 7.4
TED	Amortiguador Trietanolamina/EDTA/ditiotreitol
TGST	Glutación transferasa de <i>Taenia solium</i>
TPI	Triosafosfato isomerasa
TTPI	Triosafosfato isomerasa de <i>Taenia solium</i>
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

## Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo principal encontrar anticuerpos que inhibieran específicamente la actividad de la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* (TTPI), y a su vez, determinar las regiones importantes para la catálisis.

Como primera parte de este estudio, fueron producidos varios anticuerpos monoclonales que reaccionaban positivamente con la TTPI, tanto por ELISA como por IET, indicando que estos anticuerpos reconocen epítomos lineales. De todos ellos, sólo uno fue capaz de inhibir la actividad enzimática en un 74 %. El análisis de la cinética enzimática reveló que el anticuerpo 4H11D10B11 sigue un patrón de inhibición no competitiva, es decir, no se une al sitio catalítico. Usando péptidos sintéticos que corresponden a zonas no conservadas de la enzima, pudimos identificar que el sitio de unión se encuentra dentro de la hélice 6, cercana al asa 6, la cual fija el sustrato al centro catalítico. Adicionalmente, tamizamos una biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en fagos filamentosos (dodecapéptidos) y encontramos los péptidos mimótopos respectivos al sitio de unión del monoclonal, de esta forma afinamos la identificación del sitio de unión, revelando que el centro del epítomo corresponde a la secuencia <sup>193</sup>WIRKHVDAGIAD<sub>204</sub>.

En la segunda parte del estudio, obtuvimos por digestión y purificación el primer tercio de la enzima de la región amino terminal (1/3NH<sub>2</sub>TTPI), y anticuerpos hechos contra este fragmento demostraron tener la capacidad de inhibir la actividad enzimática en un 75 %. De igual forma, una biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en fagos fue tamizada, y el análisis de las clonas obtenidas reveló la presencia de cuatro consensos marcados, VPTXPI, VPTXXI, LTPGQ, y DPLPR; fueron producidos anticuerpos policlonales contra algunas clonas representativas de cada consenso. Encontramos que los anticuerpos producidos contra la clona PDTS16, que tiene la secuencia DSVTPTSVMVA, fueron

capaces de inhibir la actividad enzimática en 45 %. Asimismo, determinamos que el sitio de unión de estos anticuerpos inhibidores corresponde a la secuencia <sup>18</sup>SHINTFFDTLQK<sup>29</sup> y que está contenida en la hélice 1, la cual se encuentra en la periferia de la enzima.

## Abstract

In the present study, we obtained a monoclonal antibody (4H11D10B11 mAb) against Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPI). This antibody recognized the enzyme, by both ELISA and Western blot, and it is able to inhibit the enzymatic activity in 74%. Moreover, the antigen-binding fragments (Fabs), retained almost the same inhibitory effect. We determined the binding site by using synthetic peptides containing sequences from different non-conserved regions of the TTPI. The epitope recognized by the monoclonal antibody was located on the peptide TTPI-56 (<sup>178</sup>ATPAQAQEVHKVVRDWIRKHVDAGIADKAR<sup>208</sup>). Moreover, an analysis of mimotopes obtained with the 4H11D10B11 mAb, suggests that the epitope spans the sequence <sup>193</sup>WIRKHVDAGIAD<sup>204</sup>. This epitope is situated within the helix 6, next to the loop 6, an essential active loop during catalysis. The antibody did not recognize TPis from man and pig, the definitive and intermediary hosts of *Taenia solium*, respectively. Additionally, it does not bind to the catalytic site, since kinetic analysis demonstrated that inhibition has a non-competitive profile.

On the other hand, we obtained polyclonal antibodies against the first third part of TTPI (1/3NH<sub>2</sub>TTPI), which demonstrated to have inhibitory effect on catalytic activity, by about 74 %. Using these antibodies we screened a phage displayed peptide library (12 mer) and several clones were obtained with four marked consensus, VPTXPI, VPTXXI, DPLPR and LTPGQ. Rabbit polyclonal antibodies were raised against selected phage clones. Only two polyclonal antibodies were effective to inhibit enzymatic activity in about 45 %. Moreover, we performed localization of binding site using synthetic peptides belonging to regions of the enzyme, we found that inhibitory polyclonal antibodies recognized the first two peptides from the amino terminal region, this outcome demonstrated that the binding site corresponds to the sequence <sup>18</sup>SHINTFFDTLQK<sup>29</sup> located at the helix 1.

## **1. Introducción**

### **1.1 *Taenia solium***

La cisticercosis es causada por la forma larvaria (metacestodo o cisticerco) de *Taenia solium*, que se aloja en diversos tejidos y ocasiona graves daños, principalmente en el sistema nervioso central (SNC) del ser humano, la modalidad más grave es la neurocisticercosis, que frecuentemente causa discapacidad física y en ocasiones la muerte. 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 la cisticercosis, tanto humana como porcina.<sup>1</sup>

La teniosis y la cisticercosis 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 altas,<sup>2</sup> aunque en la actualidad se reporta el surgimiento de casos en países desarrollados tales como EUA,<sup>3,4</sup> debido al creciente número de migración poblacional y en menor medida los viajes turísticos.<sup>5</sup>

En Estados Unidos la neurocisticercosis era raramente diagnosticada antes de 1980, pero con el uso de nuevas tecnologías, hubo un incremento en la detección de casos de neurocisticercosis, los grupos de casos más amplios fueron reportados en California, con una alta incidencia entre los migrantes mexicanos y de Centroamérica. Actualmente, entre 1000 y 2000 casos son diagnosticados al año en los Estados Unidos, la gran mayoría pertenecientes a los migrantes hispanos.<sup>6,7</sup>

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) y mucha más padecen neurocisticercosis.<sup>8</sup> El número de personas con neurocisticercosis es posiblemente mucho más alto de lo reportado en estudios epidemiológicos y se calcula que unas 50 millones de personas están infectadas y 50 mil personas fallecen anualmente por causa de este padecimiento.<sup>9</sup>

## **1.2 Biología de *Taenia solium***

### **1.2.1 Generalidades**

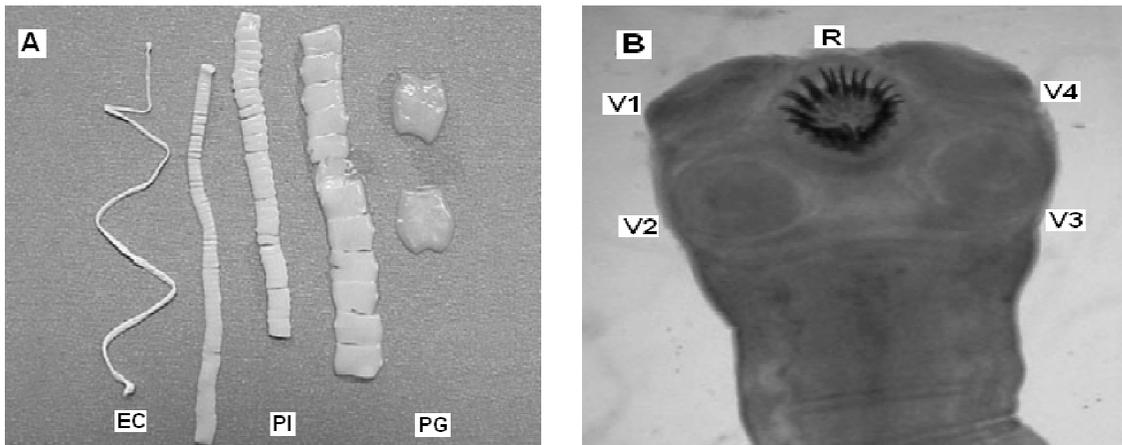
La *Taenia solium* (Linneo 1758) pertenece al phylum Platyhelminthes, a la clase Cestoidea, a la subclase Eucestoda, al orden Cyclophyllidea y a la familia Taeniidae. Lo más sobresaliente de los cestodos es la ausencia de boca y aparato digestivo, lo cual los diferencia de los tremátodos y nemátodos. También se diferencian por la estructura de su cuerpo, el cual es segmentado. Los ciclofilideos, están dentro de un grupo de cestodos que se caracterizan por tener glándulas o células vitelógenas compactas, y un escólex con cuatro ventosas.<sup>10</sup>

#### **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 róstelo 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.<sup>11, 12</sup> Cuando los proglótidos son expulsados, estos se deshacen dejando los huevos en el ambiente.<sup>13</sup>

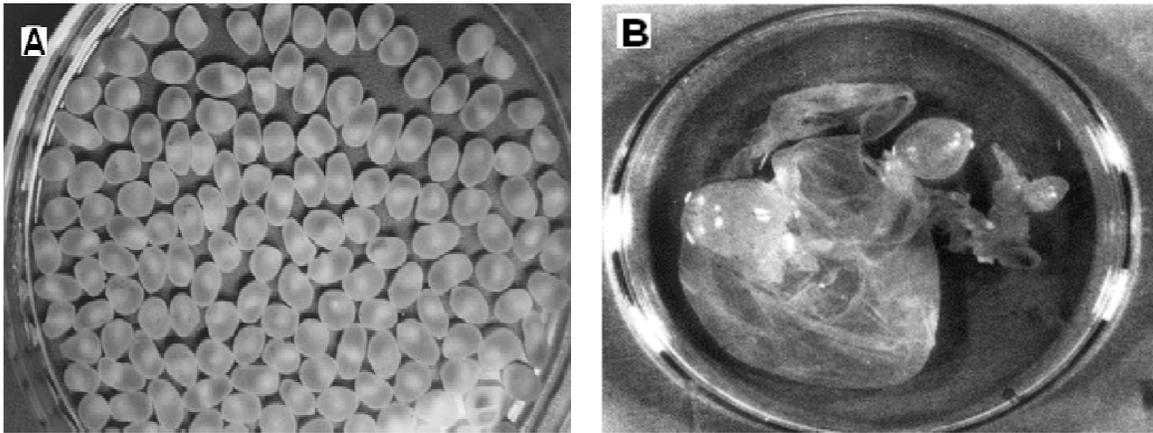


**Figura 1.** A) Fotografía de un gusano adulto, en la cual se pueden observar las diferentes secciones que lo componen, a la izquierda se encuentra el segmento que comprende el escólex y el cuello (EC), en el centro los proglótidos inmaduros (PI) y a la derecha los proglótidos grávidos (PG). B) Escólex. Pueden observarse los órganos de fijación, las cuatro ventosas (V1-V4), y en la parte central el rostellum armado (R). Figuras tomadas de<sup>39</sup>

### 1.2.1.1.2 Cisticerco

El cisticerco localizado en el cerebro humano presenta dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. El de tipo celuloso que también se presenta en músculo (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 colágeno.<sup>14</sup> 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.<sup>15</sup> 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 con irregularidades.<sup>16</sup>

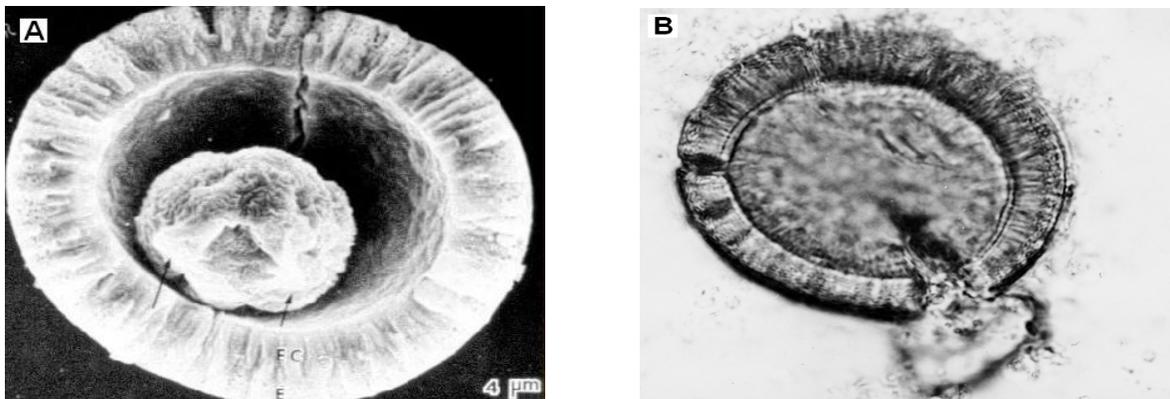


**Figura 2.** A) Cisticercos de tipo celuloso, extraídos del músculo esquelético de un cerdo infectado naturalmente (tomada de <sup>39</sup>). B) Cisticerco de tipo racemoso, extraído de la cisterna basal de un cerebro humano (tomada de <sup>11</sup>).

### 1.2.1.1.3 Huevo

Los huevos son esféricos y miden de 30-40  $\mu\text{m}$ , en su interior alojan una oncósfera o embrión hexacanto (figura 3A), debido a que presenta seis pares de ganchos. La capa más externa del huevo es el vitelo, la siguiente es la membrana embriofórica que rodea al embrióforo, la cual 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 al entrar en contacto con las enzimas digestivas se vuelve permeable, y a su vez éstas lo activan. El embrión activado pone en movimiento sus ganchos para poder salir de la membrana oncosferal (figura 3B).<sup>17</sup> Los huevos presentan una alta resistencia a condiciones ambientales adversas, por lo que una vez expulsados por el hospedero se mantienen viables por periodos largos, se ha calculado que pueden permanecer viables hasta un máximo de 8 meses en un ambiente húmedo y cálido,<sup>18</sup> condiciones que se presentan en lugares donde se practica el fecalismo al aire libre, ya sea en el campo o en las áreas domésticas circundantes, circunstancia que facilita a los cerdos el acceso a la materia fecal.

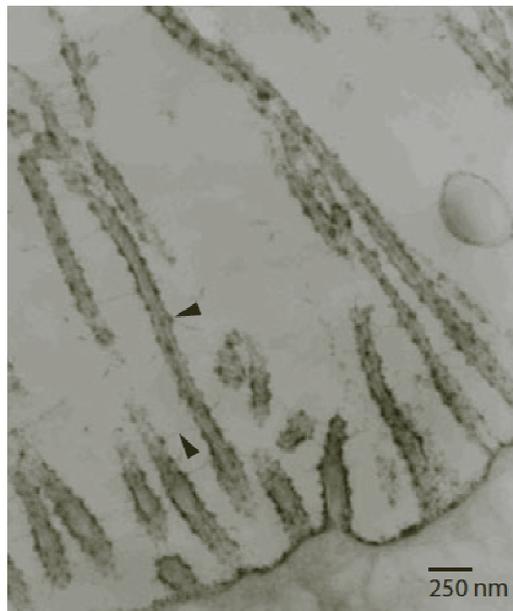


**Figura 3.** A) Micrografía de un huevo de *T. solium* en el que se observa claramente la oncósfera o embrión hexacanto (tomada de <sup>11</sup>). B) Fotografía de un huevo en eclosión (tomada de <sup>19</sup>).

#### 1.2.1.2 Sistema de transporte y excreción/secreción

El cestodo al carecer de órganos digestivos realiza su alimentación absorbiendo los nutrimentos, ya digeridos por el hospedero, a través de la superficie tegumentaria. El tegumento está cubierto por una membrana plasmática o tegumentaria que rodea a innumerables microtricas, que son proyecciones en forma de vellosidades que maximizan la superficie de absorción (figura 4). La superficie más externa de la membrana

tegumentaria está llena de un glicocálix, compuesto por glicoproteínas producidas activamente por los citones subtegumentales; por debajo de la membrana tegumentaria se encuentra una gran cantidad de citoplasma, provisto de una gran cantidad de vacuolas de diferentes tamaños. Su sistema excretor es rudimentario y es referido como sistema protonefridial, está constituido por células en flama, capilares y tubos colectores<sup>20</sup>. 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.<sup>21</sup>



**Figura 4.** Micrografía electrónica en la que pueden observarse las microtricas del tegumento, las flechas indican la presencia de glicocalix. Figura tomada de <sup>22</sup>

### 1.2.1.3 Sistema nervioso

El sistema nervioso de los cestodos parte del escólex y presenta el diseño típico ortogonal, término introducido por Reisinger en 1925, el cual describe al sistema nervioso de estos gusanos. 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. 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 inervados, y las terminaciones nerviosas alrededor del poro genital son más abundantes que en otras áreas del tegumento estrobilar.<sup>23</sup> Estudios inmunohistoquímicos han mostrado sitios con actividad de acetilcolinesterasa y la presencia de neuropéptidos y de la 5- hidroxitriptamina (serotonina).<sup>24</sup>

#### **1.2.1.4 Sistema muscular**

El músculo consiste de dos porciones: las miofibrillas contráctiles y los miocitones no contráctiles, como en otros platelmintos, los 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. 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 róstelo y ventosas, circular, longitudinal y transversal en el tejido tegumentario y una red subcuticular en el canal en espiral invaginado.<sup>25</sup> La porción contráctil contiene actina, paramiosina y fibrillas de miosina.<sup>26</sup>

### **1.2.1.5 Sistema reproductor**

Los proglótidos maduros poseen cientos de testículos y un ovario trilobulado (dos lóbulos grandes y uno pequeño), por lo cual son hermafroditas. El ovario libera los óvulos hacia el oviducto, donde se lleva a cabo la fertilización, la cual ocurre por autoinseminación de un proglótido o por inseminación cruzada entre proglótidos del mismo gusano cuando el parásito se encuentra doblado sobre sí mismo, o bien entre proglótidos de diferentes gusanos cuando hay dos o más individuos en el mismo hospedero. Los proglótidos grávidos muestran un útero con 7 a 15 ramas uterinas, número que es mayor en *T. saginata* y permite hacer una diferenciación morfológica entre estas especies.<sup>27</sup>

### **1.2.1.6 Metabolismo**

Los nutrientes son absorbidos a través del tegumento por transporte activo, difusión facilitada y difusión simple. Los cisticercos tienen la capacidad de llevar a cabo la pinocitosis, pero aun no está claro si los gusanos adultos poseen esta habilidad. La glucosa es la principal molécula que puede ser absorbida, de igual forma la galactosa. Otros monosacáridos pueden ser absorbidos, pero sólo la glucosa y galactosa pueden ser metabolizadas. Como en muchos otros organismos, la absorción de la glucosa está acoplada al mecanismo de una bomba de sodio que permite la absorción en contra de un gradiente de concentración. Posteriormente, la glucosa puede ser almacenada en forma de glucógeno. Se han identificado dos transportadores de glucosa: el TGTP1, abundante en estructuras de la pared vesicular en el cisticerco así como en el parásito adulto; y el TGTP2, que se localiza en la superficie tegumentaria del cisticerco.<sup>28</sup> El metabolismo de los cestodos es similar al de los trematodos. Ellos son anaerobios facultativos, utilizan tanto rutas metabólicas aeróbicas como anaeróbicas dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio<sup>29</sup> y obtienen sus nutrientes por difusión facilitada a través de la pared

vesicular; la mayor parte de su energía proviene de la glucólisis. No almacenan energía en forma de lípidos, la almacenan en forma de glucógeno.<sup>30</sup> Los altos requerimientos de glucosa en los cestodos fueron demostrados en experimentos con *Hymenolepis nana*, los cuales mostraron que estos gusanos fueron expulsados o desprendidos de la mucosa cuando la glucosa fue eliminada de la dieta del hospedero (humano).<sup>31</sup>

Se ha observado que dos de los fármacos usados en el tratamiento de la cisticercosis causada por *T. solium*, el albendazol y el praziquantel, inhiben la captación de glucosa y alteran los niveles de glucógeno y la absorción de nutrientes. En experimentos realizados con ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* y tratados con los fármacos mencionados, se evidenció que la glucólisis en el parásito se altera, por lo que utiliza fuentes de energía alternas como la del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la oxidación de ácidos grasos.<sup>32, 33</sup>

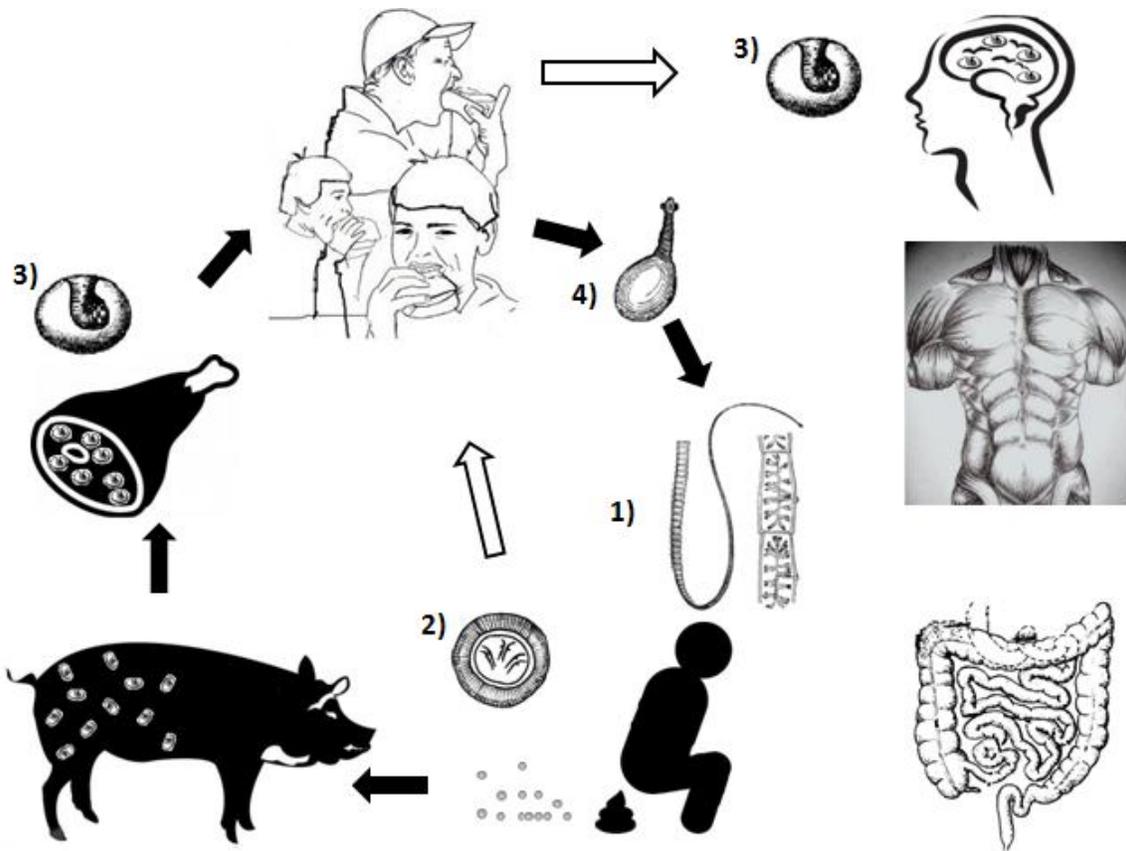
### **1.2.2 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *T. solium* (figura 5) incluye a dos hospederos mamíferos: el humano y el cerdo, el primero el hospedero definitivo, y el segundo el hospedero intermediario. Los humanos también pueden formar parte del ciclo como hospedero intermediario accidental al ingerir alimentos contaminados con los huevos de *T. solium*. Un gusano adulto (1) puede permanecer en su hospedero por cerca de 20 años, induciendo una sintomatología mínima.<sup>34</sup> 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.<sup>35</sup> Cuando el cerdo ingiere heces humanas, alimentos o agua contaminados con los huevos del parásito (2), el embrióforo, que protege al embrión (oncósfera), es deshecho por acción del ácido clorhídrico, enzimas digestivas y bilis a su paso por el tracto intestinal, y de esta manera el embrión

hexacanto penetra la mucosa y al alcanzar la circulación sanguínea tiene acceso a diferentes tejidos en los que puede situarse, particularmente presenta tropismo por el músculo estriado, corazón, cerebro, ojo y tejido subcutáneo, donde se establece y desarrolla durante un periodo de dos meses hasta alcanzar la segunda fase de su desarrollo, el cisticerco (3).<sup>8</sup> El cisticerco en el humano tiene tropismo por el sistema nervioso central, músculo estriado y ojo.

Finalmente, el ciclo se completa, cuando el hospedero definitivo consume carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida parasitada con cisticercos. Cuando uno de los cisticercos viables entra en contacto con los fluidos gástricos e intestinales se activa y evagina su escólex (4),<sup>36</sup> 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.<sup>37</sup> Aproximadamente en un periodo de 3 a 4 meses después de la ingestión del cisticerco, comienzan a aparecer los proglótidos grávidos en las heces.<sup>8</sup>

Los cisticercos se mueren a temperaturas de 45-50°C, pero pueden sobrevivir en trozos gruesos de carne, ya que aumenta la probabilidad de que la zona interna no sea cocinada adecuadamente.<sup>6</sup> 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.<sup>38</sup>



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Taenia solium*. Intervienen dos hospederos mamíferos, uno intermediario, el cerdo, y el definitivo y único, el humano. 1) Gusano adulto que se encuentra en el intestino delgado del hospedero definitivo (teniosis), en sus excretas dispersa millones de huevos (2) al ambiente al practicar el fecalismo al aire libre. Los cerdos criados rudimentariamente tienen acceso a las excretas del teniósico y de esta manera se infectan y desarrollan la forma larvaria (3), que generalmente se aloja en el tejido muscular; el humano puede infectarse accidentalmente al consumir agua o alimentos contaminados con huevos (cisticercosis). El ciclo se cierra cuando el humano come carne de cerdo insuficientemente cocida e infectada con cisticercos viables, que a su paso por el tracto digestivo se activan, evaginan (4) y se adhieren en el intestino delgado para desarrollarse a la fase adulta.

### 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.<sup>39</sup> 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 con periodos de constipación y el prurito anal es frecuente.<sup>40</sup>

### **1.2.3.2 Cisticercosis**

La forma larvaria comunmente infecta el sistema nervioso central, causando neurocisticercosis; este tropismo se ha atribuido a los aspectos biomecánicos de la circulación, junto al alto grado de concentración de glucosa o glucógeno del tejido.<sup>2</sup> 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.<sup>1</sup>

La neurocisticercosis es causa de la epilepsia de aparición tardía en el 58% de los pacientes de nuestro país.<sup>41</sup> 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.<sup>12</sup>

### **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 anatómicas y

funcionales 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.<sup>42</sup> Por otra parte, experimentos realizados en conejos, demostraron que cuando éstos 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, éstos 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 causa que el cisticerco no logre desarrollarse.<sup>43</sup>

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.<sup>44</sup> Estudios posteriores han demostrado la presencia de un receptor para la fragmento Fc de IgG en la superficie del cisticerco,<sup>45</sup> además, este parásito cuenta con proteasas que digieren a las inmunoglobulinas,<sup>46</sup> para ser utilizadas como nutrientes.

El cisticerco cuenta con mecanismos más sofisticados 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;<sup>47</sup> la teniastatina que inhibe ambas vías de la activación del complemento<sup>48</sup> y tiene una ligera modulación en la actividad leucocitaria;<sup>49</sup> polisacáridos polisulfatados que activan al complemento lejos del parásito.<sup>50</sup> El factor de metacestodo (MF), complejo formado por ARN y proteína,<sup>51</sup> 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.<sup>52</sup> Además, cuenta con una cisteína proteasa<sup>53</sup> que disminuye la cantidad de linfocitos T cooperadores vía apoptosis.<sup>54</sup>

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 dismutasa<sup>55</sup> y la Glutación transferasa<sup>56, 57, 58</sup>

## **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* o 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 antiparasitario, aunque no siempre se obtienen.<sup>39</sup>

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,<sup>59, 60, 61</sup> la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar genes mitocondriales del ADN proveniente de huevos;<sup>62,</sup>

<sup>63</sup> e inmunoelectrotransferencia (IET) para detectar moléculas específicas del parásito, como los antígenos de excreción-secreción,<sup>64, 65, 66</sup> la búsqueda de moléculas específicas de este estadio aún continúa. Actualmente se intenta usar proteínas recombinantes.<sup>67</sup>

### **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.<sup>2</sup>

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,<sup>68</sup> esta técnica tiene muchas ventajas y por ello se sigue utilizando, pero su mayor limitación es que presenta reacciones cruzadas.<sup>69</sup> También se emplea la inmunoelectrotransferencia (IET), con una fracción de glicoproteínas, las LLGP (del inglés lentil lectin purified glycoprotein) de 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. haematobium*, *S. mansoni*, *A. lumbricoides* y *Trichinella sp.*<sup>70, 71</sup>

Finalmente, las técnicas de diagnóstico molecular están basadas en el desarrollo de proteínas recombinantes<sup>72</sup> o péptidos sintéticos<sup>73</sup>, 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.<sup>74</sup> Sin embargo, estas técnicas están aún en desarrollo.

## **1.2.6 Tratamiento**

### **1.2.6.1 Teniosis**

Inicialmente se usaba como fármaco de elección la niclosamida, pero actualmente está en desuso. El fármaco de elección es el albendazol, el cual actúa uniéndose a un sitio específico en la  $\beta$ -tubulina inhibiendo su polimerización y con ello la formación de los microtubulos citoplásmicos, el resultado final es la imposibilidad para captar la glucosa, y con ello el deterioro del parásito.<sup>75</sup>

### **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 de las células musculares para el calcio, causando contractura y parálisis del parásito; el segundo, inhibe la formación de citóesqueleto y bloquea la captación de la

glucosa lo que provoca en el parásito una disminución en la producción energética. Otros fármacos empleados son el mebendazol, el metrifonato y el flubendazol.<sup>76</sup>

### **1.2.7 Medidas de control**

Debido a que la teniosis es exclusivamente una enfermedad humana, el hombre es el responsable de propagar 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.

*Taenia solium* es vulnerable al control y a una potencial erradicación con base en 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 *T. solium* son: el diagnóstico y el tratamiento de los portadores del estadio adulto del parásito, así como la terapéutica masiva;<sup>77</sup> 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 salud<sup>78</sup> que promuevan medidas de higiene, así como el conocimiento de la enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS), han propuesto dos estrategias básicas para el control de la teniosis / cisticercosis en el corto plazo y largo plazo. La estrategia a corto plazo se basa en el tratamiento masivo contra la teniosis en las zonas endémicas donde el riesgo de transmisión es alto.

La estrategia a largo plazo implica la educación para la salud, la modernización de la crianza de cerdos, la creación de condiciones higiénicas y sanitarias en la comunidad y los sistemas activos de vigilancia epidemiológica para identificar a los portadores de la taenia.<sup>79</sup>

### 1.2.8 Vacunas

Una alternativa viable para el control de la teniosis y cisticercosis es el empleo de una vacuna en cerdos.<sup>80</sup> Además una vacuna segura y efectiva para la cisticercosis porcina es obligatoria para la evaluación de vacunas similares de uso humano.<sup>81</sup> 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 oncósferas<sup>82,</sup><sup>83</sup> y cisticercos,<sup>84, 85</sup> en los cuales se ha encontrado resultados prometedores, pero también han sido probadas moléculas más específicas, como las provenientes del escólex<sup>86, 87</sup> o productos de excreción/secreción de oncósferas,<sup>88</sup> y recientemente se están utilizando antígenos provenientes de otras tenias como *T. crassiceps*<sup>89</sup> y *T. ovis*<sup>78</sup> 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 recombinantes<sup>90, 91, 92</sup> o péptidos sintéticos<sup>93, 94, 95, 96</sup> e incluso construcciones de ADN<sup>97,</sup><sup>98</sup> que confieran una mejor protección en contra del parásito.

