

39  
201

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**"PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL  
DE LA ENZIMA GLUTATION S-TRANSFERASA DE  
*Taenia solium*"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A :  
**ADELAIDA DIAZ VILCHIS**



DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Purificación y caracterización parcial de la enzima glutatión S-transferasa  
de Taenia solium"

realizado por Adelaida Díaz Vilchis

con número de cuenta 8955250-2 . pasante de la carrera de Biólogo

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	Dr. Abraham Landa Piedra
Propietario	M. en C. Sergio Corona García
Propietario	Dr. Wilhelm Hansberg Torres
Propietario	Dr. Alfonso Torre Blanco
Suplente	Dr. Guillermo Salgado de la Cruz
Suplente	Dr. Guillermo Salgado de la Cruz

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo de Coordinación de la Facultad de Biología

COORDINACION GENERAL  
DE BIOLOGIA

*(Handwritten signatures and initials)*

Esta Tesis se realizó en el laboratorio de Biología Molecular, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

**DEDICATORIA**

A mis padres Joaquina Vilchis y Romualdo Díaz por confiar en mí, por alentarme y darme su cariño.

A mis hermanos: Mónica, Juan Manuel, Amada, José Alfredo y Eduardo por su motivación y apoyo.

A mi hermana Irene Díaz por comprenderme y ser un buen ejemplo para mí.

A mis sobrinos: Mariano, Tania, Yocoyani, Topiltzin, Ciuaxóchitl, Yuritzi y Lalito, por ser tan adorables conmigo.

A mis amigos por no separarse de mí en momentos difíciles.

**AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Abraham Landa Piedra por su asesoría y apoyo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Kaethe Willms por brindarme su apoyo durante el tiempo que trabajé en la Facultad de Medicina.

A La Dra. Martha Zentella de Piña y al M. en C. Sergio Corona García, por su enorme apoyo para realizar los ensayos de Cinética Enzimática en el Laboratorio V del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

Al Dr. Wilhelm Hansberg por permitirme concluir algunos experimentos en su laboratorio, el 103 Oriente del Depto. de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular.

Agradezco la revisión de este trabajo a:

Dr. Abraham Landa Piedra  
M. en C. Sergio Corona García  
Dr. Wilhelm Hansberg Torres  
Dr. Alfonso Torre Blanco  
Dr. Guillermo Salgado Maldonado

A Marie Merchant, Luz Navarro, Ismael Ramírez, Ana Lilia Palma, Cuahutemoc Corella, Carlos Castellanos, Juan Molina, Juan Campos y Fernando Lledías, quienes me apoyaron con asesoría en algunos experimentos, gracias por su paciencia.

A Irene Díaz por sus valiosas sugerencias y por dedicarme parte de su tiempo.

A todos los que colaboraron de alguna manera para la realización de este trabajo.

Esta tesis se realizó con el apoyo de los proyectos CONACYT 3326-M9308 y DGAPA-PAPITT IN 201 795.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS	iv
RESUMEN	v
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. LA CLASIFICACIÓN DE <i>Taenia solium</i> SEGÚN ZAMAN, 1979	1
2. CICLO DE VIDA Y MORFOLOGÍA	1
3. IMPORTANCIA DE LA TENIOSIS/CISTICERCOSIS	2
4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	3
5. DIAGNÓSTICO	4
6. VACUNACIÓN Y PROTECCIÓN	6
7. TRATAMIENTO Y CONTROL	7
<b>II. ANTECEDENTES</b>	8
1. GENERALIDADES DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA	8
a) Las Glutación S-transferasas de mamíferos	8
b) Las Glutación S-transferasas de helmintos	9
<b>III. OBJETIVO</b>	14
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
1. MATERIALES BIOLÓGICOS	15
a) Parásitos	15
b) Enzimas	15
2. REACTIVOS	15
3. MÉTODOS	16
a) Preparación de los extractos crudos	16
i) Con PBS-tritón 1%-EDTA 0.5 mM, pH 7.4	16
ii) Con PBS-NaCl 0.35 M, pH 7.4	16
b) Purificación de la Glutación S-transferasa	16
c) Determinación de la concentración de proteínas	16
d) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	17
e) Preparación de suero anti-Glutación S-transferasa de <i>Taenia solium</i>	17
f) Preparación de anticuerpos específicos anti-Glutación S-transferasa de <i>Taenia solium</i>	17
g) Inmunolectrotransferencia	18
h) Inmunofluorescencia indirecta	18
i) Ensayo de actividad de la Glutación peroxidasa	19

j) Ensayo de actividad de la Glutación S-transferasa	19
k) Ensayo de inhibición	19
l) Ensayo de protección	20
<b>V. RESULTADOS</b>	21
1. PURIFICACIÓN DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE <i>Taenia solium</i>	21
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI-GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE <i>Taenia solium</i>	21
3. LOCALIZACIÓN DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN EL TEJIDO DEL METACÉSTODO DE <i>Taenia solium</i>	22
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA	22
5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA	23
6. ENSAYO DE INHIBICIÓN	24
7. ENSAYO DE PROTECCIÓN	25
8. IDENTIFICACIÓN DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN OTRAS ESPECIES	25
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	27
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	32
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	33



## LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

anti-GST-s	Anticuerpos anti Glutación S-transferasa de <i>Taenia solium</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
DAB	3,3'-diaminobencidina
EC-c	Extracto crudo de metacéstodos de <i>Taenia crassiceps</i>
EC-s	Extracto crudo de metacéstodos de <i>Taenia solium</i>
ECI-s	Extracto crudo de metacéstodos de <i>Taenia solium</i> con inhibidores de proteasas
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático cuantitativo
FITC	Fluoroscceína isotiocianato
GST-c	Fracción de GST de <i>Taenia crassiceps</i>
GST-s	Fracción de GST de <i>Taenia solium</i>
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
I <sub>50</sub>	Concentración de un inhibidor a la cual la actividad de una enzima se inhibe 50%
IET	Inmunolectrotransferencia
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
Ig's	Inmunoglobulinas
kDa	Kilodaltones
NADPH	Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
PBS	Amortiguador de fosfato de sodio, pH 7.4 (0.15 M de cloruro de sodio, 0.015 M de fosfatos)
PMSF	p-Fenil metilsulfonilfluoruro
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con SDS
TLCK	N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona

**RESUMEN**

La Glutación S-transferasa de *Taenia solium* se purificó a partir de un extracto crudo de metacéstodos por medio de una cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Glutación unida a sefarosa 4B. La fracción unida a la columna se eluyó con glutación. Esta fracción se encuentra compuesta por una banda de 26 kDa vista por geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Los ensayos de actividad enzimática mostraron que esta fracción presentó actividad específica con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno y ácido etacrínico, pero no con el sustrato 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano. Asimismo, la fracción se inhibió con verde de indocianina y clorotrifeniltín, observándose una inhibición no competitiva y competitiva respectivamente. Por otro lado, la fracción presentó una actividad específica de Glutación peroxidasa independiente de selenio. Las determinaciones de la proteína y de la actividad enzimática con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno mostraron que esta proteína es la enzima Glutación S-transferasa de *Taenia solium* y que constituye aproximadamente el 3% del total de las proteínas solubles de este metacéstodo.

Con la fracción eluida de la columna de Glutación-sefarosa 4B se produjeron anticuerpos policlonales en un conejo. Se utilizó la fracción de inmunoglobulinas en los ensayos para determinar la localización de la Glutación S-transferasa en los tejidos de los metacéstodos de *Taenia solium*. Los resultados mostraron que la Glutación S-transferasa en *Taenia solium* se localiza formando un gradiente que va de las células del sistema protonefridial hacia el tegumento, atravesando por toda la pared.

Un ensayo de protección realizado en un modelo de cisticercosis murina presentó una eficiencia de protección del 25% y del 49% al utilizar una dosis de 10 µg de la Glutación S-transferasa de *Taenia solium* y de *Taenia crassiceps*, respectivamente. Finalmente los anticuerpos anti-Glutación S-transferasa de *Taenia solium* mostraron una reacción cruzada con otras Glutación S-transferasas purificadas de otros ténidos, tales como *Taenia solium* (adulto), *Taenia saginata* (adulto) y *Taenia taeniaeformis* (adulto), pero no con las Glutación S-transferasas de *Schistosoma mansoni* (adulto), de hígado de cerdo y de conejo.