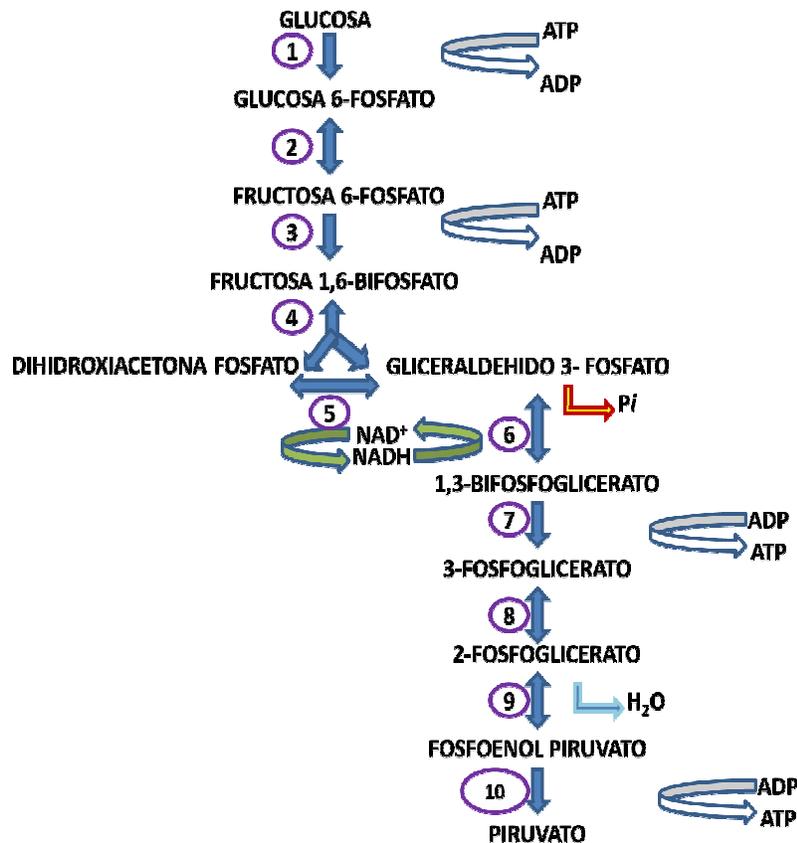
### 1.3 Vía glucolítica

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 es el proceso mediante el cual una molécula de glucosa, que es de menor energía libre, es

transformada en dos moléculas de piruvato, que posteriormente se transformará en *acetil Co-A* para entrar en el ciclo de Krebs. Durante la glucólisis se 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.<sup>99</sup>

La glucólisis consta de 10 reacciones enzimáticas (figura 6) que pueden dividirse en dos etapas con base en 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 ATPs; aquí empieza la fase II de la vía, las triosas se convierten a piruvato, con la producción de cuatro ATPs. Por consiguiente, el rendimiento neto de la glucólisis es de dos ATPs por molécula de glucosa, ya que en la fase I se consumen dos ATPs y la fase II produce cuatro ATPs.<sup>100</sup> La reacción global de la vía es:





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

### 1.3.1 Triosafosfato isomerasa (TPI)

La segunda etapa de la glucólisis comienza por la división de la fructosa-1,6-bifosfato en gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona fosfato (DHAP). El G3P se encuentra en la vía directa de la glucólisis, pero no la DHAP. Sin embargo, estos compuestos son isómeros y esta última puede ser convertida en G3P, la DHAP es una cetosa, mientras que el G3P es una aldosa. La isomerización de los azúcares fosforilados de tres carbonos está catalizada por la Triosafosfato isomerasa (figura 7), su importancia biológica radica en evitar la acumulación de la DHAP que es metabolito tóxico, por lo que la ausencia de esta enzima es incompatible con la vida. Esta reacción es muy rápida y reversible.<sup>101</sup>



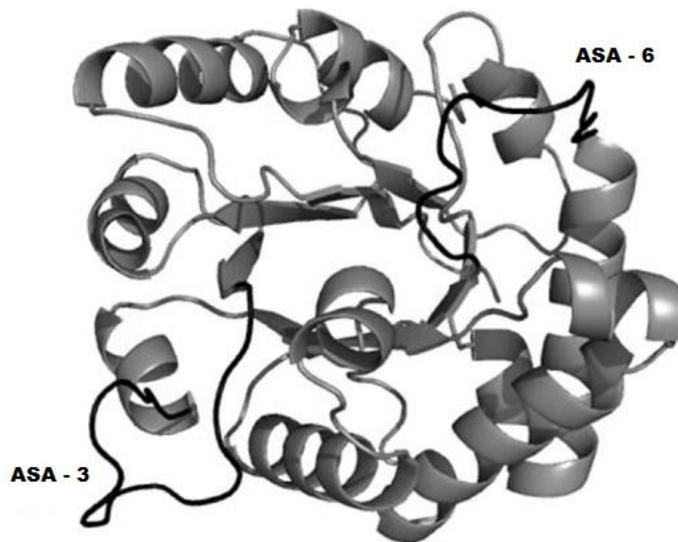
**Figura 7.** La Triosafosfato isomerasa reconduce a la dihidroxiacetona fosfato hacia la vía glucolítica principal, de modo que no se requiere una serie separada de reacciones.

La TPI es una enzima homodimérica con subunidades (figura 8) de alrededor de 27 kDa, su estructura de barril  $(\alpha\beta)_8$  es muy conservada;<sup>102, 103</sup> sin embargo, 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 localizado en el centro del barril de cada monómero, los cuales están conformados 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.<sup>104</sup>

En las proteínas, las asas juegan un papel importante en muchas funciones biológicas críticas, tales como la actividad enzimática, especificidad al ligando y las interacciones proteína-proteína, entre otras tantas. En el caso de la TPI se ha demostrado que el asa 6 es indispensable para llevar a cabo la catálisis de forma óptima, se ha visto que funge como una tapa que se abre y se cierra para fijar al sustrato en el centro catalítico, como tal, el sitio activo se cierra al solvente para prevenir reacciones de eliminación de fosfato no deseadas que pudieran ocurrir dando lugar a la producción de metilglicoxal citotóxico.<sup>105,</sup>

<sup>106</sup> El asa 6 está localizada después de la sexta hoja  $\beta$  y está conformada por 11 residuos, los cuales pueden dividirse en tres subregiones: los primeros 3 residuos forman la bisagra amino terminal, los siguientes cinco residuos conforman la punta rígida del asa, y los últimos tres la bisagra carboxilo terminal.<sup>107</sup>

Adicionalmente, la unión del sustrato es acompañada de cambios conformacionales en las asas 5 y 7.<sup>103</sup> En la forma abierta, el asa 6 interactúa con el asa 5, mientras que en presencia del ligando, el asa 6 se mueve en dirección del asa 7, con la que interactúa por medio de las cadenas laterales del motivo altamente conservado, YGGG.<sup>108, 109</sup> Por otra parte, entre los dímeros hay una interface formada principalmente por las asas 1, 2, 3, y 4. En especial, el asa 3 de una subunidad se interna en el compartimento que forman las asas 1 y 4 de la subunidad adyacente, en las cuales se encuentran dos de los residuos catalíticos, la lisina y la histidina, respectivamente (el residuo catalítico restante, el glutamato, se encuentra en el asa 6), de esta manera se obtiene una estabilidad reciproca entre los monómeros, por lo tanto, la TPI es completamente activa sólo como dímero.<sup>110, 111</sup>



**Figura 8.** Modelo estructural del monómero de la TPI de *Taenia solium*. La enzima muestra un patrón estructural conservado que es comúnmente llamado barril ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub>. Cada monómero consta de un núcleo central formado por ocho hebras  $\beta$  paralelas rodeadas por ocho hélices  $\alpha$ . Las hojas  $\beta$  son representadas por las flechas y las hélices  $\alpha$  por espirales y las asas por líneas. Las asas 3 y 6 se muestran en color negro. Figura tomada de<sup>112</sup>

Como ya se mencionó antes, la importancia biológica de esta enzima radica en que evita la acumulación de la DHAP, un metabolito altamente tóxico, y agente glicante *per se* que modifica la estructura de las proteínas, incluyendo a la TPI.<sup>113</sup> Por otro lado, un

incremento en el nivel de DHAP da lugar a una acumulación de metilglioxal, el cual, a su vez, potencia la producción de productos finales de glicación avanzada (AGEs).<sup>114</sup> La acumulación de estos aductos provocan un estrés oxidativo, daño al ADN, y apoptosis, lo cuales están involucrados en la progresión de enfermedades degenerativas o aparición de cáncer.<sup>115</sup> La deficiencia de la TPI en humanos está asociada a desordenes neurológicos, anemia hemolítica crónica, cardiomiopatía, susceptibilidad a infecciones y muerte en la infancia temprana.<sup>116</sup> Otro aspecto involucrado en el malfuncionamiento de la TPI es la nitrotirosinación de ésta, causada por un mal funcionamiento en la enzima óxido nítrico sintasa, esta modificación induce la agregación de la TPI y está relacionada a la formación del péptido  $\beta$ -amiloide.<sup>117</sup>

Funciones adicionales para esta enzima han sido descritas recientemente, entre las que se incluyen la de factor de adhesión en *Paracoccidioides brasiliensis*<sup>118</sup> y *Staphylococcus aureus*.<sup>119</sup> Por otra parte, se ha identificado como un antígeno presente en la cabeza de espermatozoides humanos, denominado P36 y el cual está involucrado en el proceso de fertilización, y a su vez está relacionado con infertilidad debida a la presencia de autoanticuerpos.<sup>120</sup>

### **1.3.1.1 Triosafosfato isomerasa en parásitos**

En la actualidad hay muchas enfermedades parasitarias sin un tratamiento efectivo, por lo tanto es imperativo encontrar nuevos blancos y desarrollar nuevos fármacos. Dadas las características importantes mencionadas anteriormente, la TPI ha sido propuesta como un blanco farmacológico prometedor para este propósito.<sup>121</sup> Varios estudios han examinado la posibilidad de inactivar específicamente la TPI de varios patógenos, e incluso algunos esfuerzos van encaminados a desarrollar un tratamiento para el cáncer.<sup>122</sup>

La enzima ha sido estudiada ampliamente desde el punto de vista estructural, en el banco de datos de proteínas (PDB, [www.pdb.org](http://www.pdb.org)) se reportan 41 entradas para la enzima de *Trypanosoma brucei*, seguido de 20 para *Plasmodium falciparum* y 16 para *Gallus gallus* (la estructura de la TPI de este organismo fue la primera reportada), y en cuarto lugar *Leishmania mexicana* con 8. Esto refleja la relevancia que tiene la enzima en la estrategia para desarrollar tratamientos efectivos para erradicar parásitos.

Estudios estructurales han demostrado que la interfase es el blanco para desarrollar inhibidores específicos tales como péptidos.<sup>123, 124</sup> 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 región que circunda a la cisteína, dando como resultado una disminución de la actividad, siendo la enzima humana la menos afectada.<sup>125</sup> Para *Plasmodium falciparum* se ha encontrado una familia de colorantes sulfonados que son efectivos en la inhibición<sup>126</sup> y para *Trypanosoma cruzi* se ha encontrado un compuesto [ácido 3-(2-benzotiazoliltio)-1-propansulfónico] que abate la actividad con un alto nivel de selectividad por unión a la interfase.<sup>127</sup>

La enzima ha sido estudiada en *Schistosoma mansoni* por clonación del ADNc y subsiguiente expresión,<sup>128</sup> 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)<sup>129</sup> que confiere resistencia parcial a la infección en ratones.

Para el caso de *Taenia solium*, se ha clonado, expresado y caracterizado una TPI recombinante (TTPI),<sup>130</sup> y al inmunizar ratones con ésta, les confirió protección a los ratones cuando fueron retados con cisticercos de *T. crassiceps*, se observó que la carga

parasitaria se redujo en un 52 % respecto a los ratones no inmunizados. En el mismo estudio, se demostró que los anticuerpos policlonales anti-TTPI fueron capaces de inhibir parcialmente la actividad de la TPI *in vitro*, los cuales no causaron ningún efecto en TPI del cerdo.<sup>131</sup>

#### **1. 4 Anticuerpos monoclonales**

En 1975 los investigadores Georges Köhler y Cesar Milstein fueron los primeros en obtener anticuerpos con una sola especificidad, esto lo lograron por medio de la elaboración de una célula híbrida *in vitro*. Esta célula híbrida fue producto de la fusión de linfocitos B y células de mieloma. Los células híbridas, o hibridomas, tienen la capacidad de multiplicarse rápida e indefinidamente y además pueden producir anticuerpos en gran proporción, características recibidas de las células cancerosas y los linfocitos B, respectivamente<sup>132</sup>. Por esta aportación a la ciencia Köhler y Milstein recibieron el premio Nobel de medicina en 1984. Explicando brevemente el proceso de producción de anticuerpos monoclonales. Primero, el bazo del animal inmunizado es disgregado para obtener los linfocitos B, para posteriormente fusionarlos con polietilenglicol (PEG) a células de una línea de mieloma deficiente en enzimas implicadas en la síntesis de nuevos ácidos nucleicos por la vía exógena (de salvamento), como la timidina cinasa (TK) o la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). Los productos de la fusión celular (hibridomas) son cultivados en medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) con la finalidad de eliminar las células de mieloma, ya que la aminopterina bloquea la síntesis de ácidos nucleicos endógena (a partir de aminoácidos y carbohidratos), y al carecer de las enzimas de salvamento éstas mueren. Las células B y las fusiones entre ellas, mueren en un lapso de ocho días de cultivo. Las células híbridas obtenidas tras el proceso de fusión contienen un número elevado de cromosomas (72 del mieloma y 40 del linfocito B) que en las sucesivas división celular se irán perdiendo hasta oscilar entre los

70 y los 80 cromosomas. Como consecuencia de dicho proceso algunas células pierden la capacidad de secreción de anticuerpos o bien de funciones básicas para la viabilidad celular, es por ello que en el momento que se tenga conocimiento de que una muestra es positiva es necesario realizar una clonación mediante el método de dilución limitante<sup>133, 134,</sup>  
135 .

Una vez caracterizados los anticuerpos (determinación de isotipo, afinidad, especificidad por el antígeno, etc.) se procede a la producción en gran escala. Existen dos métodos principales: a) cultivo *in vitro*, en donde se hace crecer las clonas en recipientes de cultivo o en biorreactores y del medio de cultivo son recuperados los anticuerpos; b) producción *in vivo*, las clonas híbridas estables son inoculadas en la cavidad peritoneal de ratones previamente tratados, por la misma vía, con una sustancia irritante (2, 6, 10, 14 tetrametil pentadecano-pristano)<sup>136</sup> que promueve la formación de tumores y la secreción de fluidos donde van los anticuerpos (líquido ascítico)<sup>137</sup>.

Cada vez son más los anticuerpos monoclonales que tienen utilidad terapéutica en muchas enfermedades como el cáncer, el rechazo de trasplantes de órganos, enfermedades autoinmunes y alérgicas. Hasta el momento son 23 los anticuerpos monoclonales aprobados por la *Food & Drug Administration* (FDA) y 7 más en el resto del mundo,<sup>138</sup> pero el número de anticuerpos monoclonales en fase de ensayo clínico es elevado y representan un 30 por ciento de todos los compuestos en investigación en el 2005.<sup>139</sup>

En los setentas se comenzaron a hacer estudios para inhibir enzimas esenciales de patógenos bacterianos con inmunoglobulinas. En éstos se evaluó la capacidad de inhibir la actividad de enzimas, tales como la neuraminidasa y hialuronidasa, entre otras.<sup>140</sup> Otro ejemplo claro de una enzima que otorga la capacidad de supervivencia y patogenicidad lo

tenemos con *Helicobacter pylori*, es bien sabido que esta bacteria sobrevive en el ambiente ácido estomacal debido a una ureasa muy eficiente, por lo cual se produjo un anticuerpo monoclonal (L2)<sup>141</sup> dirigido contra una de las subunidades de la enzima que mostró tener la capacidad de inhibirla. Otro ejemplo es el de *Plasmodium falciparum*, para el que se obtuvo un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad de la aldolasa,<sup>142</sup> una enzima fundamental en la vía glucolítica. Cada vez es mayor el número de anticuerpos inhibidores desarrollados, y esta estrategia comienza a tomar relevancia para la erradicación de patógenos.

Las aplicaciones principales de los anticuerpos hasta la fecha tienen relevancia importante en el área biomédica, en donde han tenido gran repercusión en la investigación, el diagnóstico y la terapéutica. En investigación han tenido aplicación en la identificación y clonación de genes, la identificación y aislamiento de proteínas, la activación de enzimas, conocimiento de la estructura molecular y morfogénesis, así como la localización de moléculas en tejidos (inmunolocalización), así como en medicina.

En la actualidad, el empleo de anticuerpos en diversas áreas de investigación biomédica ha adquirido gran importancia, dado que son macromoléculas muy específicas, que hacen posible la realización de una gran gama de estudios finos.<sup>143</sup>

Por otro lado, y reforzando el objetivo de este proyecto, los anticuerpos juegan un papel importante en la protección contra la cisticercosis, ya que éstos con el complemento destruyen a las oncosferas.<sup>144, 145, 146,147</sup>

## 2. Justificación

La teniosis y la neurocisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son problemas de salud pública que prevalecen hasta la fecha, 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 existe en África, Asia y Latinoamérica; en particular, México y Brasil son los países que informan las frecuencias más altas. En la actualidad se reporta el surgimiento de casos en naciones del primer mundo tales como EUA, debido a la creciente migración poblacional y, en menor medida, por los viajes turísticos.

El empleo de tan sólo dos fármacos para el tratamiento de la teniosis/cisticercosis (praziquantel y albendazol) puede causar el surgimiento de resistencia (helmintos). Por otra parte, son escasos los desarrollos farmacológicos que se realizan para tratar infecciones causadas por parásitos que prevalecen en el tercer mundo.

En las décadas pasadas se comenzaron a hacer estudios para inhibir enzimas esenciales de patógenos con inmunoglobulinas. En éstos se evaluó la capacidad de inhibir la actividad de enzimas, tales como la neuraminidasa y hialuronidasa de varios patógenos bucales;<sup>148</sup> la ureasa de *Helicobacter pylori*;<sup>149</sup> y la aldolasa de *Plasmodium falciparum*,<sup>150</sup> esta última, es una enzima fundamental en la vía glucolítica. Esta estrategia ha tomado relevancia para la erradicación de patógenos, y es por ello que en este trabajo nos enfocamos a producir anticuerpos que inhibieran específicamente la actividad de la Triosafofostato isomerasa de *Taenia solium*, la cual es considerada de gran importancia en el metabolismo energético de los seres vivos.

### 3. Hipótesis

❖ La Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* (TTPI) puede ser inactivada por anticuerpos desarrollados contra epítomos o péptidos que mimetizan sus epítomos (mimótopos).

## 4. Objetivo

- ❖ Producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos específicos que inhiban la actividad de la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* e identificar por medio de los mismos secuencias (epítomos) importantes para la función de la enzima.

## 5. 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 1950 x g se realizaron en una centrifuga modelo IEC Centra CL2 (Thermo Scientific), y las mayores a 8000 x g en una microfuga modelo 5415C de eppendorf.

## 6. Métodos

### 6.1 Obtención de antígenos

#### 6.1.1 TTPI recombinante

La TTPI fue obtenida utilizando una construcción de expresión, en la cual el fragmento codificante de la TTPI está fusionado a 6 histidinas (H<sub>6</sub>-TTPI) en el vector plasmídico pRSET<sup>129</sup>. Dicho vector fue utilizado para transformar una cepa bacteriana de *E. coli* que sirvió para producir la enzima. Brevemente, la bacteria transformada se creció a 37°C con agitación en LB adicionado con ampicilina (50 µg/mL), hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> = 0.6, momento en el que fue adicionado el inductor IPTG a una concentración final 1 mM. Después de 6 horas de incubación las bacterias fueron centrifugadas a 1950 x g por 10 minutos, el botón bacteriano fue lavado y resuspendido en 10 mL de amortiguador de fosfatos 1X (PBS) para ser homogenizados con un Polytron, la suspensión obtenida fue centrifugada a 1950 x g por 10 minutos, el sobrenadante obtenido fue precipitado en dos pasos con sulfato de amonio, primero al 30 % y después al 60% a 4°C durante toda la noche y 3 horas, respectivamente. Entonces se centrifugó a 8000 x g durante 10 min, el botón obtenido fue resuspendido en 3 mL y dializado toda la noche contra PBS. El

dializado se pasó por una columna de afinidad a metales HiTrap (Ni<sup>+</sup>). La fracción unida fue eluida con amortiguador de PBS-EDTA 50 mM, el eluido se dializó contra PBS.

### **6.1.2 Fragmento 1/3NH<sub>2</sub>TTPI**

Para obtener el fragmento amino terminal de la TTPI, la H<sub>6</sub>-TTPI fue sometida a una cinética de digestión a 37°C con la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* en amortiguador que contenía 100 mM acetato de amonio, pH 4. Escogiendo el tiempo de 32 h, el producto de la digestión se pasó por la columna de afinidad a metales (HiTrap Chelating HP, GE Healthcare) y la fracción unida a la columna fue eluida con un gradiente de imidazol (250 mM) en PBS. Este fragmento se denominó 1/3NH<sub>2</sub>TTPI.

La pureza de las proteínas obtenidas se determinó por electroforesis desnaturizante en gel de acrilamida (SDS-PAGE) al 12% teñido con Coomassie. La proteína fue cuantificada espectrofotométricamente empleando el método de Lowry.

## **6.2 Obtención de anticuerpos monoclonales**

Ratones Balb/c fueron inmunizados con 50 µg de TTPI purificada. Las inmunizaciones fueron repetidas dos veces más con intervalos de 10 días. Después de la tercera inmunización, 4 semanas después de la última inmunización les fue administrada otra dosis de TTPI. Cuatro días después, fueron sacrificados y el bazo fue extraído y disgregado para fusionar las células con células de mieloma Ag8 usando 50% de polietilenglicol 4000 (Sigma) como agente fusionante. Los hibridomas fueron crecidos en un medio de selección que contenía hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) y suero bovino fetal al 15% en placas de 96 pozos (Maxisorp Nunclon Denmark). Después de 9 días, los sobrenadantes de los cultivos fueron probados por ELISA para identificar los pozos que contenían hibridomas productores de anticuerpos anti-TTPI. Los pozos

positivos fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido y después descongelados para ser clonados. Algunos hibridomas fueron escogidos para ser amplificadas y clonadas con base en la inmunorreactividad de sus sobrenadantes, y las células fueron clonadas al menos dos veces por dilución limitante. Para producir grandes cantidades de anticuerpos se produjo líquido de ascitis en ratones inyectados con 5 x 10<sup>6</sup> células de los hibridomas con pristano. Subsecuentemente, las células y el debris fueron removidos del líquido de ascitis por centrifugación y las preparaciones fueron guardadas a -20°C. Los anticuerpos fueron purificados por cromatografía en columna con Proteína-A acoplada a Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech). El isotipo fue determinado usando una batería de anticuerpos por ELISA (Bio-Rad Laboratories) acorde con los procedimientos recomendados por el fabricante.

### **6.3 Caracterización de anticuerpos monoclonales**

La selección de anticuerpos monoclonales reactivos a la TTPI fue realizada por ELISA como sigue: a cada pozo de una placa de 96 pozos (Nunclon, Intermed, Denmark) le fueron adicionados 50 µL de PBS conteniendo TTPI a 5 µg/mL y se incubaron toda la noche a 4°C. Después de la remoción de la solución conteniendo la TTPI, los pozos fueron lavados cinco veces con PBS-Tween 20 0.3%, posteriormente se adicionó una solución que contenía y 0.3% de leche descremada (solución de bloqueo) e incubado durante 1 h a temperatura ambiente para saturar los sitios de unión. Nuevamente la placa fue lavada cinco veces con PBS-Tween 20 0.3%, y adicionados los sobrenadantes de los cultivos de los hibridomas (usualmente 50 µL). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 2 horas. Después de la incubación las placas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween 20 0.3%, entonces fueron adicionados a cada pozo 50 µL de un anticuerpo anti IgG de ratón hecho en cabra (Zymed) diluido 1:2000 en solución de bloqueo. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas tres veces con

PBS-Tween20 0.3%. Finalmente, cada pozo fue incubado con 100  $\mu$ L de una solución que contenía ortofenilendiamina (0.4 mg/mL) y 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en amortiguador de citratos pH 5.5. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente y agitación, y los pozos positivos fueron determinados por la absorbancia a 492 nm medida en un espectrofotómetro (Multiscan Ascent, Thermo Scientific).

#### **6.4 Isotipificación**

El isotipo de los monoclonales producidos fue determinado utilizando un kit de isotipificación para inmunoglobulinas de ratón (Zymed Laboratories, Inc.) empleando la técnica de ELISA acorde con las instrucciones del fabricante.

#### **6.5 Obtención de los fragmentos de unión a antígeno (Fabs)**

La generación de los fragmentos Fab fue llevada a cabo usando el equipo Inmunopure Fab (Thermo Scientific, MA, USA) siguiendo las recomendaciones técnicas del fabricante. Brevemente, 10 mg de anticuerpos (AcMo 4H11D10B11, 2G6B6H3, *anti-T. gondii*, o IgGs preinmunes de ratón) fueron disueltos en 1 mL de amortiguador de digestión fresco (3.5 mg/mL cisteine-HCl en PBS, pH 7), la solución fue adicionada a la resina que contenía la papaína inmovilizada, y entonces incubada a 37°C por 5 h. Pasado el tiempo, la resina fue separada por filtración y el sobrenadante fue diluido a 6 mL con el amortiguador de unión (ver procedimiento de purificación) y pasado a través de una columna de Proteína-A acoplada a Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech), los anticuerpos no digeridos y los fragmentos Fc fueron retenidos y los Fabs presentes en el fluido que pasaba a través de la columna fueron colectados y concentrados en un Amicon con una membrana PM10 (Millipore, IL, USA). Los fragmentos purificados fueron visualizados en un SDS-PAGE.

## **6.6 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

Este ensayo fue llevado a cabo tal como fue descrito en el trabajo de Vibanco-Pérez y colaboradores.<sup>57</sup> Brevemente, secciones congeladas de cisticercos de 6  $\mu\text{m}$  de espesor fueron colocadas en un portaobjetos e incubadas toda la noche, primero con el anticuerpo 4H11D10B11 (0.4 mg/mL) en PBS con BSA al 1% y Tween 20 al 0.05% (PBSBT). Las secciones fueron enjuagadas tres veces con PBS e incubado durante 1 h con el anticuerpo anti-IgG de ratón (hecho en cabra) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Zymed, San Francisco, CA) diluido 1:50 en PBSBT. Las secciones fueron lavadas en PBS, montadas en una solución de glicerol-PBS (9:1), y fotografiadas con un microscopio Nikon Optiphot epifluorescence (Nikon Inc., Bayshore, NY). Las IgGs preinmunes de ratón fueron usadas como control bajo las mismas condiciones.

## **6.7 Obtención de mimótopos**

Cien microlitros de los AcMo 4H11D10B11 o IgGs de conejo anti-1/3NH<sub>2</sub>TTP1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) fueron adicionados a los pozos de una placa (EIA/RIA, Costar) en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 8.6 a 4°C por toda la noche en una cámara húmeda. Al día siguiente, se retiró el exceso de anticuerpos no unidos, las placas fueron bloqueadas con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y Tween 20 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 20 al 0.01%. Se usaron 10  $\mu\text{L}$  de 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  $\mu\text{L}$  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 20 al 0.1%. Se preparó una solución de trietilamina 100 mM (Sigma) para

hacer la elución de los fagos, para ello se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución en cada pozo e incubaron en una cámara húmeda con agitación por 20 minutos. Al término de la incubación, se recuperó el volumen total de la elución (800  $\mu\text{L}$  de cada placa) y se neutralizó con 400  $\mu\text{L}$  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 para el AcMo, y hasta una cuarta ronda de selección para los anticuerpos policlonales, en cada una de las cuales se aplicaron  $10^{11}$  fagos en 100  $\mu\text{L}$  de TBS por pozo y utilizando una solución de lavado de TBS-Tween 20 al 0.1% y 0.3% y 0.5%, respectivamente. También se disminuyó la cantidad de anticuerpos pegados por ronda, para el AcMo se usaron 3 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para la segunda y tercera ronda; y para los Ac monoclonales se usaron 3, 1 y 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para cada ronda respectivamente. Se alternó el uso de BSA y leche descremada en la solución de bloqueo para evitar selección de clones que se unen a las proteínas presentes en la solución.

### **6.8 Selección de clones de fagos.**

Después de realizar la cuarta ronda de selección, los fagos se reamplificaron y titularon mediante el procedimiento previamente descrito, pero con una ligera variante que permitió seleccionar las clones de fagos que tienen inserto. Antes de sembrar las bacterias con los fagos se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución de IPTG 200 mM (Invitrogen)/X-gal 100 mM (Invitrogen) en dimetilformamida (Sigma). Las clones que tienen inserto llevan a cabo un proceso denominado  $\alpha$ - complementación,<sup>151</sup> y se muestran azules debido a la hidrólisis de X-gal. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se recuperaron las clones azules y se almacenaron a 4°C en 100  $\mu\text{L}$  de TBS pH 7.5.

## **6.9 Preparación del ADN de fagos para secuencia**

Para la preparación de los templados se usó 1.1 mL del amplificado de fagos que se centrifugaron a 8000 x g durante 1 minuto. El sobrenadante (1 mL) se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le adicionaron 300 µL 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 8000 x g por 10 min y descartando el sobrenadante. Los fagos precipitados se resuspendieron en 100 µL 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 8000 x g durante 2 minutos. Se recuperó la fase acuosa y un volumen igual de cloroformo fue adicionado (100 µL), 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 µL acetato de sodio 3M y 250 µL de etanol absoluto y congelando a -70°C durante toda la noche. El ADN fue obtenido por centrifugación a 8000 x g durante 10 minutos, la cual permitió obtener un botón con el ADN, que posteriormente fue resuspendido en 25 µL de agua. Con el propósito de determinar la pureza del templado, 1 µL del ADNcs fue corrido en un gel de agarosa al 1.5% con TAE y teñido con bromuro de etidio, su concentración se determinó espectrofotométricamente a D.O.<sub>260nm</sub>.

## **6.10 Reamplificación y titulación de fagos**

Las clonas de los fagos que contienen los mimótopos de la TTPI (previamente identificados) se utilizaron para generar los sueros anti-mimótopos para la TTPI, siguiendo el método descrito en la siguiente sección. Los fagos fueron reamplificados colocando 20 µL de la suspensión de los fagos en 50 mL de medio LB y 1 mL de cultivo (D.O.<sub>600nm</sub> = 0.8)

de *E. coli* cepa TG1, e incubando a 37°C con agitación durante 5 horas. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 1950 x g 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 8000 x g por 10 minutos y resuspendiendo el botón en 1 mL de TBS pH 7.5 (Stock). El remanente de bacterias fue retirado centrifugando a 8000 x g 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 µL de las diluciones y con ellas se infectaron 200 µL 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.