## I. INTRODUCCIÓN

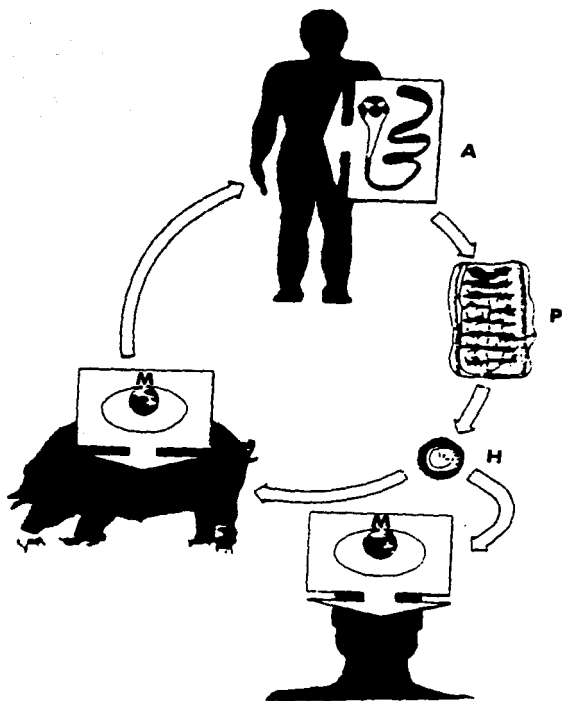
### 1. LA CLASIFICACIÓN DE *Taenia solium* SEGÚN ZAMAN, 1979.

<b>Reino:</b>	Animalia	<b>Superfamilia:</b>	Taenoiidea
<b>Subreino:</b>	Metazoa	<b>Familia:</b>	Taeniidae
<b>Phylum:</b>	Platyhelminthes	<b>Género:</b>	Taenia
<b>Clase:</b>	Cestoda	<b>Especie:</b>	<i>Taenia solium</i>
<b>Orden:</b>	Cyclophyllidea	<b>Etapas larvarias:</b>	Metacéstodo ó cisticerco.

### 2. CICLO DE VIDA Y MORFOLOGÍA (Figura 1)

El céstodo adulto o gusano de la *T. solium*, también conocido como solitaria, vive en el intestino delgado del hombre y puede mantenerse ahí hasta por 20 años sin presentar sintomatología (Flisser, 1990). El céstodo hermafrodita carece de un aparato digestivo propio, por lo que se alimenta a través del tegumento, por medio de la difusión o de un transporte activo. Los humanos son parasitados por dos especies de *Taenia* adulta, *T. solium* y *T. saginata*, aunque recientemente se ha reportado en la literatura una tercera forma de *Taenia* humana denominada *Taenia asiática* que es distinguible de la *T. solium* y la *T. saginata* (Eom y Rim, 1993; Bowles y McManus, 1994).

El cuerpo del adulto tiene una longitud de 2 a 8 m y 7 a 10 mm de ancho, se reconocen en él tres partes: escólex, cuello y estróbilo. El escólex mide de 0.6 a 1 mm de diámetro, posee 4 ventosas y un roseto con una doble corona de ganchos (aproximadamente 22 a 32), por lo cual se denomina escólex armado. El cuello es corto, y de menor diámetro que el escólex. El estróbilo constituye la mayor parte del cuerpo y está compuesto por numerosos segmentos (800-1000) denominados proglótidos (Heath, 1982). Los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros, los proglótidos intermedios son sexualmente maduros y los terminales denominados grávidos están repletos de huevos (Verster, 1969). Los proglótidos maduros contienen los testículos y un ovario trilobulado (Cheng, 1986). Los proglótidos grávidos miden 7-12 mm de longitud y 5-6 mm de ancho, presentan un útero central con 7-12 ramificaciones de cada lado y contienen aproximadamente 50 000 huevos. Éstos proglótidos se desprenden cada 62-72 días y son liberados con las heces. Al romperse los proglótidos se liberan los huevos al ambiente y contaminan el agua, el suelo y los alimentos (Asada, et al., 1956).



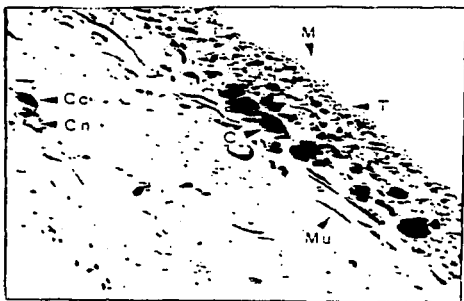
**Figura 1.** Ciclo de vida de la *Taenia solium*. A: adulto, P: proglótido maduro H: huevo y M:metacéstodo, (Flisser, 1990).

Los huevos son de forma esférica, miden de 31 a 45  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentan un vitelo, un embrióforo denso estriado con una membrana interna y contienen a la oncosfera o embrión hexacanto con tres pares de ganchos (LaClette, et al., 1982). Si los huevos son ingeridos por el hombre o el cerdo, éstos le producirán la enfermedad llamada cisticercosis. Siguiendo a la ingestión, la oncosfera eclosiona y penetra la pared del intestino delgado, entrando al torrente sanguíneo para establecerse en diferentes tejidos del hospedero como en el subcutáneo, corazón, músculo esquelético, sistema nervioso central y los ojos. Los metacéstodos llegan a ser visibles aproximadamente dos meses después de la infección. El metacéstodo puede sobrevivir por varios años en los tejidos del hospedero intermediario (Hird y Pullen, 1979). Está formado por una vesícula translúcida ovoide de 0.5-2 cm de diámetro y llena de un líquido llamado fluido vesicular. La superficie de la pared vesicular de los metacéstodos está cubierta de microtricas (Ramírez-Bon, et al., 1982) y es a través de ésta que ocurre el intercambio metabólico entre el hospedero y el parásito (Figura 2). Asimismo, si el hombre ingiere metacéstodos viables evaginarán y se unirán a la pared del intestino delgado por medio del escólex y se desarrollarán en adultos (Flisser, 1988).

Cabe mencionar que los humanos con cisticercosis no participan en el mantenimiento del ciclo de vida del parásito y son por lo tanto hospederos intermediarios accidentales.

### **3. IMPORTANCIA DE LA TENIOSIS/CISTICERCOSIS**

Cuando los metacéstodos se localizan en el sistema nervioso central afectan la salud del individuo y pueden producirle incluso, la muerte (Lombardo, et al., 1982; Sotelo, et al., 1985). La incidencia clínica de neurocisticercosis en México alcanza hasta 7%, mientras la prevalencia en autopsias tiene un intervalo de 0.4 a 3.6% en varios países de Latinoamérica (incluido México), Asia y África (Lombardo, et al., 1982; Larralde, et al., 1992). Los casos de cisticercosis reportados recientemente en Estados Unidos se deben generalmente a individuos inmigrantes (Flisser, 1988).



**Figura 2.** Micrografía óptica de *Taenia solium*. Corte de la pared vesicular del metacéstodo: M: microtricas, T: tegumento, C: citones subtegumentales, Mu: músculo, Cn: canal y Cc: célula formadora del canal (Landa, 1992).

Además de la importancia en Salud, la neurocisticercosis también tiene importancia socioeconómica porque el 75% de los pacientes con neurocisticercosis están en edad productiva y generalmente no pueden trabajar por la sintomatología que presentan. Los costos para el cuidado médico, tales como hospitalización, quimioterapia, neurocirugía y tomografía axial computarizada, son muy elevados, en 1986 se gastaron en México 14.5 millones de dólares para tratar a 2,700 casos nuevos de neurocisticercosis (Velasco-Suárez, et al., 1982; Flisser, 1988). La cisticercosis porcina es también considerada como un problema económico, debido a las grandes pérdidas económicas por la eliminación de la carne de los cerdos infectados (Acevedo, 1989).

En cuanto a la teniosis, se han realizado pocos estudios que muestren el nivel de prevalencia de esta enfermedad. En un estudio epidemiológico realizado en una comunidad de Sinaloa en México, se encontró 12% de seropositividad global, que aumentó a 50% en los familiares y otros individuos que viven cerca de los individuos portadores de *T. solium* adulta (Díaz-Camacho, et al., 1989, Sarti, et al., 1992). Sin embargo, la importancia de la teniosis radica en que el portador del gusano está continuamente liberando huevos al ambiente.

#### 4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las principales manifestaciones de la cisticercosis dependen, no sólo del número y localización de los parásitos, sino también, de la respuesta inflamatoria inducida por ellos, así como de la condición del hospedero. Cuando los cisticercos se localizan en el sistema nervioso central, la sintomatología no es específica, pero se asocia principalmente con hipertensión intracraneal y convulsiones (Sotelo, et al., 1985).