### **6.11 Obtención de anticuerpos policlonales contra mimótopos, proteínas y péptidos sintéticos**

Se utilizaron conejos hembras de la cepa Nueva Zelanda de 3 meses de edad, una por cada antígeno. Previo a comenzar la inmunización se sangraron los animales para obtener muestras de sueros no inmunes. El inóculo de fagos fue de  $10^{14}$  ufp en 500 µL de PBS estéril (sin adyuvante); para el caso de las proteínas se utilizaron 250 µg de TTPI o  $1/3NH_2TTPI$  o 500 µg de péptidos sintéticos (TPI-1, TPI-2 y TPI-3) en su forma ramificada multiantigénica (MAP, multi-antigen peptide) mezcladas con adyuvante completo de Freund 1:1 para la primera inmunización, y posteriormente tres refuerzos con el adyuvante incompleto. También se produjeron anticuerpos contra el fago sin inserto M13KE para ser usados como control negativo. El tipo de inmunización fue inyección subcutánea con intervalos de 15 días cada una. Una semana después del último refuerzo,

los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardiaca. Los sueros obtenidos fueron titulados por ELISA.

### **6.12 Purificación de anticuerpos.**

Las IgGs se purificaron por una columna de afinidad de Proteína-A acoplada a Sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech), la cual fue equilibrada 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 concentración por el método de Lowry y ajustarla a 1 mg/mL. El AcMo 4H11D10B11 fue purificado de forma similar, pero con la diferencia que se usó una solución de pegado que contenía glicina 1.5 M, NaCl 3M y pH 9 para optimizar el rendimiento.

### **6.13 Ensayo inmunoenzimático (ELISA).**

La especificidad y título de los sueros se evaluó mediante el método inmunoenzimático en placa (ELISA) descrito en la sección 6.3, pero con algunas variaciones dependiendo del antígeno. Para el caso de péptidos sintéticos o proteínas recombinantes fueron usados a una concentración de 5 µg/mL, en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6, durante toda la noche a 4°C o 48 h para el caso de péptidos sintéticos. En el caso de detección de fagos, estos fueron pegados en una cantidad de  $1 \times 10^{11}$  ufp en 100 µL de amortiguador de carbonatos por pozo. Después de los lavados correspondientes se adicionaron 100 µL de un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (Life Technologies) a una dilución 1:2000, e incubaron a 37 °C durante 1 hora.

#### **6.14 Inmunoelctrotransferencia (IET).**

Se preparó un SDS-PAGE preparativo al 12.5 %, en el cual se cargó 100 ng de proteína/mm. Previo al cargado, la proteína fue diluida (1:1) en 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 llegará a 1.0 cm antes del final del gel.

La inmunoelctrotransferencia se realizó colocando el gel frente a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en una cámara de inmunoelctrotransferencia (Mini Protean II, BioRad) a una diferencia de potencial de 100 V durante una hora. La membrana se bloqueó con BLOTTO (leche descremada 10 % y  $\text{NaN}_3$  0.2 %) y los sueros, las IgGs o los AcMo (1 mg/mL) 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 anti-IgG cabra, ratón o conejo, según el caso, acoplados a peroxidasa (Life Technologies) a una dilución 1:2000 y revelados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y diaminobencidina (Sigma).

#### **6.15 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  $\beta$ -NADH (Sigma), 2.5 unidades de  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa (Sigma) y 30 ng de la enzima (10  $\mu\text{L}$  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).

## 6.16 Ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI

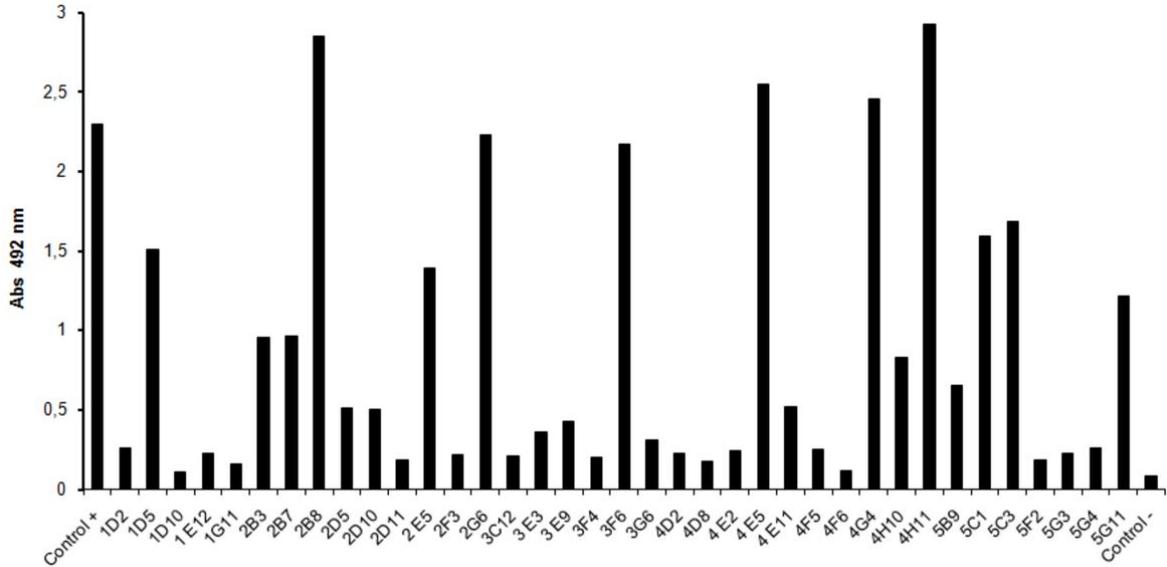
Para esto se realizó una preincubación con 10 µg de la enzima, sola como el control positivo (100% de la actividad), y para las demás determinaciones se colocó junto con esta cantidades variables de sobrenadantes de hibridomas (diluciones 1:10 – 1: 100), de AcMo puro (6.25- 200 µg), de Fabs (5-70 µg) o de IgGs anti-mimotopos (100 µg). La mezcla de preincubación se realizó en un volumen final de 1 mL, 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 TA durante 30 min y después a 6 ng de la enzima determinarle su actividad. Se utilizaron como controles negativos de la inhibición el AcMo anti-*T. gondii*, AcMo 2G6B6H3, IgGs anti-M13KE (fago sin inserto), e IgGs preinmunes de ratón o conejo. Cada determinación se hizo por triplicado en eventos independientes, con lo cual se determinó el promedio y la desviación estándar.

## 7. Resultados

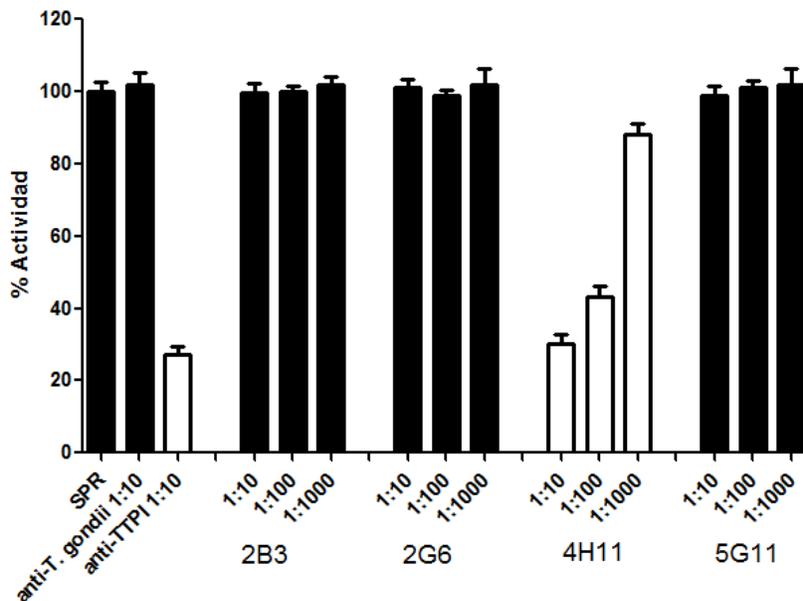
### 7.1 Primera parte

#### 7.1.1 Obtención de clonas de anticuerpo monoclonal

En un tamizaje inicial de los hibridomas de ratón inmunizados con TTPI realizado por medio de la técnica de ELISA, obtuvimos trece hibridomas con una respuesta positiva fuerte (valores de densidad óptica por encima de las dos unidades) (Figura 9). Sólo cinco de los trece hibridomas reconocieron a la TTPI desnaturalizada por inmunolectrotransferencia, estos fueron 1D5, 2B3, 2G6, 4H11, y 5G11 (Datos no mostrados). Desafortunadamente de estos cinco sólo el hibridoma 1D5 no permaneció viable. Con el fin de realizar los ensayos para inhibir la actividad catalítica de TTPI, produjimos sobrenadantes de cultivo de los hibridomas anteriormente mencionado y a la TTPI recombinante. Se encontró que sólo el sobrenadante del hibridoma 4H11 (diluido 1:10) tuvo la capacidad para inhibir el 70% de la actividad catalítica de la TTPI (figura 10). Sobre la base de estas observaciones iniciales, el hibridoma 4H11 fue seleccionado y clonado por dilución limitante, de esta manera obtuvimos el AcMo 4H11D10B11. Asimismo, fueron clonados y producidos los anticuerpos monoclonales 2G6B6H3 y 5G11F3B5, que reconocieron a la TTPI, pero no fueron capaces de inhibir la actividad enzimática, y un AcMo generado contra la roptria de *Toxoplasma gondii* (anti-*T. gondii*) para usarlos como controles.



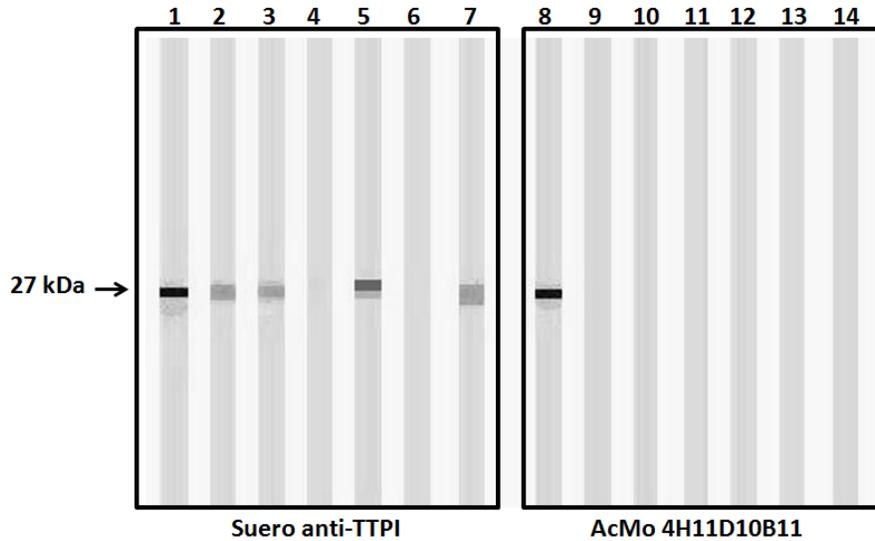
**Figura 9.** Tamizaje inicial de los hibridomas producidos contra la TTPI. Trece sobrenadantes de los cultivos reconocieron a la TTPI por medio de ELISA. Los hibridomas 2B8, 2G6, 3F6, 4E5, 4G4 y 4H11 tuvieron valores de densidad óptica por encima de las dos unidades. Como controles positivos y negativos, empleamos un suero de ratón anti-TTPI y un suero preinmune de ratón, respectivamente.



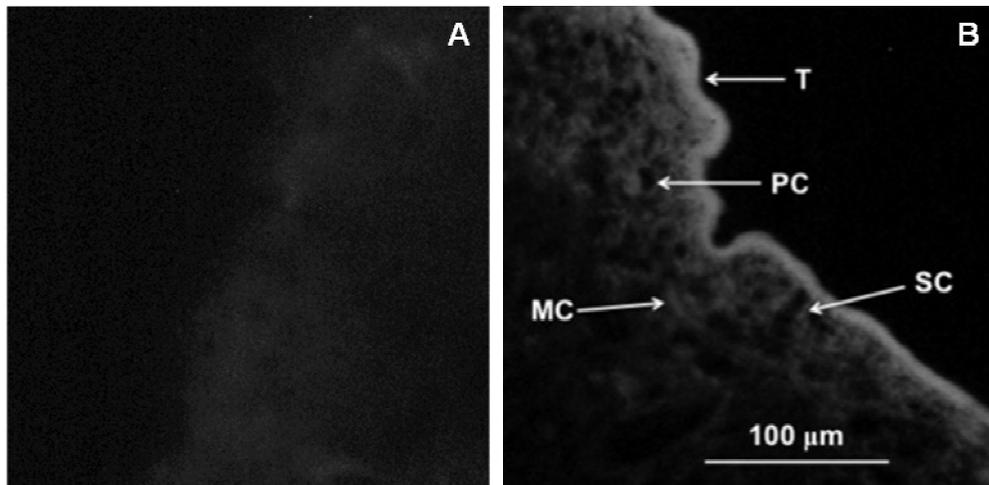
**Figura 10.** Inhibición de la actividad de la TTPI por sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados. Diluciones de los sobrenadantes de cultivo fueron preincubadas con la TTPI y la actividad residual fue determinada. Como control positivo fue incluido un suero de ratón anti-TTPI, y como controles negativos, un suero preinmune de ratón (SPR) y el sobrenadante de un hibridoma no relacionado, anti-*T. gondii*, todos los sueros se utilizaron diluidos 1:10.

### 7.1.2 Caracterización general del anticuerpo monoclonal 4H11D10B11

El isotipo del AcMo 4H11D10B11 se determinó como la inmunoglobulina G subclase 1 (IgG1) con cadenas ligeras  $\kappa$ . La especificidad del anticuerpo fue probada usando TPIs de diferentes organismos en una inmunoelectrotransferencia, tales como *Sus scrofa* (SsTPI), *Schistosoma mansoni* (SmTPI), *Entamoeba histolytica* (EhTPI), *Giardia lamblia* (GITPI), *Trypanosoma cruzi* (TcTPI) y *Homo sapiens* (HsTPI). En la figura 11 se muestra el panel del análisis, las tiras 1-7 contienen las diferentes TPIs, las cuales fueron probadas con anticuerpos policlonales anti-TTPI hechos en conejo, en este caso los anticuerpos mostraron una ligera reactividad cruzada con SsTPI (tira 2), SmTPI (tira 3) y HsTPI (tira 7); y una marcada reactividad con GITPI (tira 5). Por otra parte, las tiras 8-14 fueron probadas con el AcMo 4H11D10B11, en éstas se muestra que el anticuerpo reconoce específicamente a la TTPI (tira 8) y a ninguna otra. Adicionalmente, también probamos las clonas 2G6B6H3 y 5G11F3B5, las cuales también mostraron tener especificidad para la TTPI (datos no mostrados). La figura 12 muestra la localización en un corte de cisticerco por inmunohistoquímica usando el AcMo 4H11D10B11. La TTPI fue reconocida de forma considerable en el tegumento y en el citoplasma de las células musculares, protonefridiales y subtegumentales. Ninguna tinción de inmunofluorescencia fue observada en el control que consistió de un corte de cisticerco incubado con las IgGs preinmunes de ratón.



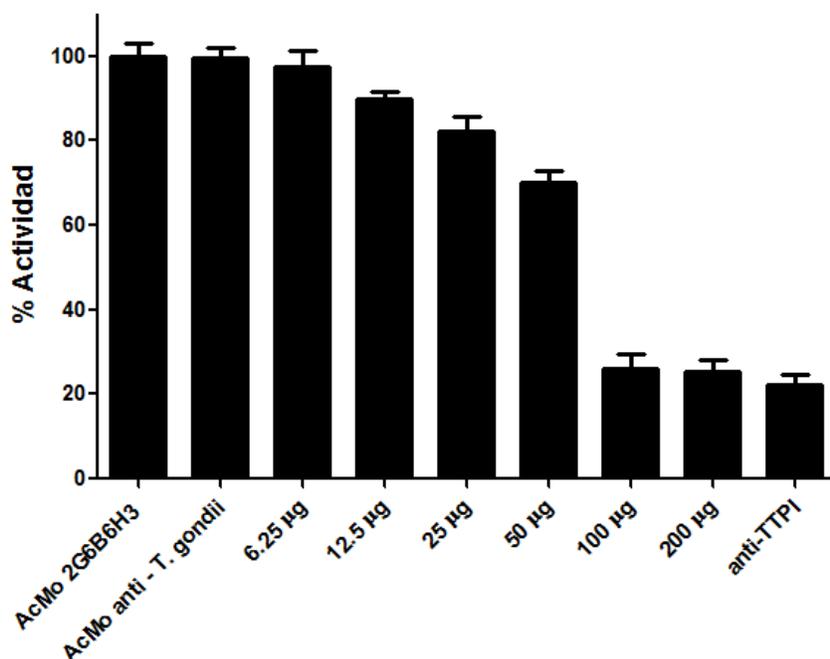
**Figura 11.** Inmunoelectrotransferencia de varias TPis. Se muestra la especificidad del AcMo 4H11D10B11. En las tiras se encuentran las TPis de: 1 y 8, *Taenia solium* (TTPI); 2 y 9, *Sus scrofa* (SsTPI); 3 y 10, *Schistosoma mansoni* (SmTPI); 4 y 11, *Entamoeba histolytica* (EhTPI); 5 y 12, *Giardia lamblia* (GITPI); 6 y 13, *Trypanosoma cruzi* (TcTPI); 7 y 14, *Homo sapiens* (HsTPI). Las tiras 1-7 fueron probadas con un suero anti-TTPI hecho en conejo, y las tiras 8-14 con el AcMo 4H11D10B11.



**Figura 12.** Inmunolocalización de la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* mediante inmunofluorescencia indirecta. Los cortes de cisticerco fueron incubadas con: A) IgGs preinmunes de ratón, y B) el AcMo 4H11D10B11, revelado con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con FITC. Las flechas con letras indican: el tegumento (T), músculo (MC), células protonefridiales (PC), y células subtegumentales (SC).

### 7.1.3 Ensayos de inhibición de la actividad enzimática de la TTPI con el AcMo 4H11D10B11 y Fabs.

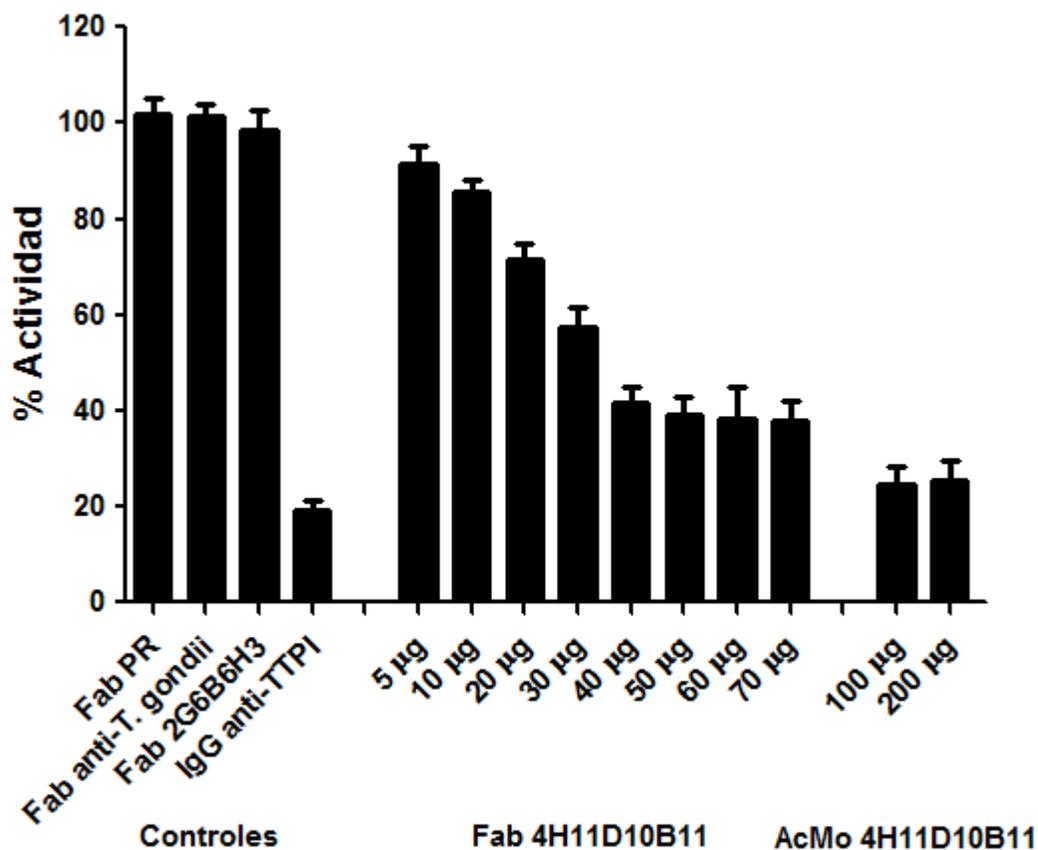
Siguiendo con la caracterización, el ensayo de inhibición se llevó a cabo usando diferentes cantidades de AcMo. En la figura 13 se muestra que con 12.5, 25 y 50  $\mu\text{g}$  de AcMo existe inhibición gradual ligera. En contraste, 100  $\mu\text{g}$  de AcMo inhiben el 74% de la actividad TTPI. Del mismo modo, los fragmentos de unión a antígeno (Fab) obtenidos a partir del AcMo 4H11D10B11 fueron probados en el ensayo de actividad de la TTPI, con el fin de determinar si estos fragmentos retienen la capacidad inhibidora. Los Fabs fueron ensayados en diferentes cantidades para revelar una posible dependencia entre dosis y efecto.



**Figura 13.** La actividad residual de la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* (TTPI), después de las incubaciones con diferentes cantidades del AcMo 4H11D10B11. El máximo efecto fue observado a 100  $\mu\text{g}$ , 74% de inhibición. Los AcMos anti-*T. gondii* y 2G6B6H3 fueron usados como controles negativos y como control positivo IgGs anti-TTPI de ratón. Todos ellos a 100  $\mu\text{g}$ .

La figura 14 muestra el gráfico, un efecto similar se obtuvo; los Fabs presentaron un grado similar de inhibición respecto a la molécula entera del AcMo 4H11D10B11. Los Fabs a 40

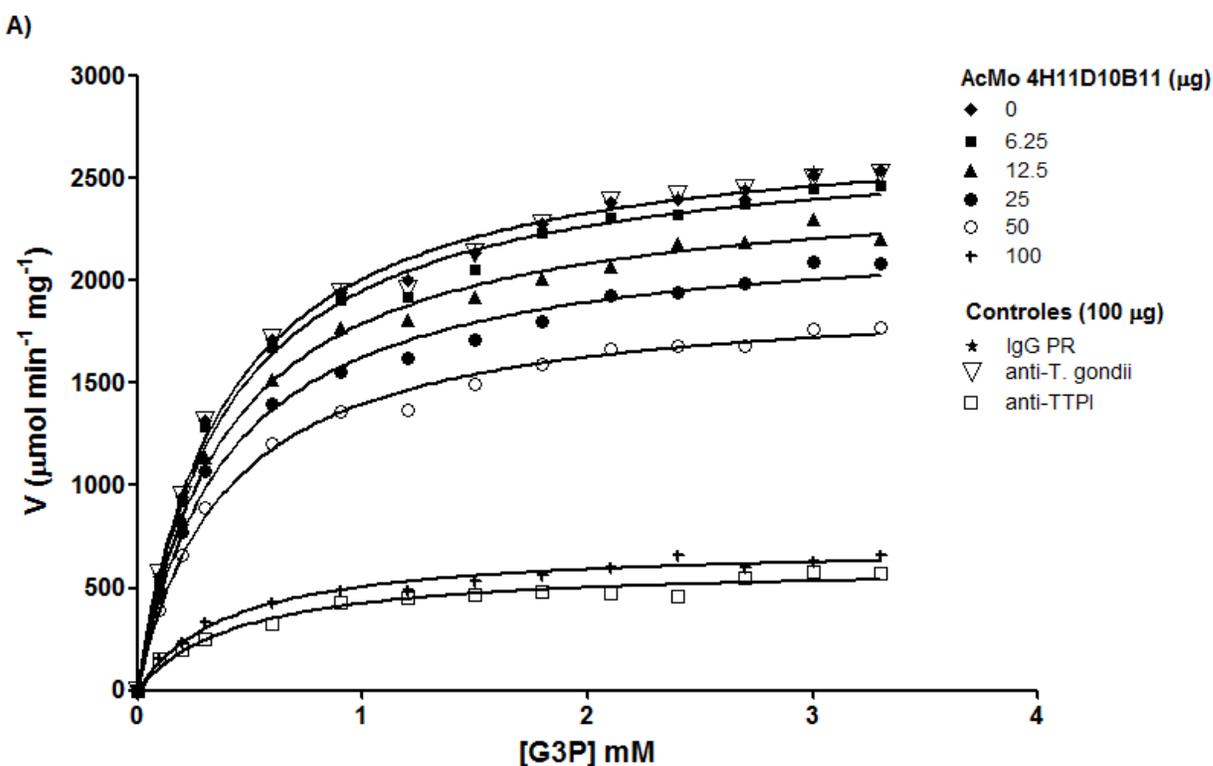
µg inhiben la actividad TTPI alrededor de un 60%. En contraste, 100 µg de Fabs obtenidos a partir de IgGs de ratón no inmunizado (ratón NI Fab), Fabs obtenidos a partir del AcMo anti-*T. gondii* (anti-*T. gondii* Fab) y los Fabs AcMo anti-TTPI 2G6B6H3 (2G6B6H3Fab) no inhibieron la actividad de la TTPI. Como controles positivos se utilizaron el AcMo 4H11D10B11 e IgG de ratón anti-TTPI, que inhibieron 76 y 81%, respectivamente.



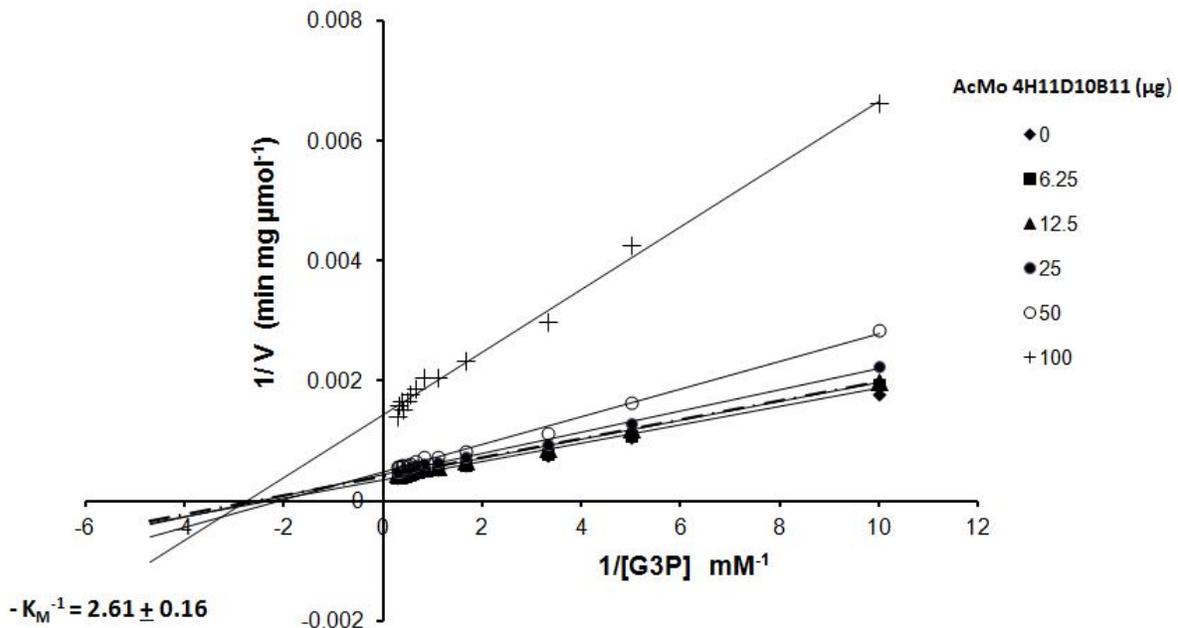
**Figura 14.** Inhibición de la actividad de la Triosafosfato de *Taenia solium* (TTPI) por fragmentos de unión al antígeno (Fabs). La TTPI (10 µg) fue incubada por 30 min con diferentes cantidades de Fabs (5-70 µg) obtenidos por digestión con papaína del AcMo 4H11D10B11, y posteriormente la actividad fue determinada. Los Fabs de las IgGs preinmunes de ratón (Fab PR), los Fab del AcMo anti-*T. gondii* (Fab anti-*T. gondii*) y los Fab del AcMo 2G6B6H3 (Fab 2G6B6H3) fueron usados como controles negativos. El AcMo 4H11D10B11 entero (AcMo 100 µg y AcMo 200 µg) e IgGs anti-TTPI (IgG anti-TTPI 100 µg) fueron usadas como controles positivos. Los valores del eje Y representan el porcentaje de actividad residual.

### 7.1.4 Cinética de inhibición

Se determinó la cinética de inhibición usando diferentes cantidades del AcMo 4H11D10B11 (6.25 a 100  $\mu\text{g}$ ). La figura 15A muestra la gráfica de la inhibición, se observa que la  $V_{\text{MAX}}$  disminuye conforme aumenta la cantidad de AcMo. La enzima sola presentó una  $K_M = 0.38 \pm 0.026$ , este hallazgo es consistente con el reportado por Jiménez et al, 2000. Como control negativo, el AcMo generado contra *T. gondii* que, como se esperaba, no alteró la actividad catalítica. Como controles positivos se usaron IgGs anti-TTPI, que causaron una disminución significativa en  $V_{\text{MAX}}$ . Por otra parte, con el procesamiento de los datos se obtuvo la gráfica de dobles recíprocos o Lineweaver-Burk (figura 15B), en ella se muestra un patrón típico no competitivo, la  $V_{\text{MAX}}$  disminuye y la  $K_M$  permanece constante, lo cual sugiere que el AcMo 4H11D10B11 no se une al sitio catalítico y por lo tanto es no competitivo con respecto al sustrato.