Los metacéstodos en el cerebro tienen una morfología variable, pueden tener una forma del tipo celuloso, que causa ligera inflamación alrededor del tejido, o una forma del tipo racemoso, que causa inflamación considerable. Los metacéstodos pueden ser clasificados como visibles, hialinizados, calcificados o necróticos (Flisser, 1988).

Por otro lado, la teniosis no produce síntomas, o los síntomas que se producen son: insomnio, anorexia, pérdida de peso y trastornos abdominales ligeros (Soulsby y Lloyd, 1982).

En cuanto a la cisticercosis en los cerdos que presentan grandes cargas parasitarias no parecen mostrar signos neurológicos por la enfermedad (Flisser, 1988).

## 5. DIAGNÓSTICO

Para diagnosticar la cisticercosis humana se han utilizado métodos inmunológicos como el ensayo inmunológico ELISA, la inmunoelectrotransferencia, la inmunoelectroforesis, la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta y la fijación del complemento (Nieto, 1956; Rydzewski, et al., 1975; Miller, et al., 1984; Mohammad, et al., 1984; Flisser, et al., 1990). También se han utilizado métodos como la resonancia magnética nuclear (Creasy y Alarcón, 1994) y la tomografía axial computarizada (García, et al., 1994) con muy buenos resultados. Con una combinación de ambos métodos se logra hacer el diagnóstico clínico.

Los estudios con el método de ELISA reportaron una sensibilidad entre 70-100% en el suero y fluido cerebroespinal (Schantz, et al., 1980; Diwan, et al., 1982; Grogl, et al., 1985; Corona, et al., 1986; Larralde, et al., 1986; Nascimento, et al., 1987; Larralde, et al., 1990). Otros estudios, en los que se aplicó la técnica de inmunoelectrotransferencia como prueba diagnóstica, han demostrado que existen dos polipéptidos específicos de *T. solium*, uno de 8 y otro de 26 kDa que mostraron 100% de especificidad (Gottstein, et al., 1986; Gottstein, et al., 1987). Asimismo, utilizando la misma técnica con una fracción compuesta de siete antígenos glicoproteicos purificados con la lectina de lenteja, se reportó una sensibilidad de 98% y una especificidad de 100% (Tsang, et al., 1989). Al ser evaluada con el ELISA, la proteína GP24, una de las 7 glicoproteínas antes mencionadas, presentó una especificidad del 99.9% (Plancarte, et al., 1994).

Existen también, técnicas que detectan antígenos de *T. solium* en el suero y fluido cerebroespinal de los pacientes con cisticercosis. A este respecto, se han reportado métodos que presentan una sensibilidad que oscila entre 70-90% (Tellez-Girón, et al., 1987; Correa, et al., 1989; Wang, et al., 1992). Asimismo, se ha reportado la detección de cisticercos vivos en los individuos infectados utilizando ELISA y anticuerpos monoclonales específicos en contra de los epítomos más frecuentes de las glicoproteínas de superficie de *T. saginata* (Harrison y Parkhouse, 1989).



La cisticercosis en los cerdos se diagnostica rutinariamente en los rastros mediante el corte del músculo tríceps/ancóneo (Contreras, 1989). Se ha reportado un método, que utiliza la inmunoelectrotransferencia y la fracción glicoproteica reportada por Tsang, que muestra una sensibilidad y especificidad del 100% (Torres, 1990).

En cuanto a la teniosis por *T. solium*, no se han encontrado procedimientos que la diagnostiquen fácilmente (Ash y Orihel, 1987). Por ejemplo, los métodos que existen para la detección de los huevos de *T. solium* en las heces del humano, sólo tienen una sensibilidad cercana al 50% (Schantz y Sarti, 1989). Una dificultad para el diagnóstico de la teniosis, es que los seres humanos pueden alojar tanto a la *T. solium* como a la *T. saginata*, cuyos proglótidos y huevos son difíciles de diferenciar entre sí. Por otro lado, se han propuesto también, métodos inmunológicos para la detección de los antígenos de la *T. solium* adulta en las heces. Sin embargo, su utilidad es relativa debido a las reacciones cruzadas con *T. saginata* y otros helmintos (Allan y Craig, 1989; Allan, et al., 1990). Además se ha sugerido una prueba de ELISA, que utiliza los anticuerpos contra el adulto de *T. solium*, que detecta los antígenos en las heces de los humanos, y es 99% específica (Allan, et al., 1993).