B)

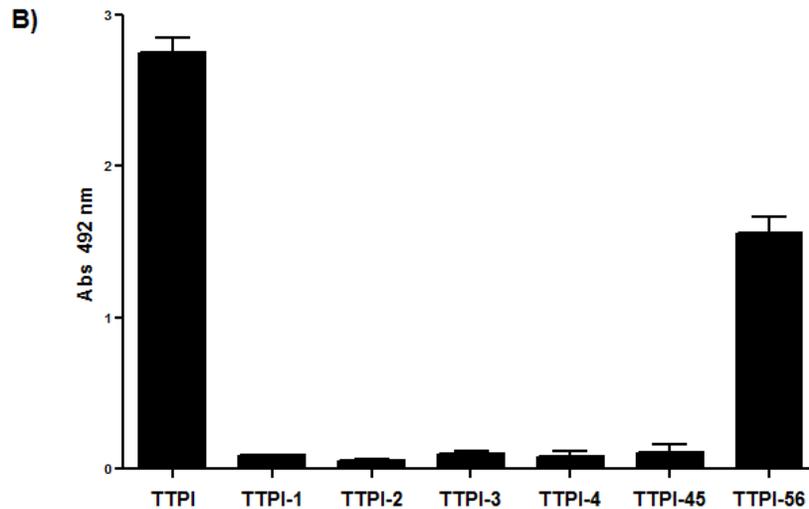
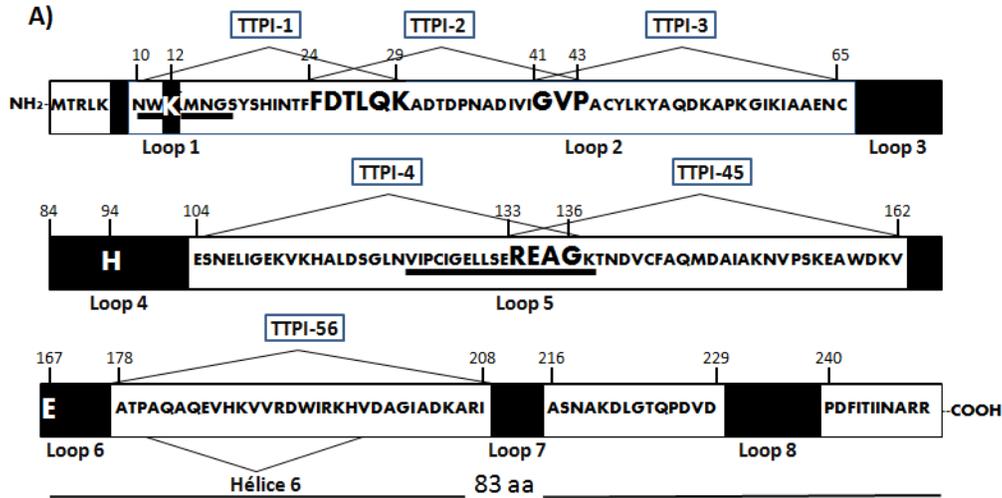


**Figura 15.** Perfiles de inhibición del AcMo 4H11D10B11 mAb sobre la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* (TTPI). A) Gráfica de la inhibición de la actividad de la TTPI usando concentraciones variables de AcMo. B) La gráfica de dobles recíprocos muestra una inhibición no competitiva del AcMo. La TTPI (10 ug) incubada sin ningún anticuerpo (◆) y diferentes concentraciones de AcMo 4H11D10B11: 6.25 mg/mL (■), 12.5 mg/mL (▲), 25 mg/mL (●), 50 mg/mL (○) y 100 ug/mL (+). El AcMo hecho contra la roptria de *Toxoplasma gondii* (anti-*T. gondii*) y las IgGs de ratón hechos contra la TTPI (anti-TTPI) se utilizaron como controles negativos y positivos para los ensayos.

### 7.1.5 Identificación del epítipo del AcMo 4H11D10B11

La figura 16A muestra el posicionamiento de seis péptidos sintéticos diseñados acorde a la secuencia de aminoácidos deducida del gen de la TTPI reportada en GenBank con el número de acceso AF244894.1 (TTPI-1 (10-NWKMNNGSYSHINTFFDTLQK-29), TTPI-2 (24-FDTLQKADTDPNADIVIGVP-43), TTPI-3 (41-GVPACYLKYAQDKAPKGIKIAAENC-65), TTPI-4 (104-SNELIGEKVKHALDSGLNVIPCIGELLSEREAG-137), TTPI-45 (133-REAGKTNDVCFQAQMDAIAKNVPSKEAWDKV-162) and TTPI-56 (178-ATPAQAQEVHKVVRDWIRKHXVDAGIADKARI-208) y la figura 16B muestra el ELISA donde AcMo reconoció a la TTPI y al péptido TTPI-56, lo que indica que el epítipo del AcMo se encuentra dentro de la secuencia primaria 178-

ATPAQAQEVHKVVRDWIRKHYVDAGIADKARI-208 de la enzima, en la cual está contenida la hélice 6.



**Figura 16.** Identificación del sitio de unión del AcMo 4H11D10B11 a la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* (TTPI). A) La estructura primaria de la TTPI (250 aa) está representada por tres barras de 83 aa. Las regiones no conservadas están dentro de los segmentos blancos, excepto las secuencias subrayadas. Los péptidos sintetizados fueron diseñados sobre estas regiones y están indicadas debajo de los triángulos. Sólo dos regiones no conservadas en la región carboxilo terminal no fueron consideradas para el diseño de los péptidos. Las letras más grandes indican las posiciones traslapadas entre los péptidos sintetizados. Las regiones altamente conservadas están indicadas por rectángulos negros; y las letras en blanco indican los residuos del sitio activo (K12, H94 y E167). Las posiciones de las asas están indicadas bajo las barras. B) El gráfico del ELISA que muestra los datos de unión del AcMo 4H11D10B11 a los seis péptidos sintéticos. Sólo el péptido TPI-56 (ver secuencia en 17A) y la TTPI fueron reconocidos por el AcMo.

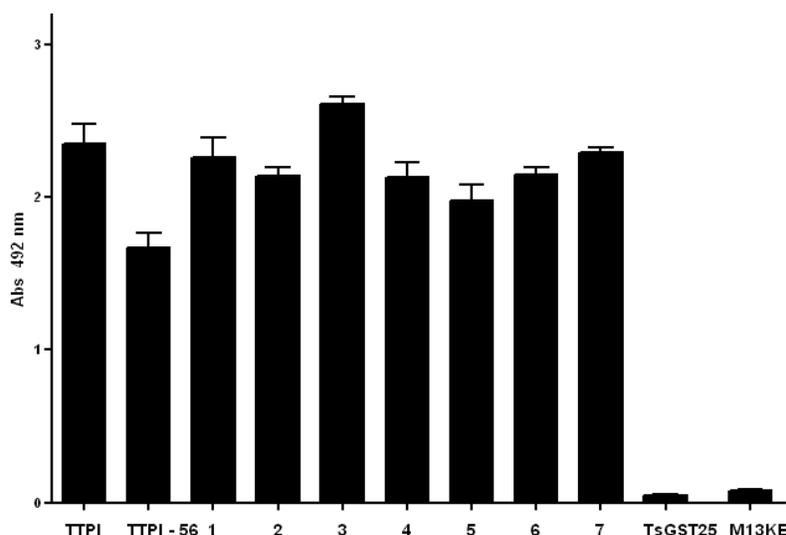
Con la finalidad de acotar la identificación del epítipo dentro de la secuencia contenida en el péptido TTPI-56, siete clonas de péptidos mimótopos (12 residuos) desplegados en fagos filamentosos M13 fueron aislados mediante la interacción con el AcMo 4H11D10B11. Las secuencias primarias deducidas de estas clonas fueron alineadas con una parte del péptido TTPI-56 para encontrar similitudes (figura 17). Las secuencias primarias de seis péptidos fueron parcialmente compatibles con la secuencia del péptido TTPI-56, en al menos una posición. Por el contrario, sólo un péptido (fago 5) no coincidió en ninguna posición con el péptido TTPI-56. Por otro parte, los péptidos mimótopos comparten varias posiciones comunes entre ellos (incluyendo el fago 5), de forma interesante, casi todos los péptidos analizados mostraron una alta tasa de recurrencia de triptófano, tirosina y prolina.

TTPI-56	V	R	D	<b>W</b>	I	<b>R</b>	K	<b>H</b>	V	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	I	A	D	K	A
Fago 6 (x7)				N	A	<b>H</b>	L	Q	S	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	P	Q	T		
Fago 7						Q	V	V	S	<b>D</b>	<b>N</b>	R	W	P	T	M	K
Fago 3				W	<b>H</b>	Y	N	W	W	L	P	<b>A</b>	<b>G</b>	P	R		
Fago 4	S	I	S	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	W	<b>H</b>	W	A	S	V					
Fago 1				H	L	Y	H	Y	S	Y	A	<b>A</b>	Y	W	P		
Fago 2 (x2)				<b>W</b>	H	W	F	R	Y	P	<b>A</b>	P	P	P	E		
Fago 5				F	H	W	S	W	Y	T	P	S	R	P	S		

**Figura 17.** Secuencias deducidas de los dodecapéptidos (mimótopos) identificados. Un total de 14 mimótopos se obtuvieron después de tres rondas de tamizaje de una biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en fagos utilizando el AcMo 4H11D10B11. Las clonas de fagos 6 y 2 se aislaron siete y dos veces, respectivamente, de esta biblioteca. Las posiciones que coinciden con una parte de la secuencia contenida en el péptido TTPI-56 se indican con cuadrados negros y los aminoácidos con posiciones comunes entre los mimótopos con cuadros de color gris. La clona que muestra la señal positiva más alta en ELISA está marcada con un rectángulo.

Finalmente, en la figura 18 se muestran los valores de ELISA de la unión del AcMo 4H11D10B11 a los péptidos mimótopos desplegados en fagos, en el cual el fago 3 tiene el valor más alto. En contraste, el AcMo no se une a los fagos sin péptido (M13KE) ni con el fago no relacionado que despliega el mimótopo de TsGST25. Adicionalmente, en un

ensayo paralelo, todos los fagos fueron probados con el AcMo anti-*T. gondii* y ninguno de los mimótopos del sitio de unión del AcMo 4H11D10B11, el fago M13KE, y el fago TsGST25 reaccionaron con él (datos no mostrados).

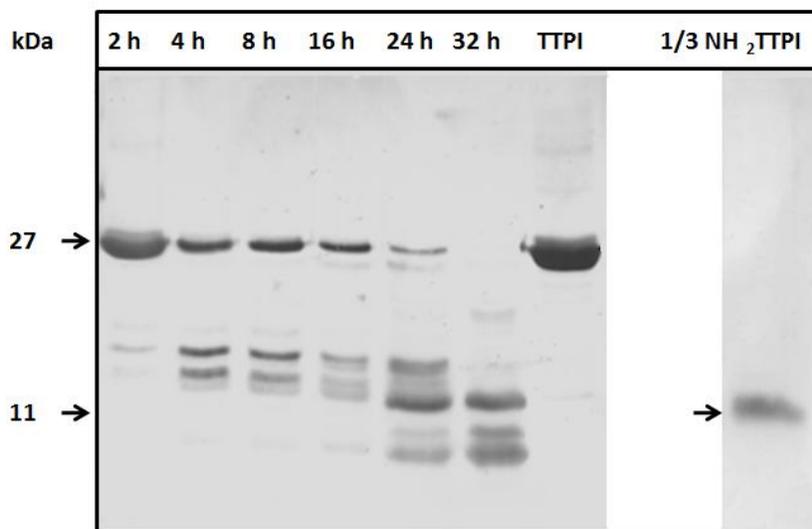


**Figura 18.** Especificidad de la unión del AcMo 4H11D10B11 a los mimótopos. Las clonas de fagos con mimótopos (1-7) se ensayaron en ELISA para evaluar su reactividad con el AcMo. La TTPI se utilizó como control positivo y un fago M13 sin inserto (M13KE) y un mimótopo no relacionado (TsGST25) se utilizaron como controles negativos de antígeno. Adicionalmente, el AcMo anti-*T. gondii* se ensayó en paralelo como control negativo (dato no mostrado).

## 7.2 Segunda parte

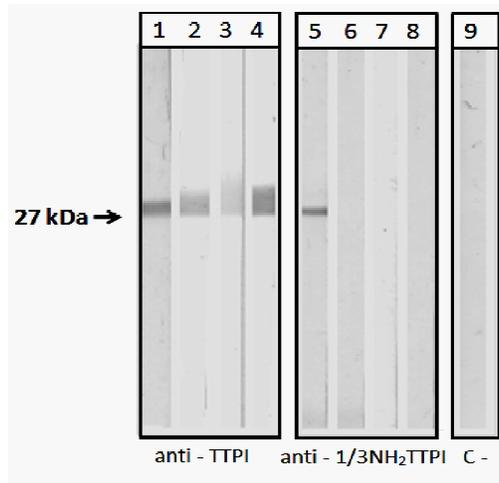
### 7.2.1 Obtención del fragmento 1/3NH<sub>2</sub>TTPI

Se obtuvo un fragmento amino terminal de la TTPI mediante la digestión de la H<sub>6</sub>-TTPI con la proteasa V8. La figura 19 muestra la cinética de digestión de la H<sub>6</sub>-TTPI y la purificación del 1/3NH<sub>2</sub>TTPI. Se determinó que el tiempo óptimo de digestión fue de 32 h, ya que se obtiene un enriquecimiento de un péptido de aproximadamente de 11 kDa. Dicho péptido se purificó mediante la columna de afinidad a metales (último carril a la derecha). El rendimiento obtenido para la purificación del fragmento fue de 400 µg, partiendo de 1000 µg de TTPI y digiriendo con 150 µg de la proteasa.



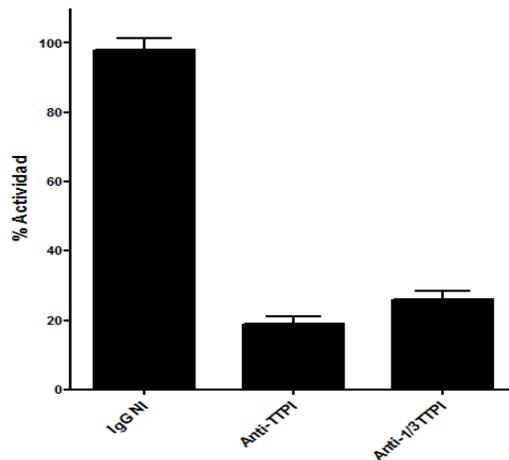
**Figura 19.** Cinética de digestión. En el gel del lado izquierdo se muestran la electroforesis de la digestión de la TTPi con la proteasa V8 a diferentes tiempos: 1) 2 h, 2) 4 h, 3) 8 h, 4) 16 h, 5) 24 h, 6) 32 h, y 7) TTPi sin digerir. En el carril de la extrema derecha, se muestra la purificación del fragmento obtenido después de la digestión y la purificación por medio de cromatografía de afinidad a metales.

Los anticuerpos obtenidos contra el 1/3NH<sub>2</sub>TTPi tuvieron un título de 1:10,000 determinado por ELISA. La figura 20 muestra la especificidad del anticuerpo anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPi. Este anticuerpo fue enfrentado con varias TPIs provenientes de otros parásitos, así como a la del hospedero intermediario mediante la técnica de la IET. Los resultados sugieren que los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPi reconocen sólo a la TTPi (carril 5), y no a las otras enzimas (carriles 6-8). En contraste anticuerpos hechos contra cada una de las enzimas completas de los organismos utilizados, reconocen a su homólogo (carril 1-4). El suero preimmune usado como control no reconoció a la TTPi utilizada en el experimento (carril 9).



**Figura 20.** Inmunoelectrotransferencia para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra el 1/3NH<sub>2</sub>TTPI. En los carriles 1-4 se encuentran las TPIs de *Taenia solium* (cestodo), *Sus scrofa* (mamífero), *Schistosoma mansoni* (tremátodo) y *Entamoeba histolytica* (protozooario), enfrentados a su antisuero homólogo correspondiente. En los carriles 5-8 se encuentran las TPIs mencionadas en el mismo orden, pero enfrentadas al suero anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI. El carril 9 es un control de suero preinmune enfrentado a la TTPI.

En el ensayo de inhibición de la actividad de la TTPI, utilizando 100 µg de las IgGs anti-TTPI y anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI, mostró que ambas tienen la capacidad de abatir la actividad en un 81 %, y 74 %, respectivamente (figura 21). Como control de este ensayo se utilizaron IgGs preinmunes de conejo, este control no inhibió la actividad de la enzima.



**Figura 21.** Ensayo de actividad de la Triosafosfato isomerasa de *Taenia solium* (TTPI). Los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI mostraron ser tan efectivos inhibiendo la actividad de la TTPI, como los anticuerpos hechos contra la proteína completa. El control de suero preinmune no inhibe la actividad de la enzima.

## 7.2.2 Mimótopos de 1/3NH<sub>2</sub>TTPI

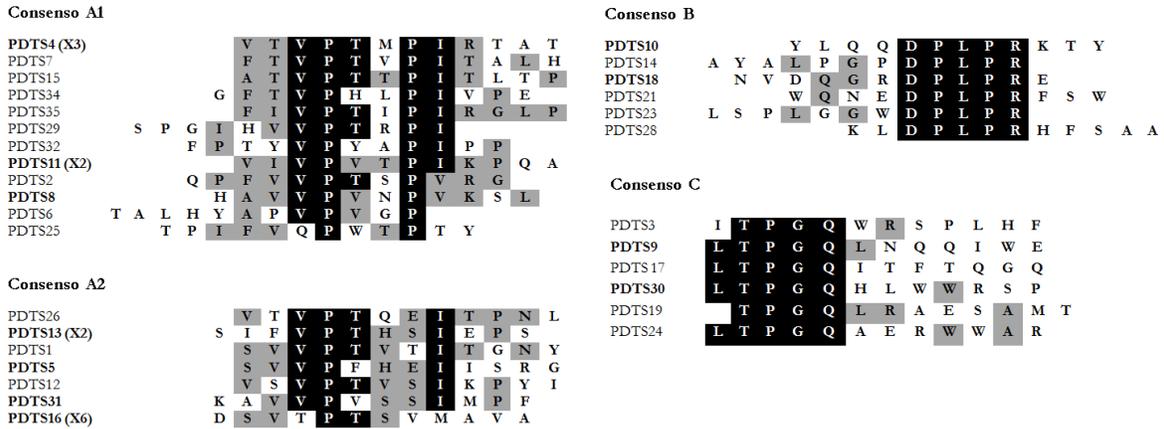
El proceso de tamizaje involucra un incremento en la astringencia de la solución de lavado, lo que permite seleccionar las clonas más afines, y esto se ve reflejado en la cantidad de fagos que se recuperan después de la elución y su posterior amplificación para entrar en la siguiente ronda de selección. A continuación se muestra una tabla del proceso de selección, en ella se observa el enriquecimiento de clonas afines al 1/3NH<sub>2</sub>TTPI. Entre la primer ronda y la última hay un enriquecimiento de  $6.2 \times 10^4$  %.

**Tabla 1.** Enriquecimiento de las clonas de fagos que se unen a las IgGs anti-NH<sub>2</sub>TTPI. Conforme avanzan las rondas de selección, se aumenta la astringencia de los lavados y con ello se enriquece la cantidad de fagos recuperados.

Ronda	Lavados con TBS (%Tween 20)	Fagos de entrada (ufp)*	Fagos eluidos (ufp)	Tasa de recuperación (fagos eluidos/fagos de entrada)
1	0.05	$8 \times 10^{11}$	$8.5 \times 10^3$	$1.06 \times 10^{-8}$
2	0.1	$8 \times 10^{11}$	$6.2 \times 10^4$	$7.75 \times 10^{-8}$
3	0.3	$8 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^8$	$2.12 \times 10^{-4}$
4	0.5	$8 \times 10^{11}$	$5.3 \times 10^8$	$6.62 \times 10^{-4}$

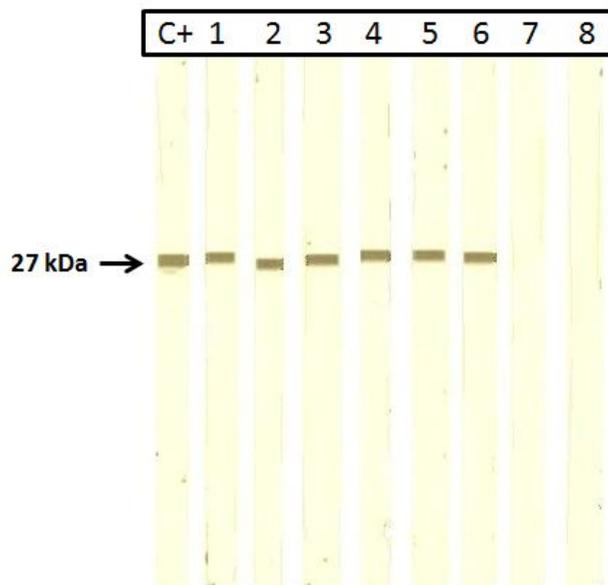
\*ufp: unidad formadora de placa

Después de las rondas de selección mediada por las IgGs anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI, un total de 41 clonas fueron escogidas al azar y secuenciadas. De los datos de las secuencias nucleotídicas se dedujo la secuencia primaria de los péptidos, de las cuales encontramos sólo cuatro secuencias repetidas. Al analizar las secuencias (figura 22) encontramos cuatro consensos marcados, el primero con el motivo VPTXPI (A1); el segundo con el motivo VPTXXI (A2), que difiere del primero por la ausencia de la prolina; el tercero con el motivo DPLPR (B), y el cuarto con el motivo LTPGQ (C).



**Figura 22.** Consenso de los mimótopos pertenecientes a la región 1/3NH<sub>2</sub>TTPI. Las secuencias primarias deducidas revelaron la presencia de cuatro consensos marcados. En color negro están marcados los residuos de aminoácidos del consenso y en color gris los residuos en posiciones coincidentes entre las clonas.

Con el propósito de verificar la capacidad de estos mimótopos para generar anticuerpos reactivos a los epítomos presentes en la región amino terminal de la TTPI nos dimos a la tarea de inmunizar conejos, para ello formamos cuatro grupos de inmunógenos y dos clonas por separado, en total 6 conejos. El conejo 1 fue inmunizado con la clona PDTS4 (VTVPTMPIRTAT); el conejo 2 con las clonas PDTS11 (VIVPVTPIKPQA) y PDTS8 (HAVVPVNPVKSL); el conejo 3 con las clonas PDTS13 (SIFVPTHSEIPS), PDTS5 (SVVPFHEIISRG) y PDTS31 (KAVVPVSSIMPF); el conejo 4 sólo con la clona PDTS16 (DSVTPTSMVA); el conejo 5 con las clonas PDTS10 (YLQQDPLPRKTY) y PDTS18 (NVDQGRDPLPRE); y el conejo 6 con las clonas PDTS9 (LTPGQLNQQIWE) y PDTS30 (LTPGQHLWWRSP). Los sueros obtenidos fueron probados en una IET con la TTPI, la cual se muestra en la figura 23, en ella puede observarse que los conejos generaron respuesta cruzada con los epítomos de la TTPI.

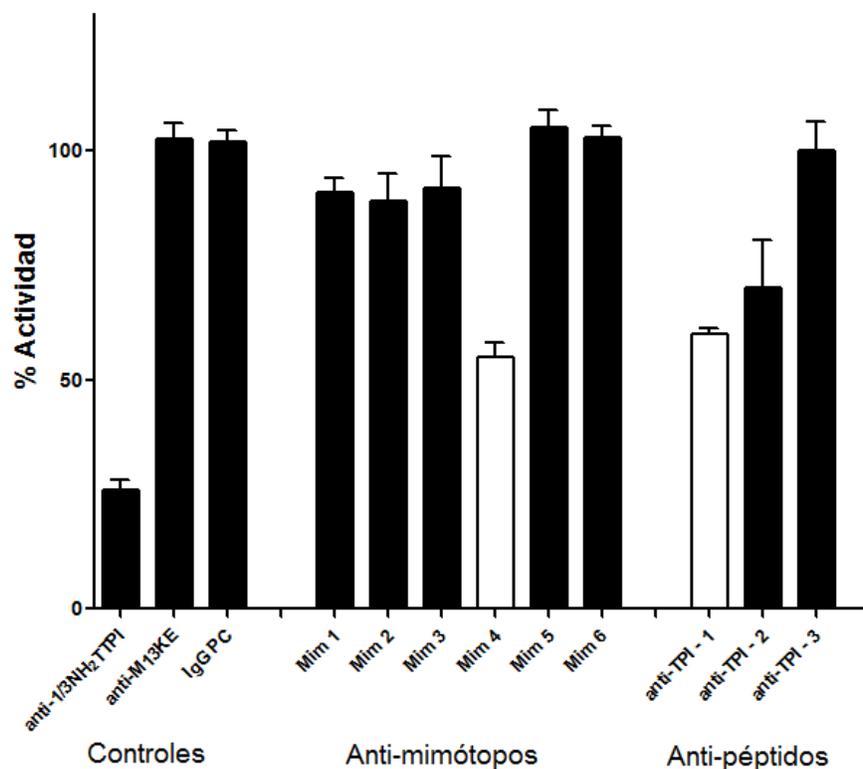


**Figura 23.** Inmunolectrotransferencia de sueros anti-mimótopos con la TTPI. Las tiras 1-6 fueron probadas con los sueros antimimótopos hechos en conejos: 1) PDTS4, 2) PDTS11-PDTS8, 3) PDTS5-PDTS13-PDTS31, 4) PDTS16, 5) PDTS10-PDTS18; y 6) PDTS9-PDTS30. Se observa que las clonas seleccionadas generaron anticuerpos que cruzan con la enzima. Como control positivo se incluyó el suero anti-TTPI hecho en conejo (C+), y como controles negativos, en las tiras 7 y 8, el suero preinmune de conejo y el suero anti-M13KE, respectivamente.

### 7.2.3 Ensayo de actividad con anticuerpos anti-mimótopos del 1/3NH<sub>2</sub>TTPI

En la figura 24 se muestran los resultados del ensayo de actividad de la TTPI con las IgGs anti-mimótopos purificadas. Se observa que las IgGs provenientes de los conejos inmunizados con los inmunógenos 1, 2 y 3 (Mim 1 – Mim 3, clonas VPTXPI) causaron sólo una inhibición ligera de aproximadamente el 10%; en tanto, las obtenidas con el inmunógeno 4 (Mim 4) una inhibición del 45 %, el cual corresponde al que sólo fue inmunizado con la clona PDTS16; en contraste, los conejos inmunizados con las clonas DPLPR (Mim 5) y LTPGQ (Mim 6), respectivamente, no mostraron inhibición. Asimismo, los anticuerpos hechos contra péptidos sintéticos pertenecientes a la región del extremo amino, TTPI-1 y TTPI-2 inhibieron la actividad en 40 y 30%, respectivamente, sólo el péptido TTPI-3 no generó anticuerpos inhibidores. Como control positivo se incluyeron las

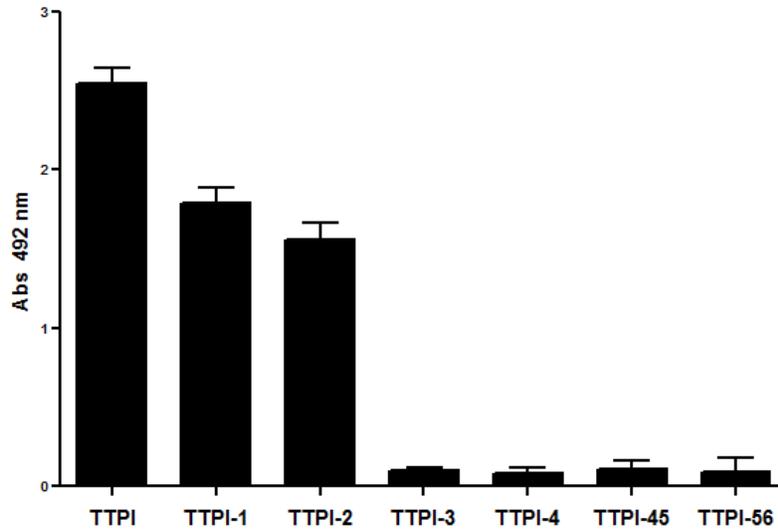
IgGs anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI, y como controles negativos IgGs preinmunes de conejo e IgGs anti-M13KE, lo cuales no alteraron la actividad de la TTPI.



**Figura 24.** Ensayo de la inhibición de la TTPI con los anticuerpos anti-mimótopos provenientes del primer tercio de la región NH<sub>2</sub>TTPI (Mim 1- 6), y las IgGs anti-péptidos (TTPI-1, TTPI-2 y TTPI-3). Los anticuerpos hechos en el conejo 4, anti-PDTS16, fueron capaces de inhibir la actividad en 45%, así como los anticuerpos anti-TTPI-1 y anti-TTPI-2. Como control positivo se incluyeron las IgGs anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI y como controles negativos a las IgGs preinmunes de conejo (IgG PC) e IgGs anti-M13KE.

## 7.2.4 Identificación de epítodos

Debido al resultado obtenido con la clona PDTS16, fue de nuestro interés identificar el sitio de unión de los anticuerpos hechos contra esta clona sobre la enzima, por lo que nos dimos a la tarea de hacer un ensayo de ELISA con los péptidos sintéticos mostrados en la Figura 16A. En la figura 25 se encuentran los resultados del ensayo de la identificación, se observa que los anticuerpos anti-PDTS16 reconocen tanto al péptido TTPI-1 como al péptido TTPI-2. Como control positivo se incluyó a la TTPI y como controles negativos los péptidos sintéticos presentes en el resto de la enzima (ver figura 16A).

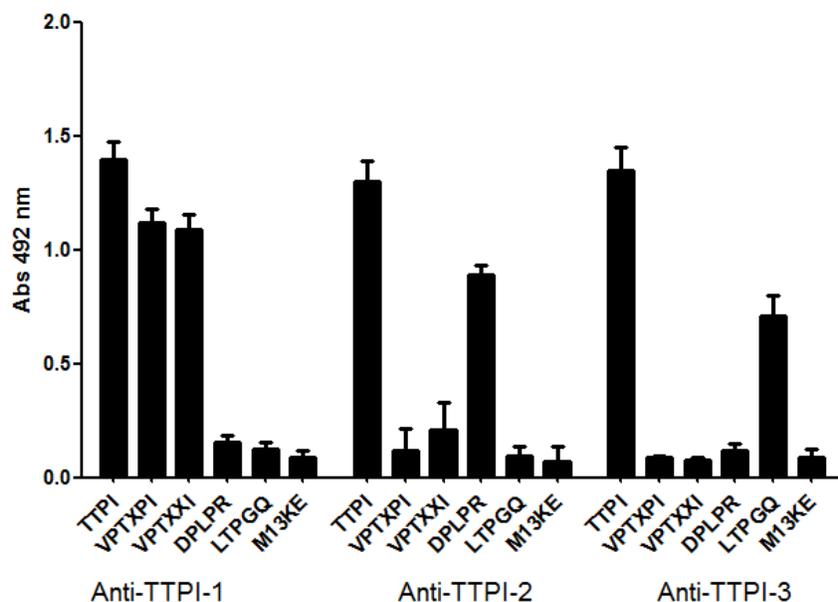


**Figura 25.** ELISA de los seis péptidos sintéticos pertenecientes a la TTPI. Los péptidos fueron enfrentados a las IgGs anti-PDTS16. Se observa que los anticuerpos sólo reconocen a los péptidos TTPI-1 y TTPI-2, así como a la TTPI (control positivo). Como controles negativos se incluyeron péptidos sintéticos localizados en las dos terceras partes restantes de la enzima (ver figura 18A).

Finalmente, tratamos de ubicar la localización de los otros dos consensos, pegando los fagos en placa y haciendo un ELISA con las IgGs anti-péptidos (TTPI-1, TTPI-2 y TTPI-3). En la figura 26 se muestra el gráfico del ensayo inmunoenzimático. Primeramente, observamos que los anticuerpos anti-TTPI-1 reconocen al motivo VPTXPI y VPTXXI, lo cual era de esperarse debido a los datos obtenidos en el experimento anterior; de igual forma, los anticuerpos anti-TTPI-2 también reconocieron a las clonas con el motivo DPLPR. En último lugar, los anticuerpos anti-TTPI-3 dieron reacción positiva con el motivo LTPGQ. Como control positivo se usó a la TTPI, y como control negativo el fago silvestre M13KE.

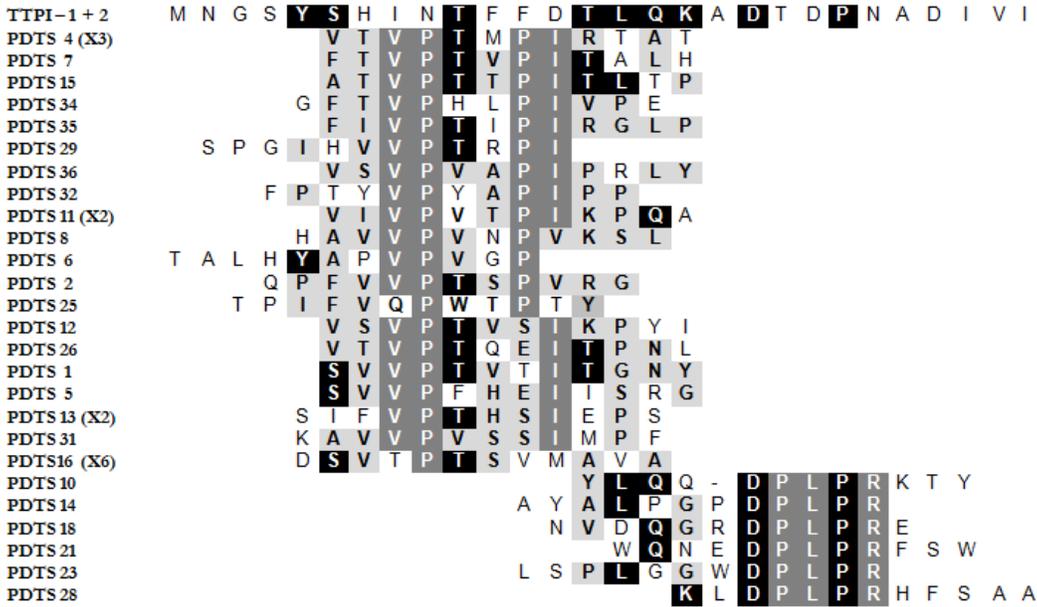
Con los datos anteriores nos dimos a la tarea de ubicar los consensos en la secuencia de los péptidos sintéticos. En la figura 27 se encuentran los alineamientos de los mimótopos con los péptidos de la región amino terminal. Encontramos que las clonas que contienen los motivos VPTXPI, VPTXXI y DPLPR presentan una zona de coincidencia que corresponde al traslape de los péptidos (FDTLQK) presentes en TTPI-1 y TTPI-2, de

hecho los motivos están separados por esta zona. Finalmente, el motivo LTPGQ se ajustó a la secuencia del péptido TTPI-3.

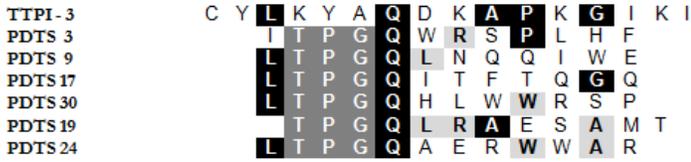


**Figura 26.** ELISA de mimótopos (VPTXPI, VPTXXI, DPLPR y LTPGQ) enfrentados a la IgGs anti-TTPI-1, anti-TTPI-2 y anti-TTPI-3. Los anticuerpos anti-TTPI-1 reconocen a los mimótopos con motivos VPTXPI y VPTXXI, los anticuerpos anti-TTPI-2 reconocen a los mimótopos con el motivo DPLPR, y los anticuerpos anti-TTPI-3 reconocen los mimótopos con el motivo LTPGQ. Como control positivo se incluyó a la TTPI, y como negativo el fago silvestre M13KE.

Consensos A1 + A2 + B



Consenso C



**Figura 27.** Alineamiento de los mimótopos obtenidos con los péptidos TTPI-1, TTPI-2 y TTPI-3. Se puede observar que las clonas que contienen los consensos A1 (VPPXPI), A2 (VPTXXI) y B (DPLPR) tienen una zona de coincidencia que corresponde al traslape de los péptidos TTPI-1 y TTPI-2 (FDTLQK). A su vez el consenso C (LTPGQ) se alinea con una parte de la secuencia del péptido TPI-3. En cuadros negros están indicadas las posiciones coincidentes con la secuencia de los péptidos de la TTPI, en cuadros grises oscuros están indicados los motivos de los consensos, y en cuadros grises claros están indicados los aminoácidos coincidentes entre los mimótopos. Con un guion está indicado un espacio introducido para optimizar el alineamiento.

## 8. Discusión

La glucosa es la principal fuente de energía para la mayoría de los organismos y la glucólisis ocupa el centro de todas las rutas metabólicas. La glucólisis es esencial para la supervivencia de los parásitos en sus hospederos respectivos. *Taenia solium* no es la excepción; este parásito posee un órgano bien desarrollado para la absorción de nutrientes, el tegumento, el cual le permite absorber la glucosa disponible de la dieta del hospedero. *Taenia solium* usa la glucosa para producir energía a partir de la glucólisis. Un componente medular de la glucólisis es la Triosafofato isomerasa, la cual lleva a cabo la interconversión reversible entre la DHAP y el 3GP. Varios estudios han demostrado la importancia de la TPI para los parásitos intestinales, es por ello que nosotros comenzamos a investigar al respecto. En estudios iniciales encontramos que la TTPI es un blanco efectivo, ya que anticuerpos policlonales hechos contra la enzima fueron capaces de inhibir su actividad enzimática, en contraste con la enzima del cerdo que no es afectada por éstos.<sup>131</sup> Adicionalmente, un ensayo de inmunización mostró que la TTPI protege a ratones inmunizados al ser inoculados intraperitonealmente con cisticercos de *Taenia crassiceps* (un taenido relacionado a *T. solium*), la carga parasitaria se vio disminuida. Por otra parte, la estructura primaria de varias TPIs fue analizada revelando que hay tres regiones con diferencias marcadas. Las principales diferencias fueron encontradas en los segmentos con posiciones en la TTPI: 17-63, 137-161 y 188-206.<sup>130</sup> Por lo tanto, en este estudio inmunizamos ratones con TTPI recombinante para obtener anticuerpos monoclonales contra estas regiones, esperando encontrar alguno que afectara la actividad enzimática de la TTPI de manera específica. Asimismo con la tecnología del desplegamiento de dodecapeptidos (mimótopos) en fagos y la producción de anticuerpos anti-mimótopos identificar nuevas regiones de la TTPI para inhibir su actividad.

Para la obtención del AcMo 4H1B10B11, inicialmente, probamos los sobrenadantes de varios hibridomas por ELISA, de esta manera obtuvimos varias clonas que producen anticuerpos que reconocen a la TTPI, y sólo unas cuantas fueron negativas. Hasta el momento no contamos con la estructura tridimensional experimental de la TTPI, por lo que los intentos para caracterizar epítomos conformacionales se dificultan, es por esa razón que nuestra intención fue buscar epítomos lineales con relevancia particular en la catálisis. Por lo tanto, seleccionamos aquellos hibridomas con los valores más altos en ELISA y que reconocieran a la TTPI por la técnica de la Inmunoelectrotransferencia bajo condiciones desnaturalizantes, con la finalidad de obtener clonas positivas que produjeran anticuerpos capaces de reconocer epítomos lineales, bajo la premisa de que buscábamos un anticuerpo específico para alguna de las regiones no conservadas ya mencionadas anteriormente. Solamente cuatro hibridomas reconocieron a la TTPI por ambas técnicas, estos fueron: 2B3, 2G6, 4H11 and 5G11; la selección de anticuerpos específicos estuvo basada en la habilidad de los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas para inhibir la actividad de la TTPI, así que se realizaron experimentos preliminares con ellos (ver figura 12), y sólo el hibridoma 4H11 satisfizo los criterios de selección: reacción positiva específica con la TTPI e inhibición de la actividad catalítica. Posteriormente, el hibridoma 4H11 fue clonado dos veces por dilución limitante, y de esta manera obtuvimos varias clonas con reacción positiva, las cuales presentaron características similares al probarlas en ensayos de inhibición (datos nos mostrados), razón por la cual escogimos al azar una de las clonas, la 4H11D10B11. Inicialmente caracterizamos la clona determinando el isotipo del AcMo, dando como resultado ser una IgG1 con cadenas ligeras  $\kappa$ , este resultado fue de gran ayuda para llevar a cabo una purificación óptima de los anticuerpos IgG1 de ratón que se unen débilmente a la proteína A de estafilococo, a concentraciones salinas bajas y pH por debajo de 8.<sup>152</sup> Aunque la IgG1 de ratón se une mucho mejor a la proteína G del gonococo, nosotros seleccionamos la proteína A debido a que ésta era la

mejor opción para la purificación posterior de los fragmentos Fab, ya que la proteína G tiene afinidad inespecífica para Fab y Fc, productos de la digestión con papaína, mientras que la proteína A sólo une los Fc.<sup>153</sup>

En el ensayo de especificidad de unión mediante una inmunoelectrotransferencia con la TTPI, en la cual usamos anticuerpos policlonales hechos contra la TTPI en conejo; en este ensayo observamos ligeras reacciones cruzadas con la enzima del cerdo (SsTPI), la de *S. mansoni* (SmTPI) y la del humano (HsTPI); y una reacción cruzada mas fuerte con la enzima de *Giardia lamblia* (GITPI). Interesantemente, la reactividad cruzada con ambos hospederos, cerdo y humano, sugiere que es posible desarrollar autoinmunidad contra la TTPI cuando la infección se ha establecido, este evento ha sido descrito en otras parasitosis, tales como la enfermedad de Chagas<sup>154</sup> y la malaria.<sup>155</sup> Asimismo, han sido encontrados autoanticuerpos contra la TPI en diversas enfermedades, tales como esclerosis múltiple,<sup>156</sup> osteoartritis,<sup>157</sup> lupus<sup>158</sup> y cáncer.<sup>159 160 161</sup> Por lo tanto, las reacciones cruzadas observadas entre estas TPIs están relacionadas a la homología en sus estructuras primarias, debido a que la TPI es una enzima altamente conservada en todos los organismos vivos, ellas comparten muchos determinantes antigénicos, esto indica que la molécula completa no debería ser considerada para inmunizar animales. Por lo tanto, nosotros proponemos el uso de péptidos diseñados sobre regiones no conservadas con marcadas diferencias entre la TTPI y la TPI del hospedero intermediario (cerdo) para desarrollar una vacuna.

Considerando la inhibición catalítica, el anticuerpo 4H11D10B11 fue probado a diferentes cantidades con la finalidad de determinar la relación dosis-efecto. Los resultados demostraron que hubo un incremento en la inhibición cuando la cantidad de anticuerpo aumentaba hasta 100 µg, por encima de esta cantidad ya no hubo mayor efecto. Teóricamente, si un dímero de TTPI tiene dos sitios de unión para el anticuerpo y un peso

molecular de 54 kDa, y un anticuerpo IgG1 de ratón tiene dos paratopos y un peso molecular de 150 kDa (ver Apéndice I), la proporción estequiométrica es 1:1, y en peso/peso es 1:3, por ejemplo, 10 µg de la enzima deberían ser inhibidos por alrededor de 30 µg de anticuerpo, pero en este experimento encontramos que es necesario adicionar 100 µg para alcanzar el máximo efecto en la inhibición. Este resultado puede ser debido a la dinámica de la unión, posiblemente algunos paratopos permanecen libres de cualquier interacción, y a su vez, lo mismo ocurre con los epítomos debido a la forma dimérica, tanto del antígeno como del anticuerpo,<sup>162</sup> en otras palabras, las interacciones no ocurren fortuitamente. Nosotros suponemos que el máximo efecto de inhibición en la proporción estequiométrica podría ser observado si la reacción ocurriera entre monómeros. La producción de Fabs es más factible que la de los monómeros de la TTPI, así que produjimos los fragmentos Fab a partir del AcMo 4H11D10B11 con la finalidad de indagar al respecto. Un Fab tiene un solo paratopo y un peso molecular de cerca de 50 kDa, por lo tanto la proporción estequiométrica es 2 moléculas de Fab por dímero de la enzima, y en peso/peso 10 µg de la enzima deberían ser inhibidos por alrededor 20 µg de Fab. el resultado del ensayo de inhibición con los Fabs mostró que el máximo efecto fue alcanzado con 40 µg, lo doble de lo esperado, aunado a esto, el efecto de inhibición fue menos que el obtenido con el anticuerpo completo, 60 % contra 76 %. La diferencia entre estos porcentajes es posiblemente causada por una pérdida en el plegamiento debido al proceso de la obtención de los Fabs, un porcentaje de moléculas no se unen o se unen débilmente, y esta circunstancia causa que el efecto inhibitorio disminuya.

El análisis cinético claramente mostró que el AcMo no compite con el sustrato por el sitio activo, sin embargo, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la enzima. La cinética de Michaelis-Menten también reveló como el anticuerpo 4H11D10B11 causa una disminución dramática en la  $V_{MAX}$ , pero el valor de  $K_M$  permanece constante (ver figura

16), esto proporciona información acerca de la eficiencia de unión del sustrato, la cual no es modificada por la interacción con el AcMo 4H11D10B11. El mecanismo por el cual el anticuerpo inhibe la catálisis no está claro, pero es posible que el anticuerpo induzca rearrreglos estructurales relevantes en la TTPI al unirse,<sup>163</sup> o evite cambios necesarios para llevar a cabo la catálisis,<sup>164</sup> dando lugar a una inactivación parcial de la enzima, o simplemente por impedimento estérico, el anticuerpo entorpece la difusión del sustrato al sitio catalítico.<sup>165</sup>

En un intento de identificar el epítipo lineal reconocido por el anticuerpo 4H11D10B11, seleccionamos dos estrategias accesibles. La primera consistió en usar péptidos sintéticos con secuencias pertenecientes a las regiones no conservadas de la TTPI, discriminamos aquellas que son conservadas tales como las asas activas, en la TPI ha sido demostrado que el asa 6 es indispensable para una actividad catalítica óptima así como el asa 7;<sup>166 167</sup> asimismo discriminamos la región inaccesible correspondiente a la interface, principalmente el asa 3, la cual confiere estabilidad al dímero.<sup>168</sup> Al final, identificamos un segmento grande en la región amino terminal y dos pequeños en la estructura primaria restante. De estas regiones sintetizamos seis péptidos (ver figura 17A). El análisis hecho por medio de un ELISA mostró que el anticuerpo 4H11D10B11 se une al péptido TPI-56, lo cual proporcionó un sitio aproximado del sitio de unión, ya que este péptido abarca 30 residuos y probablemente en él podrían encontrarse varios epítipos. Por lo tanto, con la finalidad de encontrar el epítipo, usamos la técnica de despliegue en fagos. Después de tamizar una biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en fagos con el AcMo 4H11D10B11, obtuvimos 14 clonas que al comparar su estructura primaria deducida (a partir de la secuencia nucleotídica) con la secuencia primaria del péptido TPI-56 encontramos que estos mimetizan una parte de este péptido. Si bien ninguna de las clonas tiene una homología marcada con la estructura primaria del

péptido TPI-56, entre ellos comparten aminoácidos en algunas posiciones que abarcan la secuencia <sup>193</sup>WIRKHXVDAGIAD<sup>204</sup> (ver figura 16). Cabe mencionar que la región homóloga de este péptido fue previamente identificado por Reynolds y colaboradores (1994) en la TPI de *S. mansoni* y corresponde a un epítipo para células T. <sup>169</sup> De forma interesante, los 14 péptidos desplegados en fagos fueron reconocidos por el AcMo 4H11D10B11 en un ensayo de ELISA, contrario a lo que fue observado con el fago M13KE (sin inserto) y el fago que desplegaba un péptido de la GST25 de *T. solium* (TsGST25). El mismo ensayo se hizo paralelamente con IgG preinmunes de ratón y con un AcMo no relacionado (anti *T. gondii*) y no hubo reacción alguna. Esto sugiere que los valores obtenidos en el ELISA son debidos únicamente a la interacción entre el péptido desplegado y el AcMo 4H11D10B11 y a ninguna otra interacción con las proteínas del fago y apoya la hipótesis de que estos péptidos mimetizan la estructura del epítipo lineal que reconoce el AcMo 4H11D10B11 en la TTPI, por lo tanto son considerados como mimótopos, situación vista anteriormente en otros estudios. <sup>170 171</sup>

En la segunda parte de este estudio, exploramos otra región interesante de la enzima, nos enfocamos a buscar posibles sitios de inhibición en el primer tercio de la región amino terminal, ya que como se mencionó antes, es ahí donde se encuentra la región menos conservada de la enzima, con la excepción de pequeñas regiones importantes para estabilidad del dímero. Cuando el antígeno de interés comprende varios dominios, es posible hacer el estudio en fragmentos o secciones grandes y de esta manera se puede demostrar cuál de los dominios contiene el epítipo, que puede ser lineal o conformacional. La producción de los fragmentos puede ser de forma recombinante, pero el proceso es muy tedioso, pero con la ventaja que permite controlar el tamaño preciso del fragmento. Por otra parte, la producción proteolítica es menos compleja, y se pueden usar varias proteasas para obtener una colección de fragmentos. En este estudio, generamos el primer

tercio amino terminal, analizando la secuencia primaria de la TTPI y buscando los sitios de corte de algunas proteasas, determinamos que la enzima idónea era la proteasa V8 estafilocócica, ya que corta en el residuo del ácido glutámico (E)<sup>172, 173</sup> por el lado carboxilo y la TTPI presenta varios glutámicos en posiciones 88, 96, 103, 106 y 110, los cuales darían el tamaño del fragmento deseado. De esta manera es como obtuvimos un fragmento de aproximadamente 11 kDa digiriendo por 32 horas, el fragmento fue purificado por afinidad a metales (Ni) con la ventaja de que TTPI tenía un péptido etiqueta de seis histidinas por el lado amino terminal, lo cual nos proporcionó la certeza de que el fragmento de 11 kDa correspondía al primer tercio de la enzima.

Iniciamos el análisis del fragmento obtenido, al cual denominamos 1/3NH<sub>2</sub>TTPI, primeramente verificamos si éste inducía anticuerpos con capacidad inhibitoria de la actividad de la TTPI. Después de inmunizar conejos y obtener los sueros, encontramos que los anticuerpos policlonales anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI tuvieron la capacidad de inhibir la actividad catalítica de manera efectiva tanto como los anticuerpos hechos contra la TTPI completa, esto sugiere que la mayor parte de los anticuerpos dirigidos contra la enzima completa, y que son inhibitorios, tiene como sitio de unión epítomos localizados en el primer tercio de la enzima. Por otra parte, los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI mostraron ser específicos, ya que al enfrentarlos con las TPIs de otros organismos, solo reconocieron a la enzima de *T. solium*, lo cual es consistente debido a que están dirigidos contra una zona poco conservada.

Con la finalidad de profundizar más acerca de las propiedades del fragmento 1/3NH<sub>2</sub>TTPI, tamizamos la biblioteca de péptidos aleatorios desplegados en fagos usando como blanco de unión las IgGs anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI. Al analizar las secuencias deducidas de las clonas seleccionadas encontramos cuatro consensos marcados, VPTXPI, VPTXXI, DPLPR y LTPGQ, los dos primeros están altamente relacionados, pertenecían a un sólo grupo muy

abundante que fue subdividido debido a la presencia o ausencia de una prolina en el motivo. Este resultado nos sugería la presencia de tres epítomos inmunodominantes<sup>174</sup> en la región amino terminal, pero al comparar con la estructura primaria de la TTPI no encontramos relación alguna, lo cual sugería dos posibilidades: 1) que los péptidos mostrados en los fagos representaban epítomos conformacionales o 2) que los péptidos mimetizaban partes de la secuencia primaria de la TTPI y por lo tanto correspondían a epítomos lineales. Anteriormente ha sido estudiada la habilidad que tienen este tipo de péptidos aleatorios de simular el comportamiento de un antígeno nativo.<sup>175, 176, 177</sup>

La siguiente etapa del análisis consistió en determinar si los péptidos mimótopos eran capaces de inducir una respuesta cruzada con el antígeno nativo. En la literatura se ha reportado que es posible llevar a cabo la inmunización de animales de laboratorio directamente con los fagos seleccionados. Se ha demostrado que las proteínas de los fagos filamentosos potencian la inmunogenicidad, y hace que sea innecesaria la inclusión de un adyuvante, facilitan la presentación de los péptidos al sistema inmune, e inducen una respuesta dependiente de células T.<sup>178, 179, 180</sup> Por lo tanto, la posibilidad de inmunizar directamente con fagos filamentosos es importante, ya que los péptidos desplegados en las proteínas estructurales de los fagos propician un plegamiento adecuado (ver Apéndice II), el cual puede ser modificado si éstos son aislados de este contexto, por ejemplo, que el péptido sea insoluble, o soluble sólo en solventes orgánicos, lo cual no sería apropiado para hacer inmunizaciones.

Seleccionamos un total de 11 clonas, para producir anticuerpos en conejos, utilizamos un inóculo de  $10^{14}$  ufp, debido a que Yang y colaboradores (2005) reportaron que al usar esta cantidad de fagos obtienen el título más alto de anticuerpos al inmunizar ratones.<sup>181</sup> Encontramos que los anticuerpos producidos reconocieron a la TTPI en una IET, lo cual indica que los péptidos generan anticuerpos que cruzan con algunas secuencias de la

enzima, es decir mimetizan los epítomos presentes, por lo tanto, el mimetismo que realizan se da a dos niveles: el primero por mimetismo de la estructura antigénica, y el segundo por mimetismo de la inmunogenicidad. Se dice que un mimótopo tiene la propiedad de mimetismo antigénico cuando es reconocido por un anticuerpo específico. Esto es lo que abre la posibilidad de que los péptidos de la biblioteca aleatoria interaccionen con los anticuerpos hechos contra la TTPI. Las propiedades antigénicas del mimótopo son de gran ayuda para determinar las secuencias que son reconocidas por los anticuerpos, como ya se observó en el caso del AcMo 4H11D10B11, con los cuales se pudo hacer la identificación del sitio de unión. Pero por otra parte, cuando un péptido tiene la capacidad de simular la respuesta inmunogénica o mimetiza el comportamiento inmunológico del antígeno nativo, entonces se dice que es un mimótopo inmunogénico.<sup>182</sup> Esta condición es esencial cuando el objetivo que se persigue es el de encontrar un péptido que sea candidato para el desarrollo de una vacuna.<sup>183, 184</sup>

Debido a las características mencionadas anteriormente de los mimótopos obtenidos, probamos su capacidad de inhibición de la actividad de la TTPI. Sólo los anticuerpos hechos contra los inmunógenos 1 - 4 (Mim 1 - 4) fueron capaces de inhibir la actividad en grados variables, muy ligera en el caso de los tres primeros, y marcada para el mimótopo 4 (anticuerpos hechos contra la clona PDTS16). Adicionalmente, fueron incluidos en el ensayo los anticuerpos hechos contra los péptidos sintéticos (TTPI-2, 2 y 3), revelando que los anti-TTPI-1 y anti-TTPI-2 fueron capaces de inhibir, a diferencia de los anti-TTPI-3, que no alteraron la actividad. Estos hallazgos sugirieron que en la secuencia conformada por los péptidos TTPI-1 más el péptido TTPI-2 existe al menos un epítomo importante para la catálisis, y que el péptido TTPI-3 no aporta nada al fenómeno de la inhibición que se observa con los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI. Esto es lógico, ya que la mayor parte de este péptido corresponde a la interfase y es inaccesible para que los anticuerpos interaccionen

con su epítipo en la proteína nativa. Por otro lado, cabe mencionar que la inhibición causada por los anti-TTPI-1 y anti-TTPI-2 no es tan efectiva como la observada con los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI, esto puede deberse a que se pierden algunos epítopos conformacionales que pudieran mantenerse intactos en el fragmento amino terminal. En conjunto, fue relevante el resultado de la inhibición causada por los anticuerpos anti-PDTS16 y el obtenido con los anticuerpos anti-péptidos sintéticos, ya que dio la pauta para identificar el sitio de unión de estos anticuerpos.

Posteriormente, con un ensayo de ELISA determinamos que los anticuerpos anti-PDTS16 reconocieron a los dos péptidos, el TTPI-1 y el TTPI-2, debido a que éstos están traslapados en 6 residuos (FDTLQK). Esto sugiere que esta secuencia forma parte del epítipo que reconocen los anticuerpos anti-PDTS16, y que en la enzima representa un sitio importante para la catálisis. La secuencia FDTLQK forma parte de la hélice  $\alpha$ 1, la cual se encuentra próxima a la interfase. Pudimos confirmar este resultado con un ensayo de ELISA en el cual se pegaron a la placa las clonas empleadas en la inmunización. Los anticuerpos anti-TTPI-1 y anti-TTPI-2 reconocieron a la clona PDTS16, pero también dieron señal positiva para las clonas que contenían el motivo VPTXPI, VPTXXI, y DPLPR, respectivamente, lo cual sugirió que estos motivos se encuentran adyacentes o que mimetizan la secuencia traslapada. Adicionalmente, el experimento reveló que las clonas con el motivo LTPGQ fueron reconocidas por los anticuerpos anti-TTPI-3. Finalmente hicimos una alineación de los mimótopos con los péptidos sintéticos (ver figura 27) y de esta manera comprobamos que los mimótopos comparten algunas posiciones con los péptidos, y que las clonas con motivos VPTXPI, VPTXXI y DPLPR comparten la región de traslape. Considerando los resultados de inhibición con anticuerpos anti-mimótopos, resalta que sólo es posible inducir anticuerpos inhibitorios si se incluye la región de traslape (FDTLQK), como fue observado con los anticuerpos anti-TTPI-2, pero si además el motivo

VPTXXI es incluido, la inhibición aumenta y es más consistente. En el caso de los anticuerpos anti-TTPI-2 hubo mayor variación, lo cual se refleja en la barra de error; para el caso de las clonas con el motivo DPLPR, éstas sólo contienen parcialmente la región de traslape (ver figura 27), lo cual se confirma con la falta de reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-TTPI-1, y como consecuencia no fueron capaces de inducir anticuerpos que inhibieran la actividad de la TTPI. Adicionalmente, cabe mencionar que las clonas que contienen el motivo VTPXPI en adición a la región FDTLQK no son tan efectivas induciendo anticuerpos inhibitorios, probablemente por la presencia de la segunda prolina. Por otro lado, se observó que sólo la clona PDTS16 cumplió con el objetivo de este trabajo, siendo ésta una de las clonas que pertenece al motivo VPTXXI, posiblemente porque ésta mimetiza en plenitud la estructura antigénica y las propiedades inmunogénicas de esa región de la TTPI. Estas variaciones se han observado en otro estudio, Davies y colaboradores (1999) encontraron que los mimótopos de un tipo de colágeno dieron una reacción inmunológica variable dependiendo de su secuencia primaria.<sup>185</sup> En resumen, se puede inferir que el epítipo mínimo para llevar a cabo la inhibición corresponde a la secuencia <sup>18</sup>SHINTFFDTLQK<sup>29</sup> en la TTPI, la cual está contenida en su totalidad en la hélice  $\alpha$ 1 de la enzima, la cual está involucrada en la estabilidad del dímero.

## 9. Consideraciones

Básicamente, cuando iniciamos la búsqueda de un blanco farmacológico necesitamos saber a profundidad la biología y los mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad en cuestión. En el caso de enfermedades causadas por parásitos es esencial conocer los mecanismos de infección, establecimiento, patogenicidad, evasión de la respuesta inmune, y el metabolismo en general. Por analogía uno puede extrapolar el uso de algunos blancos farmacológicos que han sido descritos como vitales para mantener la integridad orgánica de los seres vivos, estos pueden ser enzimas clave en la producción de nutrientes, tales como proteasas, enzimas regulatorias de vías metabólicas o enzimas desintoxicantes protectoras. Lo idóneo es escoger un blanco farmacológico que sea una característica particular del parásito y que no esté presente en ninguno de los hospederos involucrados, con la finalidad de evitar efectos indeseables; sin embargo, cuando un blanco seleccionado es inevitablemente altamente conservado, es posible llevar a cabo un escrutinio minucioso, secuencial y estructural, para determinar las similitudes y diferencias, y con base en esto último, establecer los sitios potenciales de inhibición. Es sorprendente como las pequeñas variaciones pueden hacer la diferencia entre inhibir la enzima de algún parásito y no afectar la enzima homóloga en el hospedero.

En este estudio, hemos descrito la obtención de un anticuerpo monoclonal específico para la TTPI. Este anticuerpo mostró tener la capacidad de inhibir la actividad de la enzima reconociendo un epítipo lineal localizado en la hélice 6. Asimismo, los fragmentos (Fabs) del AcMo fueron capaces de inhibir la función catalítica de la TTPI en forma no competitiva como el mismo AcMo.

Por otra parte, obtuvimos anticuerpos policlonales contra el fragmento 1/3NH<sub>2</sub>TTPI de la región amino terminal de la enzima. Estos anticuerpos reconocen específicamente a la TTPI y abaten la actividad de la enzima en un 74 %.

Adicionalmente, demostramos la practicidad del uso de la técnica de despliegue en fagos cuando se busca información acerca del sitio de unión de un anticuerpo, esta herramienta proporciona la información necesaria para determinar la localización aproximada de los residuos que interactúan principalmente con el paratopo y, en el caso de epítomos lineales, el tamaño del epítomo. De esta manera determinamos que el epítomo que reconoce el AcMo 4H11D10B11 está contenido en una parte de la hélice  $\alpha$  6, entre el asa 6 y la hoja  $\beta$  7, su secuencia es <sup>193</sup>WIRKHVDAGIAD<sub>204</sub>. Para el caso de los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI determinamos que un epítomo importante para la catálisis corresponde a la secuencia <sup>18</sup>SHINTFFDTLQK<sub>29</sub> localizada en la hélice  $\alpha$  1. También encontramos mimótopos que inducen respuesta cruzada con la TTPI, y uno de ellos genera anticuerpos que inhiben un 45 % la actividad enzimática, el PDTS16. Estos resultados pueden ser explotados para desarrollar terapias mejoradas tales como el desarrollo de péptidos inhibidores y una vacuna.

Este estudio y sus hallazgos en la inhibición de la TTPI causada por el anticuerpo monoclonal 4H11D10B11, los anticuerpos anti-1/3NH<sub>2</sub>TTPI y los anticuerpos anti-PDTS16, reafirman la posibilidad del uso de estas moléculas como herramientas para estudiar los mecanismos de inhibición de esta enzima tan evolucionada, con la finalidad de diseñar moléculas o identificar regiones específicas para alterar su función y por ende destruir a parásitos, como en este caso a la *T. solium*.