Se requiere desarrollar métodos más sensibles, específicos, rápidos y de uso más amplio, para definir las áreas endémicas, detectar a los animales infectados que van a ser sacrificados en los rastros y a los portadores de la *Taenia* adulta, así como para diferenciar la *T. solium* de la *T. saginata* (Landa, 1992). En los últimos años, se han desarrollado nuevos métodos para el diagnóstico de la teniosis/cisticercosis, combinando el uso de: a) métodos inmunológicos con proteínas recombinantes y b) métodos que involucran sondas específicas de DNA. Las técnicas de DNA recombinante han permitido la identificación y expresión de varios genes que codifican para unos antígenos específicos de los tenidos parásitos que están siendo evaluados en el diagnóstico (Howell, et al., 1989; Johnson, et al., 1989; McManus, et al., 1989; Cogle, et al., 1991; Fischer, et al., 1994). Finalmente, se han utilizado sondas específicas de DNA que pueden distinguir a la *T. solium* de la *T. saginata* y de otros tenidos (Harrison, et al., 1987; Harrison, et al., 1988; Rishi y McManus, 1988).

## 6. VACUNACIÓN Y PROTECCIÓN

Se ha demostrado que para la cisticercosis se puede inducir resistencia a la infección, a través de distintos procedimientos: por infección previa (inmunidad concomitante) o bien por inmunización con extractos parasitarios (Gallie y Sewell, 1972; Gallie y Sewell, 1974; Gallie y Sewell, 1976; Lloyd y Soulsby, 1976; Gallie y Sewell, 1981; Rickard y Brumley, 1981). Los estudios de protección por transferencia pasiva del suero inmune indican

que los anticuerpos juegan un papel definitivo en la inmunidad y que con ellos la oncosfera puede ser destruida (Sutton, 1979; Rickard, et al., 1977; Soulsby y Lloyd, 1982; Lloyd y Soulsby, 1976; Sutton, 1979, Molinari, et al., 1983a).

Aunque las oncosferas invasivas son consideradas el blanco de la respuesta inmune protectora, se pueden utilizar algunos componentes de los cisticercos para vacunar los cerdos en contra de la infección causada por *T. solium* (Molinari, et al., 1983a; Molinari, et al., 1983b). Se han utilizado extractos de proglótidos del adulto de *T. saginata* y de metacéstodos de *T. solium* que han mostrado diferente grado de protección en contra de la infección causada por estas tenias (Gallie, et al., 1981; Molinari, et al., 1983b; Molinari, et al., 1986; Molinari, et al., 1988; Molinari, et al., 1993a; Molinari, et al., 1993b).

Los ensayos de vacunación que usan proteínas recombinantes de la oncosfera y oncosferas no viables, resultan ser eficientes para proteger las ratas contra la infección de *T. taeniaeformis* (Ito, et al., 1991, Ito, et al., 1994a). También, se ha logrado probar que los extractos totales de *T. crassiceps* y *T. solium* inducen una protección, hasta de un 62% en los ratones, contra la cisticercosis causada por *T. crassiceps* (Sciutto, et al., 1990). Se han realizado ensayos de protección empleando tres proteínas purificadas (56, 66 y 74 kDa) de *T. crassiceps* que protegen en un 74.5% a los ratones en contra de *T. crassiceps* (Valdez, et al., 1994). También se observa que existe una protección cruzada contra *T. taeniaeformis* en las ratas vacunadas con oncosferas no viables de *Taenia* asiática (Ito, et al., 1994b). Asimismo, unos extractos totales de *T. crassiceps* protegen a los cerdos contra la cisticercosis causada por *T. solium*. (Sciutto, et al., 1995). Finalmente, se ha producido un antígeno recombinante que confiere una protección del 94% en contra de la infección en ovejas causada por el parásito *Taenia ovis* (Lightowlers y Rickard, 1993; Harrison, et al., 1993).