## 10. CONCLUSIONES

- Obtuvimos el AcMo 4H11D10B11 que inhibe la actividad de la TTPI en un 74 %, en forma no competitiva.
- Los fragmentos (Fabs) del AcMo 4H11D10B11 también son capaces de inhibir la función catalítica de la TTPI.
- El anticuerpo reconoce un epítipo lineal que tiene la secuencia <sup>193</sup>WIRKHVDAGIAD<sub>204</sub> y está ubicado en la hélice 6 de la TTPI.
- Los anticuerpos hechos contra la región amino terminal de la TTPI (1/3NH<sub>2</sub>TTPI) inhibieron la actividad de la enzima en un 74 %.
- Anticuerpos hechos contra un mimótopo (PDTS16) de la región amino terminal inhibieron la actividad de la enzima en un 45 %.
- Los anticuerpos anti-PDTS16 reconocen al epítipo que tiene la secuencia <sup>18</sup>SHINTFFDTLQK<sub>29</sub> y que pertenece a la hélice 1 de la TTPI

## 11. ANEXOS

### 11.1 Apéndice I: Anticuerpos

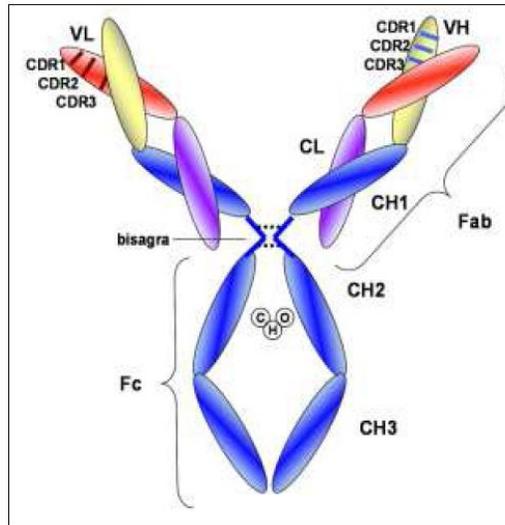
Todas las inmunoglobulinas, independientemente de su especificidad, tienen una estructura común, consistente de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas de 55-70 kDa denominadas con la letra H (del inglés heavy), unidas covalentemente a un oligosacárido; y un par idéntico de cadenas ligeras no glicosiladas de 24 kDa denominadas con la letra L (del inglés light). Un puente disulfuro une las cadenas pesadas con las ligeras. Las cadenas pesadas también están unidas entre sí por un puente disulfuro. Tal unión está localizada en una región flexible referida como “bisagra”, compuesta de aproximadamente 12 residuos de aminoácidos que están expuestos a ruptura enzimática o química. La formación de puentes disulfuro internos en las cadenas H o L da como resultado la formación de *dominios*. Las cadenas ligeras se componen de un dominio VL y un dominio CL, mientras que las cadenas pesadas presentan un dominio VH y tres dominios CH. Las regiones V de ambas cadenas pesadas y ligeras, se combinan para formar dos sitios idénticos de unión al antígeno, también conocidos como Fab<sup>186, 187, 188, 189</sup>, cada uno de los cuales contiene las regiones de determinación de complementariedad (CDR), tres para la cadena ligera y tres para la cadena pesada, las cuales interactúan directamente con un antígeno específico, siendo los CDR3 los que interactúan más estrechamente con el antígeno, ver figura 29. Por otro lado, las regiones CH2 y CH3 de las cadenas pesadas forman la fracción cristalizante, referida simplemente como Fc, región que cumple con funciones efectoras, tales como transporte placentario, potenciación de la fagocitosis (opsonización) o toxicidad celular dependiente de anticuerpo<sup>190</sup>. En las inmunoglobulinas aparecen, además de las cuatro cadenas polipeptídicas básicas, un componente glicosídico que representa el 2-14 % del peso total de la molécula<sup>191</sup>.

### 11.1.1 Paratopo

Las inmunoglobulinas se unen a los epítomos de los antígenos a través de sus sitios activos, constituidos como se ha indicado anteriormente, por los segmentos variables de las cadenas pesadas y ligeras, y donde intervienen principalmente las regiones hipervariables. Esta zona de unión al epítopo se conoce con el nombre de paratopo. Cada paratopo consiste de un armazón alternativo (FW, del inglés framework), y de los tres CDRs de cada cadena, que se componen de 17 a 20 aminoácidos con una alta tasa de variabilidad. Los CDRs y, en menor grado, los armazones alternativos, interactúan con el antígeno para formar el centro del sitio de unión a éste. Los CDR3 de cada cadena son los que interactúan con mayor intensidad con el antígeno. Este conocimiento de la estructura del anticuerpo ha facilitado la creación de moléculas de anticuerpo completamente fuera de su hospedero natural (anticuerpos recombinantes)<sup>192, 193, 194</sup>. Modificaciones ligeras en algunos aminoácidos de estos CDRs implican un espectro amplio de posibilidades de unión al antígeno, manteniendo sin variaciones el resto de la molécula. De hecho, esta es una técnica empleada para mejorar la afinidad de anticuerpos recombinantes, en la cual los aminoácidos de uno o más de los CDRs son sustituidos con diferentes residuos seguidos por la selección de clonas con la más alta afinidad para el antígeno blanco. Una variante más fina de este método consiste en analizar la secuencia completa de los CDRs para identificar aminoácidos que están activamente involucrados en la unión al antígeno<sup>195, 196, 197, 198</sup>. Siguiendo este método la afinidad puede incrementar hasta en treinta veces.<sup>199</sup>

Respecto al armazón alternativo, se puede considerar que es una estructura constante, de modo que sustituciones en los residuos que la constituyen, no afectan la especificidad de combinación; en sí, constituye una estructura de sostén, pues su función es mantener

el espacio adecuado entre los CDRs, para que éstos puedan ser presentados al antígeno.<sup>130</sup>



**Figura 29.** Estructura de un anticuerpo IgG. Consta de dos cadenas pesadas, con tres dominios constantes (CH1, 2 y 3, azul) y uno variable (VH, color amarillo); y dos cadenas ligeras, con un dominio constante (CL, morado) y un dominio variable (VL, rojo). Dentro de las regiones variables de cada cadena existen tres regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR1, 2, y 3) que son las que interactúan con el antígeno. Tomada de <sup>185</sup>

### 11.1.2 Epítipo

Un epítipo es una zona situada en la superficie de una molécula de un antígeno reconocida por un anticuerpo o un receptor de antígeno; los epítipos se denominan también determinantes antigénicos. Un epítipo de célula T es un péptido corto derivado de un antígeno proteico. Se une a una molécula de MHC (complejo principal de histocompatibilidad) y es reconocido por una célula T determinada. Los epítipos de las células B son determinantes antigénicos reconocidos por las células B y normalmente son discontinuos en la estructura primaria.

Los epítipos se pueden dividir en epítipos lineales (también conocidos como epítipos continuos) y no lineales (también conocidas como epítipos conformacionales o discontinuos). Los epítipos lineales son contiguos en la secuencia de aminoácidos, de esta manera, no es preciso que la proteína se encuentre plegada en su conformación nativa

para que se una el anticuerpo. Los epítomos conformacionales están formados por diversas regiones separadas en la secuencia primaria, que se aproximan entre sí por el plegamiento tridimensional de la proteína. Los anticuerpos que reconocen epítomos conformacionales sólo reaccionan con éstos cuando la proteína se encuentra correctamente plegada.

### 11.1.3 Mimótopos

La unión entre el antígeno y el anticuerpo tiene una gran especificidad, de tal manera que una inmunoglobulina se unirá fundamentalmente y con mayor afinidad, a un antígeno específico. En algunos casos el anticuerpo podrá unirse a antígenos con epítomos muy similares, aunque en este caso la afinidad de la unión es mucho menor. También es posible que un mismo epítomo se encuentre en dos antígenos diferentes, en cuyo caso el anticuerpo reaccionará con los dos antígenos, diciéndose entonces que existe una reactividad cruzada. Los trabajos preliminares de Geysen y colaboradores demostraron que ciertos péptidos, aunque con secuencias diferentes al epitope nativo presente en el antígeno, tenían la habilidad de interactuar con el paratopo de forma similar como sucede con el epítomo nativo. Ellos clasificaron tales péptidos como mimótopos. El concepto de mimótopo juega un papel principal en la evolución de bibliotecas de péptidos aleatorios usando la técnica de despliegue en fagos (ver figura 28). Por lo tanto, mimótopos son péptidos secuenciales que son capaces de inducir una respuesta inmune por mimetismo de las características de un epítomo, ya sea secuencial o conformacional, de naturaleza proteica o no proteica (carbohidratos, lípidos, etc.).<sup>200, 201</sup> Desde la aparición de los primeros trabajos con bibliotecas de péptidos aleatorios, el uso de ellas se ha explotado exponencialmente, particularmente para hacer mapeado de epítomos o para aislar mimótopos de proteínas o carbohidratos, lineales o conformacionales, que puedan ser usados como inmunógenos que induzcan una respuesta *in vivo* similar o idéntica a la inducida por el epítomo original.<sup>202</sup>

## 11.2 Apéndice II: Despliegue en fagos (PhD).

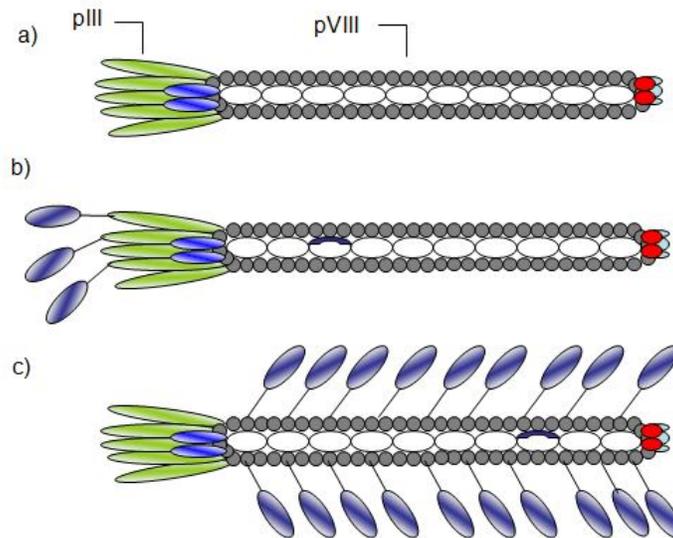
La tecnología de despliegue en fagos fue descrita por vez primera por George P. Smith en 1985, en la cual empleó fagos filamentosos de *Escherichia coli* (M13, fd y f1) como vehículos para expresar diversas proteínas o secuencias peptídicas como parte de las proteínas de su cubierta. Esta tecnología 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.<sup>203</sup>

### 11.2.1 Fagos filamentosos

Los 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 el cuerpo del fago (figura 28).<sup>204</sup>

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.<sup>205</sup>



**Figura 28.** Representación esquemática de a) el fago silvestre, b) un péptido desplegado en pIII, y c) un péptido desplegado en pVIII. Tomada de <sup>206</sup>

### 11.2.2 Proteína III

Está constituida de 406 residuos de aminoácidos, 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, haciéndolo más accesible para interactuar con el receptor de interés.<sup>132</sup>

### **11.2.3 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. 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 infectividad.<sup>132</sup>

El despliegue en fagos se puede utilizar para:

- Seleccionar proteínas, péptidos o anticuerpos monoclonales con afinidad a un blanco de interés.
- Preservar a bajo costo anticuerpos producidos por líneas celulares de hibridomas que crecen de forma inestable.
- Identificar epítomos, mimótopos, accesibilidad de sitios funcionales de los antígenos.

- Identificar modificaciones postraduccionales.
- Diseño de vacunas y en diagnóstico.

La técnica puede facilitar la identificación de estructuras peptídicas con aplicaciones potenciales en la prevención de enfermedades, por ejemplo mediante el aislamiento de bibliotecas de péptidos, tanto con anticuerpos dirigidos contra antígenos de patógenos, como con sueros de interés. También los fagos filamentosos pueden ser empleados como inmunógenos, cuando sean portadores de péptidos derivados de proteínas de patógenos como *Plasmodium falciparum*.<sup>207</sup>

### 11.3 Apéndice III: Preparación de soluciones, medios y geles.

#### 11.3.1 Soluciones

##### PBS

Para un litro:

NaCl	8 g.
KCl	0.2 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	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 µL
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 MI

## **Amortiguador para transferencia de proteínas.**

Para un litro:

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

### 11.3.2 Medios

#### 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 <sub>2</sub> 1 M	0.1 mL

### 11.3.3 Geles

#### 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 H<sub>2</sub>O, 200 µL de SDS 10%, 66 µL de persulfato de amonio 10%, 6.6 µL de Temed y cargar en los vidrios. Adicionar H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O, 60 µL de SDS 10%, 20 µL de persulfato de amonio 10%.

#### 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 µL de bromuro de etidio, mezclar bien y verter en los moldes. Dejar solidificando a 4 °C.

## 11.4 Apéndice IV: Técnicas

### 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 TA 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 y la curva patrón es una dilución seriada de BSA iniciando con una concentración de 1000 µg/mL.

## 12. Bibliografía

---

- 1 Flisser A, Madrazo I, Delgado H. Cisticercosis Humana. Manual Moderno, México, D.F. 1997, pp. 5-64.
- 2 Alarcón G (ed), et al. Cisticercosis del Sistema Nervioso, Instituto Ecuatoriano de Salud Pública y Universidad de Guayaquil, 1999, pp 21-26.
- 3 Schantz PM, Moore AC, Munoz JL, et al. Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City, N. England J. Md.1992; 327:672-675.
- 4 Wallin MT, Kurtzke JF. Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. Neurology 2004; 63(9):1559- 1564.
- 5 Gimenez-Roldan S, Diaz F, Esquivel A. Neurocysticercosis and immigration. Neurologia 2003; 18(7):385-388.
- 6 Shandera WX, White AC Jr, Chen JC, et al. Neurocysticercosis in Houston, Texas: a report of 112 cases. Medicine (Baltimore) 1994; 73:37-52.
- 7 White AC Jr. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. Annu Rev Med 2000; 51:187-206.
- 8 Molinari JL, Tato P. Teniasis y cisticercosis. En: Becerril Flores M, Romero Cabello R., Parasitología Médica: de las moléculas a la enfermedad., 3a. ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México, 2011, pp.161-168. ISBN 970-10-4519-X, 2004.
- 9 Schantz PM, Cruz M, Sarti E, et al. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. Bull Pan Am Health Organ.1993;27(4):397-403.
- 10 Roberts L, Janovy J. Foundations of Parasitology, McGraw Hill, Boston, 2000. pp 299-323.
- 11 Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, et al. . *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 2000;2:1875-1890.
- 12 Webbe G (). Human Cysticercosis: Parasitology, Pathology, clinical manifestations and available treatment. Pharm. Ther 1994;64:175-200.
- 13 Salazar-Schettino MP, de Haro-Arteaga I. Biología del binomio teniasis-cisticercosis. Bol Chil Parasitol. 1990;45(3-4):73-6.
- 14 Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. Morfological types of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol. Today 1989; 5 (11): 357-359.
- 15 Grau E, Garrido F, Cañedo L. Calcification of the cysticerci of *Taenia solium* in the human brain. En: A Flisser, K Willms, JP Lacleste, et al. (eds.). Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York, 1982, pp. 499-516.
- 16 Rabiela-Cervantes MT. 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. 1989, pp. 107-124.
- 17 Lacleste JP, Ornelas Y, Merchant MT, et al. Ultraestructure of the surroundings envelopes of *Taenia solium* eggs. En: A Flisser, K Willms, JP Lacleste, et al. (eds.). Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York,1982, pp. 375-388.

- 
- 18** Gemmell, M.A., Lawson, R., Host immunity and regulation of the parasite population. En: Flisser, A., Willms, K., Lactette, J.P., et al. (Eds.), *Cysticercosis, Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, New York, 1982, pp. 647- 660.
- 19** Palmer PES, Reeder MM., *The Imaging of Tropical Diseases: With Epidemiological, Pathological and Clinical Correlation Volume 1*, Springer-Verlag; 2nd edition, Heidelberg (2001) pp. 644.
- 20** Valverde-Islas LE, Arrangoiz E, Vega E, et al. Visualization and 3D reconstruction of flame cells of *Taenia solium* (cestoda). *PLoS One*. 2011;6(3):e14754.
- 21** Beaver P. C., et al. *Parasitología Clínica de Craig Faust*, 3a ed., Editorial Masson Doyma, México 2003.
- 22** Willms K. et al., *I. Biología del Parásito en: Carlos Larralde, Aline S. de Aluja, Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud; Ed. Biblioteca de la Salud; Fondo de Cultura Económica, México, 2006.*
- 23** Reuter M, Mantyla K, Gustafsson MK. Organization of the Orthogon- main and mainor nerve cords. *Hydrobiologia* 1998; 383: 175-182.
- 24** Gustafsson MK, Halton DW, Kreshchenko ND, et al. Neuropeptides in flatworms. *Peptides* 2002; 23: 2053-2061.
- 25** Willms K, Robert L, Caro JA. Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. *Parasitol Res* 2003; 89: 308-316.
- 26** Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sanchez H, et al. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biology International* 2003; 27: 727–733
- 27** Pawlowski, Z. Basic biology and transmission. En: G Singh, ed. *Taenia Solium* cysticercosis: from basic to clinical science. CABI Publishing. Chandigarh, India, 2002, pp. 1-15
- 28** Rodríguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A., et al. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology*. 1998;117 ( Pt 6):579-88.
- 29** Read CP. Carbohydrate metabolism of *Hymenolepis diminuta*. *Exp Parasitol*. 1956;5(4):325-44.
- 30** Bush AO, Fernandez JC, Esch GW, et al. *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge 2001, pp 2-12
- 31** Smyth JD, McManus DP. *Physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press, Cambridge 1989, pp
- 32** Fraga CM, Costa TL, Bezerra JC, et al. *Taenia crassiceps*: host treatment alters glycolysis and tricarboxylic acid cycle in cysticerci. *Exp Parasitol*. 2012;130(2):146-51.
- 33** Fraga CM, Costa TL, Bezerra JC, et al. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. *Exp Parasitol*. 2012;131(1):111-5.

- 
- 34** Flisser A, Plancarte A, Correa D. *Taenia solium* cysticercosis: a review. Research and Reviews in Parasitology 1991; 51 (1-4): 17-23.
- 35** López-Cepeda L, Proaño J, Ambrosio J, et al.. Estudio de individuos con teniosis y su relación con enfermos con neurocisticercosis. Rev Fac Med UNAM Vol.44 No.4 Julio-Agosto, 2001
- 36** Rabiela MT, Hornelas Y, Garcia-Allan C, et al. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. Arch Med Res. 2000; 31(6):605-607.
- 37** Merchant MT, Aguilar L, Avila G, et al. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. J Parasitol. 1998; 84(4):681-685.
- 38** Fan PC, Ma YX, Kuo CH, et al. Survival of *Taenia solium* cysticerci in carcasses of pigs kept at 4 C. J Parasitol. 1998; 84(1):174-175.
- 39** García H, Gonzalez A, Evans C, Gilman R. Cysticercosis. The Lancet 2003; 361: 547-556.
- 40** Tay-Zavala J (ed). Microbiología y Parasitología Médicas. Méndez Editores. México 2003. 541-542.
- 41** Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, et al. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. Arch Inter Med. 1990; 150: 325-327.
- 42** Cárdenas F, Quiroz H, Meza A. Cisticercosis intraocular. En: A Flisser, F Malagón (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, Mexico, D.F. 1989, pp. 107-124.
- 43** Cárdenas F, Plancarte A, Quiroz H, et al. *Taenia crassiceps*: experimental model of intraocular cisticercosis. Experimental Parasitology 1989; 69: 324-329.
- 44** Correa D, Dalma D, Espinoza B, et al. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. J Parasitol. 1985; 71(5):535-541.
- 45** Kalinna B, McManus DP. An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. Parasitology. 1993;106 ( Pt 3):289-96.
- 46** White AC Jr, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. J Parasitol. 1992;78(2):281-287.
- 47** Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, et al. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). Mol Biochem Parasitol. 1993;60(2):343-347.
- 48** Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L. Parasite defense mechanism for evasion of host attack: a review. Vet. Parasitol. 1987; 25: 147-162.
- 49** Leid RW, Grant RF, Suquet CM. Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. Int J Parasitol. 1987;17(7):1349-1353.
- 50** White AC Jr, Robinson P, Kuhn R. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. Chem Immunol. 1997;66:209-230.
- 51** Tato P, Castro AM, Rodríguez D, et al. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. Parasitol Res. 1995; 81(3):181-187.

- 
- 52** Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P . A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol. Res.* 1998; 84: 117-122.
- 53** Molinari JL, Mejia H, White AC Jr., *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol.* 2000; 94(3):133-142.
- 54** Tato P, Fernandez AM, Solano S, et al. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res.* 2004;92(3):197-204.
- 55** García-Castellanos A, Jiménez L, Landa A. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int J. Parasitol.* 2002;32: 1175-1182.
- 56** Vibanco-Pérez N, Jiménez L, Merchant MT, et al. Characterization of a glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 1999; 85(3): 448-453.
- 57** Vibanco-Pérez N, Jiménez L, Mendoza-Hernández G, et al. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* 2002; 88: 389-404.
- 58** Plancarte A, Rendón JL, Landa A. Purificación, caracterización and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol. Res.* 2002;93: 137-144.
- 59** Allan JC, Avila G, Garcia Noval J, et al. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 1990;101(3):473-477.
- 60** Allan JC, Mencos F, Garcia-Noval J. Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. *Parasitology.* 1993;107 ( Pt 1):79-85.
- 61** Guezala MC, Rodriguez S, Zamora H, et al. Development of a species-specific coproantigen ELISA for human *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(3):433-7.
- 62** Gonzalez LM, Montero E, Harrison LJ, et al. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38: 737-744.
- 63** Mayta H, Gilman RH, Prendergast E, Castillo JP, et al. Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):286-9.
- 64** Min Z, et al. Characterization, cloning, and expresión of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. *J. Parasitol.* 2004;90(3): 631-638.
- 65** Wilkins PP, Allan JC, Verastegui M. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(2):199-204.
- 66** Ochoa-Sánchez A, Jiménez L, Landa A. The hamster model for identification of specific antigens of *Taenia solium* tapeworms. *J Biomed Biotechnol.* 2011:504959.
- 67** Levine MZ, Lewis MM, Rodriguez S, Jimenez JA. Development of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay using two baculovirus expressed recombinant antigens for diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J Parasitol.* 2007;93(2):409-17.
- 68** Espinoza B, et al. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24: 536-541.

- 
- 69** Olivo A, Plancarte A, Flisser A. Presence de antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminths. Int. J. Parasitol. 1988; 18: 543-545.
- 70** Tsang V, Brand AJ, Boyer AE. An enzyme immuno-electrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human *Taenia solium* cysticercosis. J. Infect. Dis. 1989; 159: 50-59.
- 71** Ryan M, et al. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18- kDa related, diagnostic antigens. J. Parasitol. 2000; 86(5): 1001-1007.
- 72** Lee YM, Handali S, Hancock K, et al. Serologic diagnosis of human *Taenia solium* cysticercosis by using recombinant and synthetic antigens in QuickELISA™. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(4):587-93.
- 73** Hell RC, Amim P, de Andrade HM. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. Clin Immunol. 2009;131(1):129-38
- 74** Harrison L, Delgado J, Parkhouse RM. DNA probes in the differentiation of human taenia saginata and *Taenia solium* infection. Roy. Soc. Trop. Med. And Hyg. 1988; 82: 939.
- 75** Horton J. Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. Parasitology. 2000;121 Suppl:S113-32.
- 76** Fleury A. et al. Cisticercosis en el ser humano, pp. 41-85. En: Larralde C., Schunemann de Aluja A.(eds.), Cisticercosis: Guía para profesionales de la salud. Fondo Cultura Economica. México, 2006, ISBN 968-16-8138-X.
- 77** Sarti E, Schantz PM, Avila G. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(1):85-89.
- 78** Sarti E, Flisser A, Schantz PM, et al. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 1997;56(2):127-32.
- 79** Sarti E, Rajshekhar V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. Acta Tropica 2003; 87: 137-143.
- 80** Lightowers MW. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. Int J Parasitol. 1999;29(6):811-7.
- 81** Flisser A, Lightowers MW. Vaccination against *Taenia solium* Cysticercosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001;96(3): 353-356.
- 82** Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, et al. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. Int J Parasitol. 1999;29(4):643-7.
- 83** Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. Vet Parasitol. 2002;108(1):49-62.
- 84** Molinari JL, Rodriguez D, Tato P. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. Vet Parasitol. 1997; 69(1-2):55-63.
- 85** Molinari JL, Soto R, Tato P, et al. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. Am J Trop Med Hyg. 1993;49(4):502-512.

- 
- 86** Kumar D, Gaur S, Pathak M. Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and second peaks of *cysticercus cellulosae* scolex antigen. *Indian J Anim Sci* 1987;57: 932-935.
- 87** Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, et al. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;45(1-2):127-37.
- 88** Pathak K, Gaur S. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol.* 1990;34: 353-356.
- 89** Toledo A, Larralde C, Fragoso G, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 1999;67(5):2522-30.
- 90** Flisser A, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun.* 2004;72(9):5292-7.
- 91** Gauci CG, Jayashi CM, Gonzalez AE, et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis by immunization with novel recombinant antigens. *Vaccine.* 2012 ;30(26):3824-8.
- 92** Morales J, Martínez JJ, Manoutcharian K, et al. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine.* 2008 ;26(23):2899-905.
- 93** Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol.* 1996; 82(2):250-4.
- 94** 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.
- 95** Huerta M, et al. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine.* 2001;20(1-2):262-266.
- 96** Capelli-Peixoto J, Chávez-Olórtegui C, Chaves-Moreira D, et al. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis. *Vaccine.* 2011 ;29(51):9473-9.
- 97** Guo YJ, et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* 2004;22(29-30):3841-3847.
- 98** Wang QM, Sun SH, Hu ZL, et al.. Immune response and protection elicited by DNA immunisation against *Taenia* cysticercosis. *Vaccine* 2003;21(15):1672-1680.
- 99** Teijón Rivera JM, et al. Fundamentos de Bioquímica metabólica, 2da ed., Editorial Tébar, Madrid 2006, pp 21-31
- 100** Voet D, Voet J. Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona, 1990. pp. 458-476.
- 101** Stryer L. Bioquímica. 4ta ed. Editorial Reverté. España, 1995. pp. 487-488.
- 102** Kallenbach N. Breaking open a protein barrel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001;.98(6):2958-2960.

- 
- 103** Sali, S. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993; 234:779-815.
- 104** Derreumaux P, Schlick T. The loop opening/closing motion of the enzyme Triosephosphate Isomerase. *Biophysical J.* 1998; 74: 72-81.
- 105** Pompliano DL, Peyman A, Knowles JR. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* 1990;29(13):3186-94.
- 106** Knowles JR. To build an enzyme. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991;332(1263):115-21.
- 107** Kursula I, Salin M, Sun J, et al. Understanding protein lids: structural analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Protein Eng Des Sel.* 2004;17(4):375-82.
- 108** Wang Y, Berlow RB, Loria JP. Role of loop-loop interactions in coordinating motions and enzymatic function in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* 2009;48(21):4548-56.
- 109** Kishan KV, Zeelen JP, Noble ME, et al. Comparison of the structures and the crystal contacts of trypanosomal triosephosphate isomerase in four different crystal forms. *Protein Sci.* 1994;3(5):779-87.
- 110** Borchert TV, Abagyan R, Kishan KV, et al. The crystal structure of an engineered monomeric triosephosphate isomerase, monoTIM: the correct modelling of an eight-residue loop. *Structure.* 1993;1(3):205-13.
- 111** Schliebs W, Thanki N, Eritja R, et al. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* 1996;5(2):229-39.
- 112** Jiménez, L., Sanabria, V., Landa, A., 2007. Taenia solium: Recent advances in the knowledge of glycolysis enzymes, in: Terrazas, L.I. (Ed.), *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*, Research Signpost, Trivandrum, pp. 153-163.
- 113** Li Y, Cohenford MA, Dutta U, et al. In vitro nonenzymatic glycation of guanosine 5' triphosphate by dihydroxyacetone phosphate. *Anal Bioanal Chem* 2008; 392:1189–1196.
- 114** Li Y, Dutta U, Cohenford MA, et al. Nonenzymatic glycation of guanosine 5'-triphosphate by glyceraldehyde: an in vitro study of AGE formation. *Bioorg Chem.* 2007;35(6):417-29.
- 115** Orosz F, Oláh J, Ovádi J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(12):1168-74.
- 116** Orosz F, Oláh J, Ovádi J. Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life.* 2006;58(12):703-15.
- 117** Guix FX, Ill-Raga G, Bravo R, et al. Amyloid-dependent triosephosphate isomerase nitrotyrosination induces glycation and tau fibrillation. *Brain.* 2009;132(Pt 5):1335-45.
- 118** Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(8):1381-8.

- 
- 119** Furuya H, Ikeda R. Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. *Microbiol Immunol.* 2011;55(12):855-62.
- 120** Auer J, Camoin L, Courtot AM, et al. Evidence that P36, a human sperm acrosomal antigen involved in the fertilization process is triosephosphate isomerase. *Mol Reprod Dev.* 2004;68(4):515-23.
- 121** Opperdoes F. et. al. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 482-490
- 122** Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, et al. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2008;17(10):1533-45.
- 123** Kuntz, D, et. al. Inhibition of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with cyclic hexapeptides. *Eur. J. Biochem.* 1992; 07:441-447.
- 124** Singh, S. et. al. Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Letters* 2001;501:19–23.
- 125** Rodríguez-Romero A, et. al. (2002). Structure and Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.*; 322: 669–675
- 126** 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)
- 127** Tellez-Valencia A, et al. Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* 2004; 341, 1355–1365.
- 128** Shoemaker C. et. al. cDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen triose-phosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 1842-1846.
- 129** Harn D. et. al. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 1992; 148: 5562-5567.
- 130** Jiménez L, Vibanco-Pérez N, Navarro L, et al. Cloning, expresión and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30: 1007-1012.
- 131** Jiménez, L., et al. A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *J Parasitol.*, 2003, 89, 209 - 214.
- 132** Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975, *J Immunol.* 2005;174(5):2453-5.
- 133** de StGroth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics, *J Immunol Methods.*;35(1-2):1-21.
- 134** Milstein C. From the structure of antibodies to the diversification of the immune response. *EMBO J.* 1985; 4(5):1083-92.
- 135** Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol*, 1981;73(Pt B):3-46.

- 
- 136** Anderson PN, Potter M. Induction of plasma cell tumours in BALB-c mice with 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane). *Nature* 1969;222(5197):994-5.
- 137** Kuhlmann II, Kurth W, Ruhdel II. Monoclonal antibodies: in vivo- and in vitro-production in laboratory scale with consideration of the legal aspects of animal protection. *Altex* 1989;6(2):12-26.
- 138** Pathak Y, Benita S. *Antibody-Mediated Drug Delivery Systems: Concepts, Technology, and Applications*. John Wiley and Sons, inc. 2012.
- 139** Reichert J, Pavolu A. Monoclonal antibodies market. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(5):383-4.
- 140** Fukui Y, Fukui K, Moriyama T. Inhibition of enzymes by human salivary immunoglobulin A. *Infect Immun*. 1973;8(3):335-40.
- 141** Nagata K, Mizuta T, Tonokatu Y, et al. Monoclonal antibodies against the native urease of *Helicobacter pylori*: synergistic inhibition of urease activity by monoclonal antibody combinations. *Infect Immun*. 1992;60(11):4826-31.
- 142** Srivastava IK, Schmidt M, Certa U, Döbeli H, et al. Specificity and inhibitory activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* aldolase. *J Immunol*. 1990;144(4):1497-503.
- 143** Coe Clough NE, Hauer PJ. Using polyclonal and monoclonal antibodies in regulatory testing of biological products. *ILAR J*. 2005;46(3):300-6.
- 144** Baker DG, Bryant JD, Urban JF Jr, et al. Swine immunity to selected parasites. *Vet Immunol Immunopathol*. 1994;43(1-3):127-33.
- 145** Fan PC, Chung WC, Lin CY, et al. Vaccination trials against *Taenia solium* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of *T. solium* or *Taenia saginata asiatica*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36(2):96-100.
- 146** Rojas G, Tato P, Solano S, et al. Immune humoral response in pigs infected with eggs and posoncospheres of *Taenia solium*. *Bol Chil Parasitol*. 1999; 54(3-4):57-62.
- 147** Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A, et al. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Vet Parasitol*. 2002;108(1):49-62.
- 148** Fukui Y, Fukui K, Moriyama T. Inhibition of enzymes by human salivary immunoglobulin A. *Infect Immun*. 1973;8(3):335-40.
- 149** Nagata K, Mizuta T, Tonokatu Y, Fukuda Y, Okamura H, Hayashi T, Shimoyama T, Tamura T. Monoclonal antibodies against the native urease of *Helicobacter pylori*: synergistic inhibition of urease activity by monoclonal antibody combinations. *Infect Immun*. 1992;60(11):4826-31.
- 150** Srivastava IK, Schmidt M, Certa U, Döbeli H, Perrin LH. Specificity and inhibitory activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* aldolase. *J Immunol*. 1990;144(4):1497-503.
- 151** Twyman R. M. *Advanced Molecular Biology*. BIOS Scientific Pub. New York 1998, pp 330.
- 152** Schuler G, Reinacher M. Development and optimization of a single-step procedure using protein A affinity chromatography to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from hybridoma supernatants. *J Chromatogr*. 1991;587(1):61-70.

---

**153** Aybay C. Differential binding characteristics of protein G and protein A for Fc fragments of papain-digested mouse IgG. *Immunol Lett.* 2003;85(3):231-5.

**154** Cortés-Figueroa AA, Pérez-Torres A, Salaiza N, Cabrera N, Escalona-Montaña A, Rondán A, Aguirre-García M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R, Becker I. A monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth in vitro and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Parasitol Res.* 2008;102(4):635-43.

**155** Ritter K, Kuhlencord A, Thomssen R, Bommer W. Prolonged haemolytic anaemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. *Lancet.* 1993;342(8883):1333-4.

**156** Kolln J, Ren HM, Da RR, Zhang Y, Spillner E, Olek M, Hermanowicz N, Hilgenberg LG, Smith MA, van den Noort S, Qin Y. Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Immunol.* 2006;177(8):5652-8.

**157** Xiang Y, Sekine T, Nakamura H, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Nishioka K, Kato T. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1511-21.

**158** Sasajima T, Watanabe H, Sato S, Sato Y, Ohira H. Anti-triosephosphate isomerase antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric lupus. *J Neuroimmunol.* 2006;181(1-2):150-6.

**159** Shukla S, Govekar RB, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, D'Cruz AK, Pathak KA, Kane SV, Zingde SM. Tumor antigens eliciting autoantibody response in cancer of gingivo-buccal complex. *Proteomics Clin Appl.* 2007;1(12):1592-604.

**160** Zhang XZ, Xiao ZF, Li C, Xiao ZQ, Yang F, Li DJ, Li MY, Li F, Chen ZC. Triosephosphate isomerase and peroxiredoxin 6, two novel serum markers for human lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2009;100(12):2396-401.

**161** Tamesa MS, Kuramitsu Y, Fujimoto M, Maeda N, Nagashima Y, Tanaka T, Yamamoto S, Oka M, Nakamura K. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis.* 2009;30(12):2168-81.

**162** Thouvenin E, Schoehn G, Rey F, Petitpas I, Mathieu M, Vaney MC, Cohen J, Kohli E, Pothier P, Hewat E. Antibody inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP: a structural view. *J Mol Biol.* 2001;307(1):161-72.

**163** Lescar J, Brynda J, Rezacova P, Stouracova R, Riottot MM, Chitarra V, Fabry M, Horejsi M, Sedlacek J, Bentley GA. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by a monoclonal antibody. *Protein Sci.* 1999;8(12):2686-96.

**164** Buschiazzi A, Muiá R, Larrieux N, Pitcovsky T, Mucci J, Campetella O. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002474.

**165** de Gasparo MM, Wood JM, Heusser CH. Mechanism of inhibition of human renin by monoclonal antibodies. *Hypertension.* 1988;11(3):209-16.

**166** Pompliano DL, Peyman A, Knowles JR. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry.* 1990;29(13):3186-94.

- 
- 167** Wang Y, Berlow RB, Loria JP. Role of loop-loop interactions in coordinating motions and enzymatic function in triosephosphate isomerase. *Biochemistry*. 2009;48(21):4548-56.
- 168** Schliebs W, Thanki N, Jaenicke R, Wierenga RK. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry*. 1997;36(32):9655-62.
- 169** Reynolds SR, Dahl CE, Harn DA. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J Immunol*. 1994;152(1):193-200.
- 170** Cunha-Júnior, J.P., Silva, D.A., Silva, N.M., et al. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. *Immunobiology*. 2010;215, 26-37.
- 171** Li, Y., Ning, Y., Wang, Y., et al. Mimotopes selected with a neutralizing antibody against urease B from *Helicobacter pylori* induce enzyme inhibitory antibodies in mice upon vaccination. *BMC Biotechnol*. 2010;10:84.
- 172** Houmard J, Drapeau GR. Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972;69(12):3506-9.
- 173** Fontana A, de Laureto PP, Spolaore B, et al. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(2):299-321.
- 174** Rowley MJ, Scealy M, Whisstock JC, et al. Prediction of the immunodominant epitope of the pyruvate dehydrogenase complex E2 in primary biliary cirrhosis using phage display. *J Immunol*. 2000;164(6):3413-9.
- 175** Chargelegue D, Obeid OE, Hsu SC, et al. A peptide mimic of a protective epitope of respiratory syncytial virus selected from a combinatorial library induces virus-neutralizing antibodies and reduces viral load in vivo. *J Virol*. 1998;72(3):2040-6.
- 176** Puntoriero G, Meola A, Lahm A, et al. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *EMBO J*. 1998;17(13):3521-33.
- 177** Willers J, Lucchese A, Kanduc D, et al. Molecular mimicry of phage displayed peptides mimicking GD3 ganglioside. *Peptides*. 1999;20(9):1021-6.
- 178** Willis AE, Perham RN, Wraith D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene*. 1993;128(1):79-83.
- 179** Galfrè G, Monaci P, Nicosia A, et al. Immunization with phage displayed mimotopes. *Methods Enzymol* 1996;267:109-15.
- 180** Rao KV, He YX, Kalyanasundaram R. Expression of a 28-kilodalton glutathione S-transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 ;10(4):536-41.

- 
- 181** Yang WJ, Lai JF, Peng KC, Chiang HJ, Weng CN, Shiuan D. Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *J Immunol Methods*. 2005;304(1-2):15-29.
- 182** Zhu ZY, Zhong CP, Xu WF, et al. PSMA mimotope isolated from phage displayed peptide library can induce PSMA specific immune response. *Cell Res*. 1999;9(4):271-80.
- 183** Meola A, Delmastro P, Monaci P, et al. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol*. 1995;154(7):3162-72.
- 184** Demangel C, Rouyre S, Alzari PM, et al. Phage-displayed mimotopes elicit monoclonal antibodies specific for a malaria vaccine candidate. *Biol Chem*. 1998; 379(1):65-70.
- 185** Davies JM, Rowley MJ, MacKay IR. Phagotopes derived by antibody screening of phage-displayed random peptide libraries vary in immunoreactivity: studies using an exemplary monoclonal antibody, CII-C1, to type II collagen. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(6):483-90.
- 186** Edelman G, et al. The covalent structure of an entire  $\gamma$ -globulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1969, 63: 78–85.
- 187** Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- 188** Roitt, I. *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, London, 7<sup>a</sup> ed., 1991.
- 189** Silverton EW, Navia MA, Davies DR. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(11):5140-4.
- 190** Jefferis R, Lund J, Pound JD. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation, *Immunol Rev.*, 1998;163:59-76.
- 191** Raju TS, Scallon B. Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(3):797-803.
- 192** Novotny J, Bruccoleri R, Newell J, et al. Molecular anatomy of the antibody binding site. *J Biol Chem*. 1983; 10;258(23):14433-7.
- 193** Novotny J, Haber E. Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimmers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(14):4592-6.
- 194** Chothia C, Gelfand I, Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol*. 1998; 1;278(2):457-79.
- 195** Schier R, Balint RF, McCall A, et al. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene* 1996;169(2):147-55.
- 196** Marks JD. Antibody affinity maturation by chain shuffling. *Methods Mol Biol*. 2004;248:327-43.
- 197** Figini M, Marks JD, Winter G, et al. In vitro assembly of repertoires of antibody chains on the surface of phage by renaturation. *J Mol Biol*. 1994;239(1):68-78.
- 198** Garrard LJ, Yang M, O'Connell MP, et al Fab assembly and enrichment in a monovalent phage display system. *Biotechnology* 1991;9(12):1373-7.

- 
- 199** Schier R, Marks JD. Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections. *Hum Antibodies Hybridomas* 1996;7(3):97-105.
- 200** Geysen HM, Barteling SJ, Meloen RH. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(1):178-82.
- 201** Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. *Ciba Found Symp.* 1986;119:130-49.
- 202** Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Targets.* 2004;5(1):1-15.
- 203** Smith G. P, Petrenko V. Phage Display. *Chem. Rev.* 1997; 97: 391-410
- 204** Stricker N, Li M. Phage Display Technologies. *Encyclopedia of Life Sciences/ Nature Publishing Group*, 2001, pp 1-5.
- 205** Azzazy H. M, Highsmith E. Phage display technology: Clinical applications and recent innovations. *Clin. Biochem* 2002; 35:425-445.
- 206** Sanabria Ayala Víctor, Landa Piedra Abraham. Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas, Médicas UIS, Colombia, 2007; 20(1): 15-30
- 207** de la Cruz VF, Lal AA, McCutchan TF. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem.* 1988;263(9):4318-22.

---

**Publicación generada con el trabajo de Tesis**

**Sanabria-Ayala V.**, Medina-Flores Y., Zavala-Carballo A., Jimenez L., Landa A. Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*. Exp Parasitol. 2013 Aug;134(4):495-503.

**En proceso**

**Sanabria-Ayala V**, Landa A. Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPI): Phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

## Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*



Sanabria-Ayala Víctor<sup>a</sup>, Medina-Flores Yolanda<sup>b</sup>, Zavala-Carballo Araceli<sup>b</sup>, Jiménez Lucía<sup>a</sup>, Landa Abraham<sup>a,\*</sup>

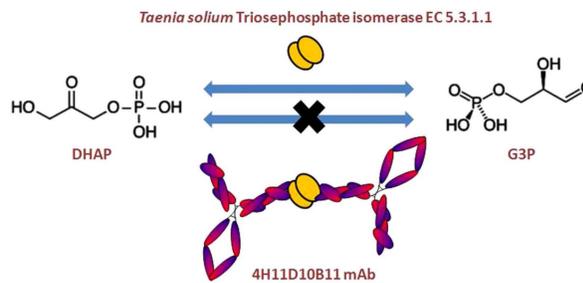
<sup>a</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio A, 2<sup>o</sup> Piso, Ciudad Universitaria, México DF 04510, México

<sup>b</sup>Departamento de Investigaciones Inmunológicas, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), Secretaría de Salud, Carpio 470, Santo Tomás, México DF 11340, México

### HIGHLIGHTS

- Monoclonal antibody production to triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TPI).
- Monoclonal antibody inhibits catalytic activity of TPI.
- Antigen-binding fragments (Fabs) from monoclonal antibody retain inhibitory ability.
- Inhibition by monoclonal antibody follows the classical non-competitive pattern.
- Epitope recognized by antibody was located using the peptides from a M13 phage display library.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 3 September 2012

Received in revised form 20 April 2013

Accepted 9 May 2013

Available online 21 May 2013

#### Keywords:

*Taenia solium*  
Triosephosphate isomerase  
Monoclonal antibody  
Epitope  
Mimotope  
Phage display

### ABSTRACT

In the present study, we obtained and characterized partially a monoclonal antibody (4H11D10B11 mAb) against triosephosphate isomerase from *Taenia solium* (TPI). This antibody recognized the enzyme by both ELISA and western blot and was able to inhibit its enzymatic activity in 74%. Moreover, the antigen-binding fragments (Fabs), products of digestion of the monoclonal antibody with papain, retained almost the same inhibitory effect. We determined the binding site by ELISA; synthetic peptides containing sequences from different non-conserved regions of the TPI were confronted to the 4H11D10B11 mAb. The epitope recognized by the monoclonal antibody was located on peptide TPI-56 (ATPAQAQEVHKVVRDWIRKHXVDAGIADKARI), and an analysis of mimotopes, obtained with the 4H11D10B11 mAb, suggests that the epitope spans the sequence WIRKHXVDAGIAD, residues 193–204 of the enzyme. This epitope is located within helix 6, next to loop 6, an essential active loop during catalysis. The antibody did not recognize triosephosphate isomerase from man and pig, definitive and intermediary hosts of *T. solium*, respectively. Furthermore, it did not bind to the catalytic site, since kinetic analysis demonstrated that inhibition had a non-competitive profile.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Triosephosphate isomerase (TPI, EC 5.3.1.1) is a ubiquitous enzyme found in a wide range of organisms. It belongs to a structural

family of enzymes that contain a highly conserved barrel structure, even though the primary structure and function of some proteins are different (Wierenga, 2001). This structure is constituted by a repeat of eight  $\alpha$ -helices and eight  $\beta$ -strands joined by loops.  $\beta$ -strands are parallel on the inside of the enzyme, forming an internal core named  $\beta$ -barrel surrounded by the  $\alpha$ -helices forming a barrel ( $\alpha\beta$ )<sub>8</sub>, which is essential for functionality and stability of the enzyme (Stroppolo

\* Corresponding author. Fax: +52 (55) 56232382.  
E-mail address: [landap@unam.mx](mailto:landap@unam.mx) (L. Abraham).

et al., 2001). It is considered an enzyme that has evolved to a state of catalytic perfection, because its catalysis is so fast and limited only by diffusion (Knowles, 1991). TPI has two identical subunits or monomers of around 27 kDa, each monomer contains a functional active site located near the subunit interface, but which does not interact directly with the other monomer. The contact in the interface is formed mainly by loop 3. Some residues of this loop interact through Van der Waals forces with the active site residues from the adjacent monomer, in this manner a reciprocal stability is obtained. Therefore, TPI is fully active only in its dimeric form (Schliebs et al., 1996). TPI catalyzes the fifth reaction of glycolysis, this is the reversible interconversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and D-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP), without the use of metal ions or cofactors. TPI is essential for life and its biological importance consists in that it avoids the accumulation of DHAP, a highly toxic metabolite. The latter leads to an accumulation of methylglyoxal, which enhances the production of AGEs (advanced glycation end products) that trigger oxidative stress, DNA damage, and apoptosis, which are involved in the susceptibility to infections, progression of degenerative diseases, and death in early childhood (Orosz et al., 2006, 2009; Li et al., 2007, 2008).

Nowadays, there are still many diseases caused by parasites without an effective treatment, hence it is imperative to find new drugs and new targets. Given its aforementioned characteristics, TPI has been proposed as a promising target for this purpose. There are several studies that have examined the possibilities to inactivate specifically TPI from pathogens, and even efforts to develop a treatment for cancer have been made (Scatena et al., 2008). Among protozoan parasites, TPIs from *Trypanosoma sp.* (Olivares-Illana et al., 2006), *Plasmodium sp.* (Singh et al., 2001), *Entamoeba sp.* (Rodríguez-Romero et al., 2002), and *Giardia sp.* (Enriquez-Flores et al., 2008) have been studied to find an effective inhibitor for them. In plathyhelminthes, TPI has been studied in two trematodes: *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. A monoclonal antibody, named M.1, against the enzyme decreases the activity *in vitro*, and, *in vivo*, it confers partial resistance (41–49%) to schistosomiasis in mice by passive immunization (Harn et al., 1992). Vaccination assays using TPI and TPI DNA constructions conferred higher levels of protection in mice and pigs against *S. mansoni* and *S. japonicum*, respectively (Ferru et al., 1997; Zhu et al., 2006). Likewise, the use of synthetic regions of *S. mansoni* TPI (MAP4, multiple antigen peptide containing B- and T-cell epitopes) as a potential vaccine candidate has been explored (Reis et al., 2008). Our group characterized a recombinant TPI of *Taenia solium* (TTPI) (Jiménez et al., 2000) and mice vaccinated with it were protected against the challenge with the larval stage of *Taenia crassiceps*, reducing 52% parasite burden (Jiménez et al., 2003). In the same study, anti-TTPI polyclonal antibodies were able to inhibit partially TPI activity *in vitro*. These findings have led us to search for antibodies against specific regions able to inhibit the enzyme in a specific manner.

Phage display technology has been successful to find vaccine candidates against helminth parasites like *T. crassiceps*, *S. japonicum* and *T. solium* (Manoutcharian et al., 1999; Wu et al., 2006 and Guo et al., 2010).

In the present work, we describe the obtainment and partial characterization of a monoclonal antibody able to inhibit TPI activity considerably.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Purification of TTPI

Recombinant triosephosphate isomerase was purified as described previously (Jiménez et al., 2000). Briefly, plasmid pRSET

containing the coding region from TTPI cDNA was expressed on TG1 bacteria, yield was 15 mg/L culture. As it has a six histidine tag, it was purified by metal affinity chromatography.

### 2.2. Production of monoclonal antibodies

Balb/c mice were immunized intraperitoneally with 50 µg of purified TTPI. Immunizations were repeated two more times with equivalent doses at 10 day intervals. Following the final boost, mice were rested for 4 weeks and then injected with 50 µg of TTPI. Four days later, the spleen cells were removed and fused with X63Ag8.653 murine myeloma cells (ATCC: CRL 1580) using 50% polyethylene-glycol 4000 (Sigma, MO, USA). Hybridoma cells were grown in hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) selection medium containing 15% fetal bovine serum in wells of 96-well microplates (Maxisorp Nunclon, Denmark). After 9 days, the supernatants of the cultures were tested with ELISA to identify cells that produced anti-TTPI antibodies. Hybridomas that tested positive were chosen for amplification and cloning based on the strong immunoreactivity of their cell supernatant, and the cells were cloned at least twice by limiting dilution. Clones secreting antibody of desired reactivity were expanded *in vitro*, they were grown at a high density in 75 mL flasks (Nunclon, Denmark) (Goding, 1996). Cells and debris were removed from culture supernatants by centrifugation at 2000g, and the antibodies in the supernatant were purified by protein-A Sepharose chromatography (Bio-Rad, CA, USA) using NaCl 3 M and glycine 1.5 M, pH 9 as binding buffer and citric acid 0.1 M, pH 6 to elute antibodies (Schuler and Reinacher, 1991). Isotype was determined using a peroxidase labeling immunoassay kit (Bio-Rad) according to the procedure recommended by the manufacturer. All experiments done with mice comply with the current institutional ethical regulations and the Official Mexican Norms: NOM-062-ZOO-1999 for use, care, and sacrifice of laboratory animals.

### 2.3. Indirect immunofluorescence assay

This assay was carried out as described previously (Vibanco-Pérez et al., 2002). Briefly, frozen sections of cysticerci of 6 µm thickness were incubated overnight first with the primary antibody (0.4 mg/mL) in PBS supplemented with 1% BSA, 0.05% Tween 20 (PBSBT). Then, rinsed three times with PBS and incubated 1 h with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (Zymed, CA, USA) diluted 1:50 in PBSBT. Sections were washed in PBS, mounted on a slide with a glycerol-PBS solution (9:1), and photographed with a Nikon Optiphot epifluorescence microscope (Nikon Inc., USA). Normal mouse IgG was used at the same dilution as control.

### 2.4. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot

Samples of 2 µg of pure protein (TPIs) were mixed with a 2× sample of Laemmli buffer, boiled for 5 min and run on 12% SDS-PAGE. Gels were electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Millipore, MA, USA). Membranes were incubated for 1 h at 37 °C at a 1:1000 dilution from immune sera or culture supernatants. IgG from preimmune rabbit or mouse sera were used as negative control. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG (Zymed) were used as secondary antibody. Bound antibodies were developed on incubating the membranes with 0.5 mg of 3–3'-diaminobenzidine and 2 µL of 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS for 15 min at room temperature.

## 2.5. ELISA techniques

### 2.5.1. Hybridoma screening

Screening of mAbs to antigens was measured with ELISA: a 96-well plate (Maxisorb Nunclon) was coated with 100  $\mu$ L of TTPI (5  $\mu$ g/mL) in carbonate buffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2 g/L NaN<sub>3</sub>, pH 9.6) and allowed to bind overnight at 4 °C. Plates were washed five times with PBS- 0.05% Tween-20 (PBST), and blocked with 0.3% bovine serum albumin (BSA) in PBST (blocking buffer) and incubated for 1 h at room temperature. Plates were washed as before and the culture supernatant (usually 50  $\mu$ L) was added to the wells, and incubated at room temperature for 2 h. Goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Zymed) was diluted 1:2000 with blocking buffer and 50  $\mu$ L of this antibody was added to each well. After incubation for 1 h at room temperature, the plates were washed with PBS- 0.3% Tween-20. Finally, plates were incubated with 100  $\mu$ L/well of a solution containing orthophenyldiamine (0.4 mg/mL) and 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrate buffer, pH 5.5, and the reaction stopped with 20  $\mu$ L of 2 N sulfuric acid per well and measured with a spectrophotometer at 492 nm (Multiskan Ascent, Thermo Scientific, MA, USA).

### 2.5.2. Localization of binding site

To determine the binding site of the 4H11D10B11 mAb to TTPI, peptides were designed and synthesized according to the amino acid sequence of the TTPI gene, reported in GenBank with accession number AF244894.1 (TTPI-1 (10-NWKMGNSYSHINTF FDTLQK-29), TTPI-2 (24-FDTLQKADTPNADIVIGVP-43), TTPI-3 (41-GVPACYLKYAQDKAPKGIKIAAENC-65), TTPI-4 (104-SNELIGE KVKHALDSGLNVIPICIGELLSEREAG-137), TTPI-45 (133-REAGKTNDVC FAQMDAIKKNVPSKEAWDKV-162) and TTPI-56 (178-ATPAQA QEVHKVVRDWIRKHXVDAGIADKARI-208). Plates were coated with a solution of 5  $\mu$ g/mL of synthetic peptides in carbonate buffer during 48 h at 4 °C. The procedure was the same mentioned above, but in this assay we tested recognition with the 4H11D10B11 mAb.

### 2.5.3. Phage ELISA binding assay

Selected clones of mimotopes were tested for mAb binding through ELISA. Plates were coated with individual phage clones, adding to each well 100  $\mu$ L containing  $1 \times 10^{11}$  plaque forming units (pfu) in carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4 °C. As positive control, wells were coated with TTPI (5  $\mu$ g/mL); as negative controls, we used a wild type M13 phage (M13KE) and one clone phage selected with rabbit polyclonal antibodies raised against a 25 kDa glutathione transferase of *T. solium* (TsGST25, unpublished datum), under the same conditions of samples. We tested wells with the 4H11D10B11 mAb, and, in parallel, with an anti-*Toxoplasma gondii* mAb as negative control. The assay was performed with the ELISA technique mentioned above. Determination of the isotype of monoclonal antibodies was performed through ELISA, using an isotyping kit (Zymed).

### 2.6. Preparation of antigen-binding fragments (Fabs)

Generation of Fab fragments was achieved using the Immuno-pure Fab kit following manufacturer's technical recommendations (Thermo Scientific). Briefly, 10 mg of antibodies (4H11D10B11 mAb, 2G6B6H3 mAb, anti-*T. gondii* mAb, or non-immune mouse IgG) was dissolved in 1 mL of fresh digestion buffer (3.5 mg/mL cysteine-HCl in phosphate buffer, pH 7.0), the solution was added to the resin containing immobilized papain, and incubated at 37 °C for 5 h. At that time, the resin was separated by filtration and the supernatant was diluted to 6 mL with binding buffer (1.5 M glycine, 3 M NaCl, pH9) and passed through protein-A Sepharose chromatography; non-digested antibodies and Fc fragments were retained, and the flow-through, which contained the Fab

fragments, was collected and concentrated in an Amicon with a PM10 membrane (Millipore). The purified fragments were visualized on an SDS-PAGE.

### 2.7. Enzymatic assay and inhibition by monoclonal antibody

Enzymatic activity was determined in a coupled assay by the formation of DHAP from G3P as previously reported (Jiménez et al., 2003). For inhibition assay, mAbs and Fabs were preincubated at different amounts (5–200  $\mu$ g) with 10  $\mu$ g of TTPI in 1 mL TED buffer (10 mM triethanolamine, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol) at room temperature for 30 min. Activity assay was initiated by adding 6 ng of preincubated TTPI in a cuvette that contained 1 mL of reaction mixture (100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM glyceraldehyde 3-phosphate, 0.2 mM  $\beta$ -NADH, 2.5 U of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase), and kinetic was monitored by absorbance decay at 340 nm in a spectrophotometer Ultrospect 3100 pro (Amersham Biosciences, Sweden). Inhibition profile was obtained using different concentrations of G3P from 0.5 to 3.5 mM.

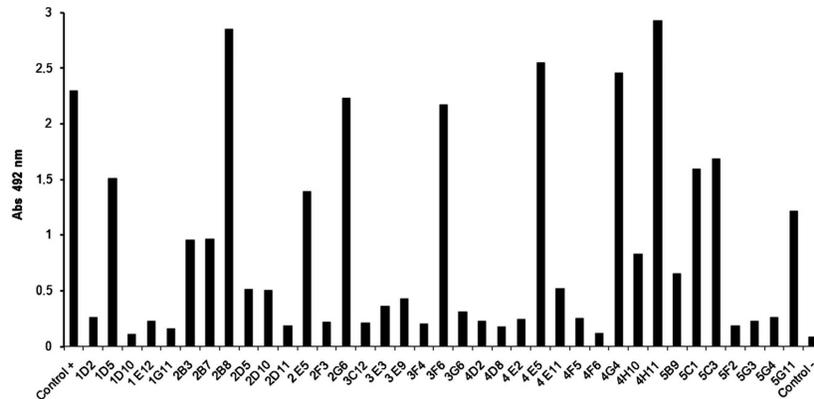
### 2.8. Mimotope selection by panning

Three successive rounds of biopanning with the mAb were carried out with a random peptide library, where peptides are fused to the pIII protein of the filamentous phage M13KE (PhD12, New England Labs, MA, USA). In brief, one EIA/RIA 8-well strip plate (Corning, MA, USA) was coated with 5  $\mu$ g/mL of the 4H11D10B11 mAb in Tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris-HCl buffer, 150 mM NaCl, pH 7.5) overnight at 4 °C. Plates were blocked with 0.25% BSA in TBS for 2 h, washed with TBS three times and the plate was incubated with  $1 \times 10^{11}$  pfu in 100  $\mu$ L of TBS overnight at 4 °C. Plates were washed three times with TBS with 0.1% Tween-20 and phage displayed mimotopes were released by incubating for 10 min with 1.0 mL of 100 mM triethylamine (pH 12) and immediately neutralized with 0.5 mL of 1 M Tris-HCl, (pH 7.4). Eluted phages were added to 1 mL TG1 bacterial cultures. Cultures were added to 100 mL of 2XYT medium and incubated overnight at 37 °C. Cultures were centrifuged and supernatants were transferred to a fresh tube and phages were precipitated at 4 °C adding 1/6 volume of PEG/NaCl (20% polyethylene glycol 8000/2.5 M NaCl) and after centrifuged at 5500g and the pellet was resuspended in TBS. Titration of amplified phages was carried out by the agar overlay technique. For a second round, we coated wells with 3  $\mu$ g/mL of mAb and used TBS with 0.3% Tween-20 for washings; for a third round, we used 1  $\mu$ g/mL of mAb and TBS with 0.5% Tween-20. We alternated BSA and skimmed milk in blocking buffer preparation to avoid unwanted selection elicited by these proteins. Last round of panning was plated on LB/IPMG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)/Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) plates and we picked randomly several blue plaques for sequencing.

## 3. Results

### 3.1. Production of monoclonal antibodies

In an initial ELISA screen of hybridomas from mice immunized with TTPI, we obtained 13 hybridomas with a strong positive response (Fig. 1). In an additional screening performed by western blot, only 5 out of 13 hybridomas recognized the denatured TTPI, they were 1D5, 2B3, 2G6, 4H11, and 5G11 (data not shown). The 1D5 hybridoma did not remain viable. In order to perform the assays to inhibit the catalytic activity of TTPI, we produced culture supernatants of the hybridomas aforementioned and recombinant

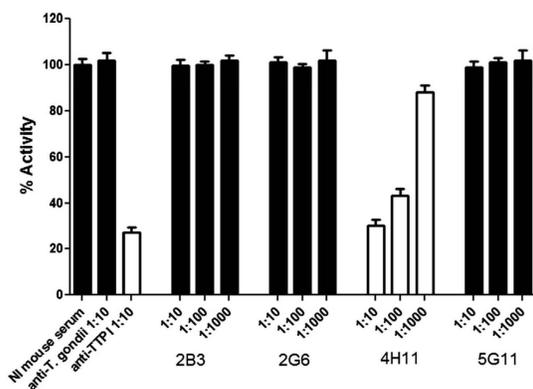


**Fig. 1.** Initial screening of hybridomas raised against *Taenia solium* triosephosphate isomerase (TTPI). Thirteen culture supernatants recognized TTPI by ELISA. The 2B8, 2G6, 3F6, 4E5, 4G4, and 4H11 hybridomas had values of optical density above two units. As positive and negative controls, we employed a mouse serum raised against TTPI and a mouse preimmune serum, respectively.

TTPI. The supernatants were diluted and proven in TTPI activity assays. We found that only the supernatant from hybridoma 4H11 (diluted 1:10) had the ability to inhibit 70% the catalytic activity of TTPI (Fig 2). On the basis of these initial observations, hybridoma 4H11 was selected for cloning by limiting dilution to obtain the 4H11D10B11 mAb. Besides, we cloned and produced the 2G6B6H3 and 5G11F3B5 mAbs, which recognize TTPI but are unable to inhibit its activity, and a mAb rose against the rhoptry of *T. gondii* (anti-*T. gondii* mAb) to use them as controls.