## 7. TRATAMIENTO Y CONTROL

El tratamiento de la neurocisticercosis humana depende de la abundancia, la localización y el estado del parásito en el cerebro, así como de las diferentes manifestaciones clínicas que presenta el paciente. Por ejemplo las convulsiones, una de las principales manifestaciones clínicas, son tratadas con drogas anticonvulsivas, como la Epamina, y con esteroides, que ayudan a disminuir la inflamación. Para el caso de la hipertensión intracraneal se requiere la intervención quirúrgica para extraer los cisticercos o para drenar el fluido cerebroespinal (Sotelo, et al., 1984). Con respecto a las drogas antihelmínticas, se han usado varias, pero el praziquantel ha demostrado ser el más efectivo, ya que la neurocisticercosis en el hombre puede ser controlada con una dosis única (2 ¼ o 5 mg/Kg) (Pawlowski, 1991). Otra droga que se utiliza con éxito en algunos casos de neurocisticercosis es el Albendazol administrado en dosis de 15 mg/Kg de peso/día durante 30 días (Chotmongkol, 1993; Sanchetec, et al., 1994). La quimioterapia de la teniosis humana es altamente eficiente y segura, ya que una dosis de praziquantel de 10 mg/kg presenta una eficiencia del 100% (Espejo, 1977).

Por otro lado, los resultados obtenidos de un estudio en el que se usó el praziquantel en unos cerdos con cisticercosis, sugirió que estos pueden ser tratados y curados con drogas cestocidas (Torres, 1990).

En México, como en otros países en desarrollo, las condiciones que favorecen la transmisión de la cisticercosis/teniosis persisten. La falta de una red de drenajes y de adecuadas medidas sanitarias en los poblados y ciudades, así como la crianza de cerdos inadecuada y una mala inspección sanitaria en los rastros, permite la propagación de la enfermedad. Más del 40% de los cerdos que se consumen en México provienen de áreas en donde el saneamiento es deficiente y la inspección de la carne es inadecuada o no existe (Aluja, 1982). A continuación se mencionan algunas medidas sanitarias y de intervención tendientes a erradicar la cisticercosis/teniosis.

### a) Medidas sanitarias:

Difundir la información referente al ciclo de vida de la *T. solium*; enseñar a la gente a identificar al parásito; terminar con la defecación al aire libre; lavarse las manos antes de comer y cocinar; lavar los vegetales; no comer carne de cerdo cruda o mal cocida y no inspeccionada.

**b) Medidas de intervención:**

Realizar encuestas epidemiológicas para detectar las zonas de riesgo, dar quimioterapia teniocida a los portadores, mejorar las estrategias en la crianza de los cerdos, continuar los esfuerzos en la investigación para el desarrollo de vacunas y drogas antihelmínticas. La vacunación es un recurso muy eficiente, ya que se ha demostrado en otros céstodos, que previene la transmisión o la reinfección, y es tal vez el recurso más realista para los países en desarrollo. Establecer planes de acción para el control, erradicación y vigilancia de la cisticercosis/teniosis a nivel nacional (Flisser, 1988; Landa, 1988; Keilbach, et al., 1989).

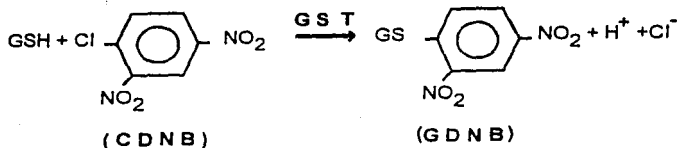
## II. ANTECEDENTES

### 1. GENERALIDADES DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA

Las glutatión S-transferasas son isoenzimas solubles o unidas a membranas que se encuentran en los organismos eucariotos, desde protistas hasta plantas y animales. Las formas solubles se presentan como homodímeros o heterodímeros y se ha sugerido que las de membranas son tetrámeros (Mannervik, 1985; Mannervik y Danielson, 1988). Las GST's son proteínas multifuncionales que catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutatión con una multitud de sustratos electrofílicos. En esta reacción, el átomo de azufre del glutatión provee los electrones para la reducción del sustrato (Figura 3). Así, el compuesto conjugado al glutatión puede ser excretado por la vía del ácido mercaptúrico, el cual es un producto clásico de excreción de varios xenobióticos (Hillyer, et al., 1992).