### 3.2. General characterization of the monoclonal 4H11D10B11

Isotype of the 4H11D10B11 mAb was determined as immunoglobulin G subclass 1 (IgG1) with  $\kappa$  light chains. The specificity of mAb was tested using TPis of some organisms in western blot, such as: *Sus scrofa* (SsTPI), *S. mansoni* (SmTPI), *Entamoeba histolytica* (EhTPI), *Giardia lamblia* (GITPI), *Trypanosoma cruzi* (TcTPI), and *Homo sapiens* (HsTPI). Fig. 3 shows a panel of western blot with strips 1–7 tested with a rabbit immune polyclonal anti-TTPI serum.

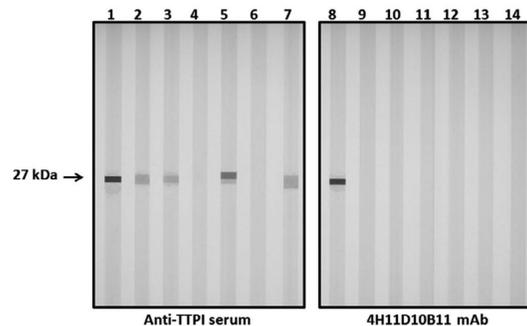


**Fig. 2.** Inhibition activity of *Taenia solium* triosephosphate isomerase (TTPI) by selected hybridomas. Culture supernatants dilutions of selected hybridomas against TTPI were preincubated with the TTPI and residual TTPI activity was determined using the assay described under Section 2. As positive control, anti-TTPI mouse serum diluted 1:10 was included, and as negative controls, a non immune mouse serum and culture supernatant from a hybridoma anti-*T. gondii*, both diluted 1:10.

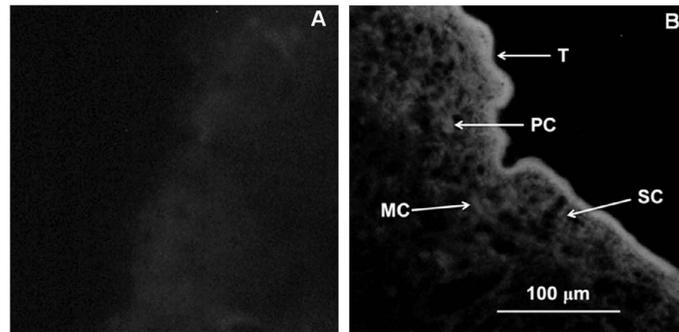
In this case, antibodies showed a slight cross-reactivity with SsTPI, SmTPI, and HsTPI; and a strong reactivity with GITPI, but did not react with either EhTPI or TcTPI. Panel with strips 8–14 were tested with the 4H11D10B11 mAb, this showed that this mAb recognized specifically TTPI. Moreover, we tested 2G6B6H3 and 5G11F3B5 mAbs and both had specificity to TTPI (data not shown). Fig. 4 shows the immunohistochemical localization using the 4H11D10B11 mAb. TTPI was recognized strongly in the tegument and in the cytoplasm of muscle, as well in protonephridial and subtegumental cells. No fluorescence staining was observed in the control section of cysticerci incubated with normal mouse IgG.

### 3.3. Inhibition assay

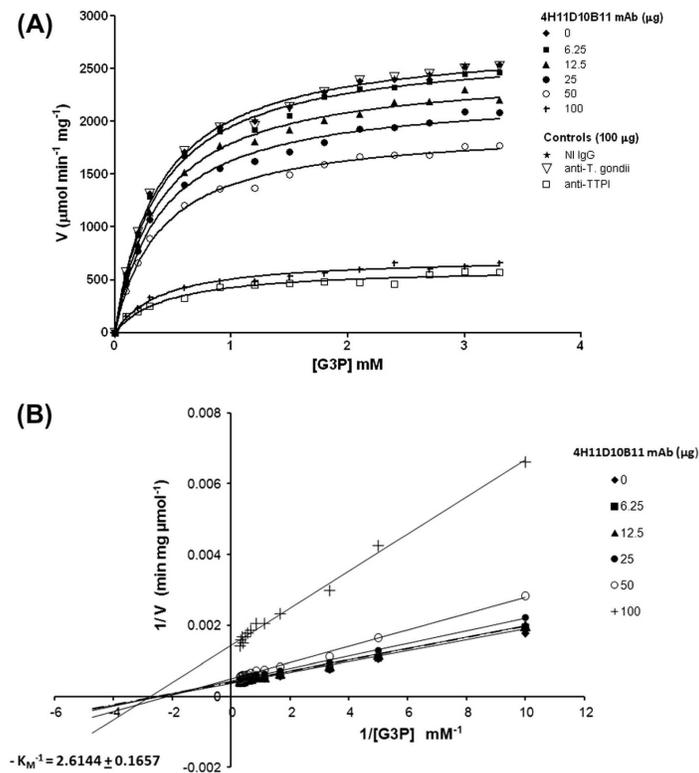
We determined the inhibition kinetics using different amounts of the 4H11D10B11 mAb (6.25–100  $\mu$ g). Fig. 5A shows the inhibition graph,  $V_{MAX}$  decreased when the amount of antibody increased. Enzyme alone presented a  $K_M = 0.38025 \pm 0.02588$ , this finding is consistent with data previously reported (Jiménez et al., 2000). As negative control, we used the anti-*T. gondii* mAb, as expected, it did not alter the catalytic activity. As positive



**Fig. 3.** Western blot showing specificity of monoclonal antibody 4H11D10B11. Triosephosphate isomerases (TPis) strips: 1 and 8 *Taenia solium* (TTPI); 2 and 9 *Sus scrofa* (SsTPI); 3 and 10 *Schistosoma mansoni* (SmTPI); 4 and 11 *Entamoeba histolytica* (EhTPI); 5 and 12 *Giardia lamblia* (GITPI); 6 and 13 *Trypanosoma cruzi* (TcTPI); 7 and 14 *Homo sapiens* (HsTPI). Strips 1–7 were tested with a rabbit immune serum anti-TTPI and strips 8–14 with the 4H11D10B11 mAb.



**Fig. 4.** Immunolocalization of triosephosphate isomerase by indirect immunofluorescence on *Taenia solium* cysticerci. Sections were incubated with: A) normal mouse IgG and B) 4H11D10B11 mAb, followed by a FITC-labeled anti-mouse IgG. Arrows with letters point out: tegument (T), muscle (MC), protonephridial cells (PC), and subtegumental cells (SC).

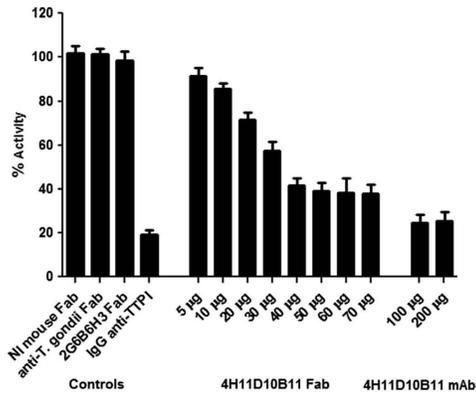


**Fig. 5.** Inhibition profiles of the 4H11D10B11 mAb on *Taenia solium* triosephosphate isomerase (TPI). (A) Plot of the inhibition of TPI activity using variable concentrations of monoclonal antibody. (B) The double reciprocal plot displays a non-competitive inhibition of mAb. TPI (10 µg) incubated (◆) without any antibody and different concentrations of the 4H11D10B11 mAb: 6.25 mg/mL (■), 12.5 mg/mL (▲), 25 mg/mL (●), and 50 mg/mL (○) and 100 µg/mL (+). Monoclonal antibody raised against the rhoptry of *Toxoplasma gondii* (anti-*T. gondii*) and mouse IgG against TPI (anti-TTPI) were used as negative and positive controls for the assays.

control, mouse IgG anti-TTPI was used, which caused a significant decrease in  $V_{MAX}$ . On the other hand, the double reciprocal plot or Lineweaver–Burk plot (Fig. 5B) reveals a non-competitive typical pattern, where  $V_{MAX}$  decreases and  $K_M$  remains constant, suggesting that the 4H11D10B11 mAb did not bind to the catalytic site and is therefore non-competitive with respect to substrate. The

inhibition assays for TPI showed that 12.5, 25, and 50 µg of mAb inhibited TPI slightly, reaching a maximal effect at 100 µg.

The antigen-binding fragments (Fabs) obtained from the 4H11D10B11 mAb were tested to determine if these fragments retain inhibitory ability. Fig. 6 shows that Fabs present a similar degree of inhibition as the whole molecule of the 4H11D10B11 mAb,



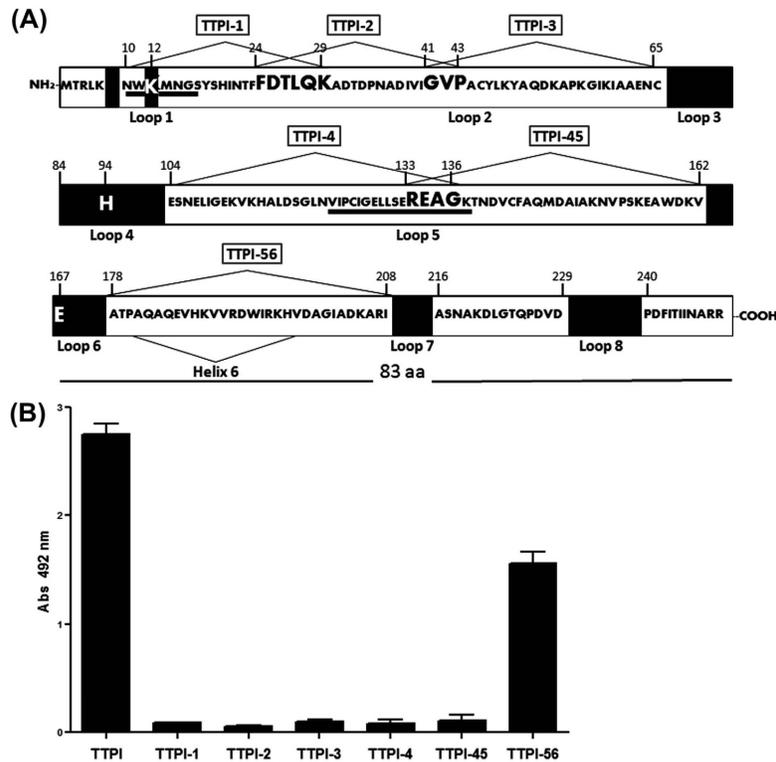
**Fig. 6.** Inhibition of the activity of *Taenia solium* triosephosphate isomerase (TTPI) by antigen-binding fragments (Fabs). TTPI (10 µg) was incubated for 30 min with different amounts of Fabs from the 4H11D10B11 mAb (5–70 µg), and thereafter TTPI activity was determined. Fabs from non-immune mouse IgG (NI mouse-Fab), mAb raised against the rhoptry of *Toxoplasma gondii* (anti-*T. gondii* Fab) and the 2G6B6H3 mAb (2G6B6H3 Fab) were used as negative controls. Whole 4H11D10B11 mAb (100 and 200 µg) and mouse IgG anti-TTPI (IgG anti-TTPI) were used as positive controls. The Y-values represent the percentage of residual activities.

since Fabs at 40 µg inhibited TTPI activity around 60%. In contrast, 100 µg of Fabs obtained from polyclonal antibodies of non-immunized mice (NI mouse Fab), Fabs obtained from anti-*T. gondii* rhoptry mAb (anti-*T. gondii* Fab), and Fabs against TTPI (2G6B6H3 Fab) did not inhibit TTPI activity. As positive controls, we used mouse purified IgG anti-TTPI and the 4H11D10B11 mAb at doses of 100 and 200 µg, which inhibited 81%, 76%, and 76%, respectively.

### 3.4. Epitope localization

Fig. 7A depicts positioning of six synthetic peptides designed on non-conserved regions of TTPI (TTPI-1, TTPI-2, TTPI-3, TTPI-4, TTPI-45, and TTPI-56) and Fig. 7B shows the ELISA where mAb recognized the whole TTPI and the TTPI-56 peptide. This indicates that the epitope of mAb is on the primary sequence (178-ATPAQAQEVHKVVRDWIRKHYVDAGIADKARI-208) of the enzyme.

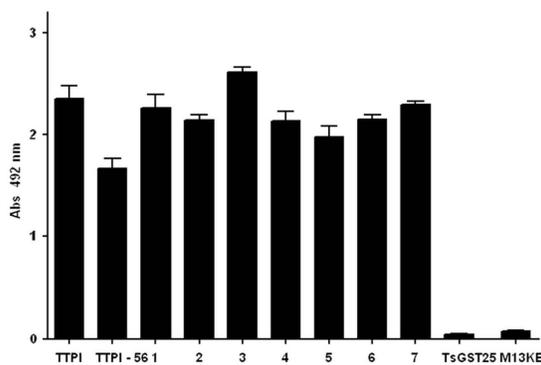
To ascertain where the epitope was localized on TTPI-56, seven mimotope clones from a random dodecapeptide (12 mer) M13 phage library were isolated using the 4H11D10B11 mAb as probe. The deduced primary sequence of these clones and the TTPI-56 peptide was aligned to find similarity (Fig. 8). Amino acid sequence of six peptides partially matched with the sequence of peptide TTPI-56, in at least two residues. Conversely, only one peptide did not match TTPI-56 (page 5). On the other hand,



**Fig. 7.** Localization of the 4H11D10B11 mAb binding site. (A) The primary structure of *Taenia solium* triosephosphate isomerase (TTPI, 250 aa) is represented by three bars of 83 aa. The non-conserved regions are within the white segments, except the underlined sequences that correspond to conserved amino acids. The synthesized peptides were designed on these regions and are indicated by triangles on the sequence. Only two non-conserved regions on carboxyl terminal were not considered for peptide design. The larger letters indicate the overlapped positions among synthesized peptides. Highly conserved regions are indicated by black segments; and letters in white indicate the residues of active site (K12, H94 and E167). The positions of the loops and the helix 6 are indicated under the black bars and by a triangle under the sequence. (B) Graph of ELISA data shows the binding of the 4H11D10B11 mAb to the six synthetic peptides. Only peptide TTPI-56 (see sequence in A) and TTPI (positive control) were recognized by the monoclonal antibody.

TTPI-56	V	R	D	W	I	R	K	H	V	D	A	G	I	A	D	K	A
Phage 6 (x7)				N	A	H	L	Q	S	D	A	L	P	Q	T		
Phage 7				Q	V	V	S	D	N	R	W	P	T			M	K
Phage 3	W	H	Y	N	W	W	L	P	A	G	P	R					
Phage 4	S	I	S	W	W	R	W	H	W	A	S	V					
Phage 1	H	L	Y	H	Y	S	Y	A	A	Y	W	P					
Phage 2 (x2)	W	H	W	F	R	Y	P	A	P	P	P	E					
Phage 5	F	H	W	S	W	Y	T	P	S	R	P	S					

**Fig. 8.** Deduced amino acid sequences of dodecapeptides displayed in phages. A total of 14 peptides were obtained after three rounds of panning of a random peptide phage display library (12 mer) using the 4H11D10B11 mAb. Phage clones 6 and 2 were isolated seven and two times on the screening of this library, respectively. Matched positions with part of the sequence contained in TTPI-56 peptide are indicated with black squares. Amino acids with common positions among the peptides are indicated with gray squares. The clone displaying the maximal positive signal in ELISA is outlined with a rectangle (see Fig. 9).



**Fig. 9.** Specificity of binding of the 4H11D10B11 mAb to the mimotopes. Phage clones with mimotopes (1–7) were tested with ELISA to evaluate their reactivity to monoclonal antibody. TTPI was used as positive control and a M13 phage without insert (M13KE) and an unrelated mimotope (TsGST25) were used as negative controls of antigens. Additionally, anti-*T. gondii* mAb was tested in parallel as negative control (data not shown).

peptide mimotopes share several common positions among them; surprisingly, almost all analyzed peptides showed a high rate of recurrence of tryptophan, tyrosine, and proline.

Finally, ELISA data in Fig. 9 show the values of the 4H11D10B11 mAb binding to the peptide mimotopes displayed on phages, and phage 3 got the highest value. In contrast, the 4H11D10B11 mAb did not bind to the phage without peptide (M13KE) nor to the unrelated phage displaying mimotope of TsGST25. Moreover, all phages displaying TTPI mimotopes, phage M13KE, and phage TsGST25 did not react with anti-*T. gondii* mAb (data not shown).

#### 4. Discussion

In this work we produced a monoclonal antibody (4H11D10B11) against *T. solium* TPI and it was characterized using western blot, kinetic analysis, and epitope localization. The most important finding of this work was that the 4H11D10B11 mAb inhibits specifically the catalytic activity of TPI.

In a preliminary study, we found that anti-TTPI antibodies inhibited TTPI enzymatic activity, without affecting the enzyme of pigs (intermediary host for the parasite) (Jiménez et al., 2003). Therefore, the aim of this study was to obtain hybridomas that produce monoclonal antibodies against TTPI under the following criteria: 1) highest values for the recognition of TTPI in ELISA and western blot; 2) the ability to inhibit enzyme activity; and 3) specificity to

recognize TTPI. From 15 hybridomas produced, only hybridoma 4H11 satisfied the first two criteria of selection, whereas 2B3, 2G6, and 5G11 hybridomas only recognized the enzyme.

The specificity criterion for the 4H11D10B11 mAb was determined by western blot with TPIs of several organisms, in which the monoclonal antibody reacted strongly with TTPI but not with other TPIs, suggesting that it is directed against one of the non-conserved regions of TTPI. In contrast, a rabbit polyclonal serum raised against TTPI recognized well TTPI (*T. solium*) and presented a slight cross-reactivity with *SsTPI* (pig), *SmTPI* (*S. mansoni*), and *HsTPI* (human); and a strong cross-reactivity with *GITPI* (*G. lamblia*). This highlights the cross-reactivity with its hosts, pig and human, suggesting that it is possible to develop autoimmunity triggered by TTPI, once the infection is established, this event has been described for other parasitic infections such as Chagas disease (Cortés-Figueroa et al., 2008) and malaria (Ritter et al., 1993). Moreover, auto-antibodies against TPI have been found in diverse diseases, such as multiple sclerosis (Kolln et al., 2006), osteoarthritis (Xiang et al., 2004), lupus (Sasajima et al., 2006), and cancer (Shukla et al., 2007; Tamesa et al., 2009; Zhang et al., 2009). Thus, the observed cross-reactivity among TPIs is due to the fact that they share highly conserved regions and indicates that whole TPI should not be considered to immunize animals. Therefore, we propose the use of peptides designed from non-conserved regions with marked differences between TPIs from *T. solium* and its intermediary host (pig) to develop a vaccine.

Regarding catalytic inhibition, the 4H11D10B11 mAb was tested at different amounts to determine a dose–effect relation; the results demonstrated that there was an increase of inhibition when the amount of mAb was increased to 100 µg, above this amount there was no effect. Regarding the inhibition assay with Fabs, the maximal effect was reached at 40 µg, but the inhibition was lower than obtained with the whole mAb, 60% versus 76%. The difference between the inhibition caused by Fabs and the whole mAb can be accounted for by a possible loss of folding during the process used to obtain Fabs, i.e., a percentage of molecules could not bind or bound weakly causing a decrease in the inhibitory effect.

Kinetic analysis clearly showed that the mAb did not compete with the substrate for binding to the enzyme, but the mAb inhibited TTPI activity. Michaelis–Menten kinetics also illustrated how the mAb caused a dramatic decrease in  $V_{MAX}$ , but the value of  $K_M$  remained constant (Fig. 5A), providing information about the binding efficiency of the substrate and that it is not modified by interaction with the 4H11D10B11 mAb. The mechanism by which the 4H11D10B11 mAb inhibits catalysis is unclear; however, it is likely that the mechanism of non competitive inhibition could include enzyme rearrangements, partial enzyme inactivation, or a steric hindrance, as has been seen in different systems (Lescar et al., 1999; Buschiazzo et al., 2012; de Gasparo et al., 1988). Nevertheless, more studies are needed to elucidate this mechanism of inhibition.

In an attempt to identify the linear epitope recognized by the 4H11D10B11 mAb, we used synthesized peptides on non-conserved regions of TTPI, and discriminated those regions that are highly conserved, such as the active loops, i.e., loop 6 indispensable for optimal catalytic activity and the loop 7 (Pompliano et al., 1990; Wang et al., 2009), as well as the inaccessible region corresponding to interface, mainly loop 3, which confers stability to the dimer (Schliebs et al., 1997). ELISA analysis showed that the 4H11D10B11 mAb binds to TTPI-56, it even provided a location of the binding site on TTPI, the peptide spanning 30 residues and probably several epitopes could be found in it. Therefore, we used a phage display approach to find the epitope. We obtained 14 mimotope clones selected with the 4H11D10B11 mAb and compared its deduced primary sequences with the amino acid se-

quence from TTPI-56 peptide. Although, none of the mimotopes had a strong identity match with the primary sequence of TTPI-56, they shared amino acids in some positions with the sequence (WIRKHXVDAGIAD) presented by the TPI-56 peptide. Noteworthy, this peptide was previously identified as T-cell epitope in *S. mansoni* TPI (Reynolds et al., 1994). All mimotope clones displayed in the phage were strongly recognized by the 4H11D10B11 mAb, contrary to what was observed with the M13KE phage (without insert) and the phage carrying a mimotope to TsGST25. This suggests that the interactions between the mAb with the peptide displayed on the phage are specific and support the hypothesis that mimotopes mimic the structure of the linear epitope that recognizes the mAb on TTPI, as has been determined in other studies (Cunha-Júnior et al., 2010; Li et al., 2010).

In conclusion, we have described a specific monoclonal antibody and its Fabs against TTPI, which recognize a sequence localized on helix 6 (non-conserved region) and are able to inhibit the catalytic activity of the enzyme. Although, this mAb has not been tested directly against the parasite, it is possible that this monoclonal antibody can damage the parasite in question, since TTPI in *T. solium* is localized on the tegument and the mAb is an IgG1 with the ability to bind the complement; similar experiments have been previously reported for *S. mansoni* and *T. cruzi* (Cortés-Figueroa et al., 2008; Harn et al., 1992). Finally, so far, there are no effective vaccines or new effective drugs against *T. solium*. Therefore, further studies must be carried out to elucidate the amino acid interactions between the mAb paratope and the binding site in TTPI to produce a recombinant single chain variable fragment (ScFv) or a peptide designed from complementarity determining regions (CDRs) of the paratope able to bind with high affinity to the helix 6 to disrupt TTPI activity.

#### Acknowledgments

This work was supported by CONACyT (80134-M) and DGAPA-PAPIIT (IN207507-3 and IN206708). Sanabria-Ayala V was supported by CONACyT (204074) and is a student of Posgrado en Ciencias Biológicas (PCBIOL), UNAM. Additionally, we thank M.D. Alicia Ochoa Sanchez for technical help.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.010>.

#### References

- Buschiazzo, A., Muia, R., Larrieux, N., Pitcovsky, T., Mucci, J., Campetella, O., 2012. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog.* 8, e1002474.
- Cortés-Figueroa, A.A., Pérez-Torres, A., Salaiza, N., Cabrera, N., Escalona-Montaño, A., Rondán, A., Aguirre-García, M., Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Becker, I., 2008. A monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth in vitro and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Parasitol. Res.* 102, 635–643.
- Cunha-Júnior, J.P., Silva, D.A., Silva, N.M., Souza, M.A., Souza, G.R., Prudencio, C.R., Pirovani, C.P., Cezar, M., Cascardo, J., Barbosa, B.F., Goulart, L.R., Mineo, J.R., 2010. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. *Immunobiology* 215, 26–37.
- de Gasparo, M.M., Wood, J.M., Heusser, C.H., 1988. Mechanism of inhibition of human renin by monoclonal antibodies. *Hypertension* 11, 209–216.
- Enriquez-Flores, S., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Alcantara, G., De la Mora-De la Mora, I., Gutierrez-Castrellon, P., Carvajal, K., Lopez-Velazquez, G., Reyes-Vivas, H., 2008. Species-specific inhibition of *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase by localized perturbation of the homodimer. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 179–186.
- Ferru, I., Georges, B., Bossus, M., Estaquier, J., Delacore, M., Harn, D.A., Tartar, A., Capron, A., Grassmasse, H., Aurialt, C., 1997. Analysis of the immune response elicited by a multiple antigen peptide (MAP) composed of two distinct protective antigens derived from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 19, 1–11.
- Goding, J.W., 1996. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, third ed. Academic Press, London.
- Guo, A., Cai, X., Jia, W., Liu, B., Zhang, S., Wang, P., Yan, H., Luo, X., 2010. Mapping of *Taenia solium* TSOL18 antigenic epitopes by phage display library. *Parasitol. Res.* 106, 1151–1157.
- Harn, D.A., Gu, W., Oligino, L.D., Mitsuyama, M., Gebremichael, A., Richter, D., 1992. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of schistosome triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 148, 562–567.
- Jiménez, L., Vibanco-Pérez, N., Navarro, L., Landa, A., 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* 30, 1007–1012.
- Jiménez, L., Fernández-Velasco, D.A., 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, 209–214.
- Knowles, J.R., 1991. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 350, 121–124.
- Kolln, J., Ren, H.M., Da, R.R., Zhang, Y., Spillner, E., Olek, M., Hermanowicz, N., Hilgenberg, L.G., Smith, M.A., van den Noort, S., Qin, Y., 2006. Triosephosphate isomerase- and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-reactive autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177, 5652–5658.
- Lescar, J., Brynda, J., Rezacova, P., Stouracova, R., Riottot, M.M., Chitarrá, V., Fabry, M., Horejsi, M., Sedlacek, J., Bentley, G.A., 1999. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by a monoclonal antibody. *Protein Sci.* 8, 2686–2696.
- Li, Y., Dutta, U., Cohenford, M.A., Dain, J.A., 2007. Nonenzymatic glycation of guanosine 5'-triphosphate by glyceraldehyde: an in vitro study of AGE formation. *Bioorg. Chem.* 35, 417–429.
- Li, Y., Cohenford, M.A., Dutta, U., Dain, J.A., 2008. In vitro nonenzymatic glycation of guanosine 5' triphosphate by dihydroxyacetone phosphate. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1189–1196.
- Li, Y., Ning, Y., Wang, Y., Peng, D., Jiang, Y., Zhang, L., Long, M., Luo, J., Li, M., 2010. Mimotopes selected with a neutralizing antibody against urease B from *Helicobacter pylori* induce enzyme inhibitory antibodies in mice upon vaccination. *BMC Biotechnol.* 10, 84–95.
- Manoutcharian, K., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodriguez, M., Govezensky, T., 1999. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 67, 4764–4770.
- Olivares-Illana, V., Pérez-Montfort, R., López-Calahorra, F., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez Puyou, A., 2006. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multi trypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* 45, 2556–2560.
- Orosz, F., Oláh, J., Ovádi, J., 2006. Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life* 58, 703–715.
- Orosz, F., Oláh, J., Ovádi, J., 2009. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 1168–1174.
- Pompliano, D.L., Peyman, A., Knowles, J.R., 1990. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device. definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 29, 3186–3194.
- Reis, E.A., Mauadi Carmo, T.A., Athanzio, R., Reis, M.G., Harn Jr., D.A., 2008. *Schistosoma mansoni* triose phosphate isomerase peptide MAP4 is able to trigger naïve donor immune response towards a type-1 cytokine profile. *Scand. J. Immunol.* 68, 169–176.
- Reynolds, S.R., Dahl, C.E., Harn, D.A., 1994. T and B epitope determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine triose-phosphate isomerase. *J. Immunol.* 152, 193–200.
- Ritter, K., Kuhlencord, A., Thomssen, R., Bommer, W., 1993. Prolonged haemolytic anaemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. *Lancet* 342, 1333–1334.
- Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, D.A., 2002. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 322, 669–675.
- Sasajima, T., Watanabe, H., Sato, S., Sato, Y., Ohira, H., 2006. Anti-triosephosphate isomerase antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric lupus. *J. Neuroimmunol.* 181, 150–156.
- Scatena, R., Bottoni, P., Pontoglio, A., Mastroiataro, L., Giardina, B., 2008. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17, 1533–1545.
- Schliebs, W., Thanki, N., Eritja, R., Wierenga, R., 1996. Active site properties of monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM) as deduced from mutational and structural studies. *Protein Sci.* 5, 229–239.
- Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., Wierenga, R.K., 1997. A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36, 9655–9662.
- Schuler, G., Reinacher, M., 1991. Development and optimization of a single-step procedure using protein A affinity chromatography to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from hybridoma supernatants. *J. Chromatogr.* 587, 61–70.
- Shukla, S., Govekar, R.B., Sirdeshmukh, R., Sundaram, C.S., D'Cruz, A.K., Pathak, K.A., Kane, S.V., Zingde, S.M., 2007. Tumor antigens eliciting autoantibody response in cancer of gingivo-buccal complex. *Proteomics Clin. Appl.* 1, 1592–1604.

- Singh, S.K., Maithal, K., Balam, H., Balam, P., 2001. Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of *Plasmodium falciparum* triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Lett.* 501, 19–23.
- Stroppolo, M.E., Falconi, M., Caccuri, A.M., Desideri, A., 2001. Superefficient enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1451–1460.
- Tamesa, M.S., Kuramitsu, Y., Fujimoto, M., Maeda, N., Nagashima, Y., Tanaka, T., Yamamoto, S., Oka, M., Nakamura, K., 2009. Detection of autoantibodies against cyclophilin A and triosephosphate isomerase in sera from breast cancer patients by proteomic analysis. *Electrophoresis* 30, 2168–2181.
- Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Mendoza-Hernández, G., Landa, A., 2002. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* 88, 398–404.
- Wang, Y., Berlow, R.B., Loria, J.P., 2009. Role of loop–loop interactions in coordinating motions and enzymatic function in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 48, 4548–4556.
- Wierenga, R.K., 2001. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* 492, 193–198.
- Wu, H.W., Hu, X.M., Wang, Y., Kurtis, J.D., Zeng, F.J., McGarvey, S.T., Wu, G.L., Zhang, Z.S., Hua, Z.C., 2006. Protective immunity induced by phage displayed mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop.* 99, 200–207.
- Xiang, Y., Sekine, T., Nakamura, H., Imajoh-Ohmi, S., Fukuda, H., Nishioka, K., Kato, T., 2004. Proteomic surveillance of autoimmunity in osteoarthritis: identification of triosephosphate isomerase as an autoantigen in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 1511–1521.
- Zhang, X.Z., Xiao, Z.F., Li, C., Xiao, Z.Q., Yang, F., Li, D.J., Li, M.Y., Li, F., Chen, Z.C., 2009. Triosephosphate isomerase and peroxiredoxin 6, two novel serum markers for human lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 100, 2396–2401.
- Zhu, Y., Si, J., Harn, D.A., Ren, J., Yu, C., Liang, Y., Yin, X., He, W., Cao, G., 2006. *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection. *Parasitology* 132, 67–71.