#### a) Las Glutatión S-transferasas de mamíferos

Las GST's de mamíferos también pueden funcionar como proteínas que unen de manera no covalente, una amplia gama de ligandos hidrofóbicos (Ketterer, et al., 1989). Pueden detoxificar los derivados de compuestos tóxicos exógenos (xenobióticos) y endógenos (endobióticos), incluyendo los compuestos secundarios de la peroxidación de lípidos, mutágenos, carcinógenos y otras sustancias químicas nocivas (Ketterer, et al., 1989; Mannervik, et al., 1985; Mannervik, 1985). Muchas GST's tienen funciones endógenas más específicas en el metabolismo, tal como su participación en la síntesis de leucotrienos/prostaglandinas y como proteínas de transporte para ligandos como el hemo, los esteroides y ácidos biliares.



**Figura 3.** Reacción que cataliza la enzima glutatión S-transferasa (GST). Glutatión (GSH), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) y 1-glutatión-2,4-dinitrobenceno (GDNB).

La expresión de las GST's difiere de un tejido a otro y puede cambiar por inducción con alguna droga. Varias evidencias sugieren que las GST's están involucradas en la resistencia a las drogas, como las de la quimioterapia del cáncer (Mannervik y Danielson, 1988).

Los pesos moleculares de las subunidades de GST's solubles en mamíferos varían entre 23 y 26 kDa, aunque también se ha descrito una forma soluble de 13 kDa en hígado de rata (Blocki, et al., 1992).

Numerosos compuestos electrofílicos pueden servir como sustratos para las GST's, aunque muchos no tienen relevancia biológica, ya que no son los sustratos naturales. El sustrato más importante para la demostración de las diferentes formas de GST's es el 1-Cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), pues es un sustrato que conjugan todas las GST's (Figura 3). La diferente actividad que presentan con varios sustratos e inhibidores, ha permitido hacer una clasificación de las GST's solubles de los mamíferos. Se han clasificado en cuatro clases: 1) Alfa, las que son activas con hidróperóxido de cumeno, presentando un rango de 3-12  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ . Esta reacción representa la actividad de glutatión-peroxidasa que es independiente de selenio, 2) Mu, las que tienen una alta actividad con epóxidos como el trans-4-fenil-3-buteno-2-uno (0.04-1.2  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) y una actividad de glutatión peroxidasa independiente de selenio en un rango de 0.1-0.7  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ , 3) Pi, las que muestran gran actividad con ácido etacrínico (0.9-4  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) y una actividad con hidróperóxido de cumeno de 0.03-0.14  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  y 4) Teta, las que tienen actividad de deshalogenasa con el sustrato diclorometano y no presentan actividad de glutatión peroxidasa independiente de selenio (Mannervik, et al., 1985; Mannervik y Danielson, 1988; Pemble y Taylor, 1992; Pemble, et al., 1994;).

#### **b) Las Glutatión S-transferasas de helmintos**

Hay actividad de GST en todos los helmintos adultos analizados usando como sustrato al CDNB (Brophy y Barrett, 1990). Los helmintos expresan más GST soluble que microsomal y se propone que la GST puede ser secretada por el organismo (Brophy, Brown y Pritchard, 1994a). En *Schistosoma mansoni* GST's de 28 kDa son exportadas a la superficie del parásito y se sugiere que su síntesis se realiza en células protonefridiales (Balloul, et al., 1987). Un estudio inmunológico mostró la presencia de la GST Sj26 en el suero de unos individuos infectados (Davern, et al., 1990). La GST

en *Onchocerca volvulus* parece tener características de enzima secretada (Liebau, et al., 1994b). En *Fasciola hepatica*, la GST está asociada a la lamela del epitelio intestinal, el parénquima, el tegumento y el tejido muscular (Pannaccio, et al., 1992; Creaney, et al., 1995). En *Schistosoma mansoni*, la GST Sm26 y la Sm28 se encuentran en el tegumento y/o en los tejidos subtegumentales (Trottein, et al., 1990; Taylor, et al., 1988), aunque otro grupo de investigadores reporta que la GST no está en el tegumento de *Schistosoma* (Holy, et al., 1989). En el céstodo *Echinococcus granulosus*, la GST de 24 kDa está presente en el parénquima (Fernández y Hormaeche, 1994). En el nemátodo *Ascaris lumbricoides* se detectó actividad de la GST en el tejido muscular e intestino (Douch y Buchanan, 1978).

Se han purificado varias GST's de helmintos por cromatografía de afinidad con GSH-agarosa, por ejemplo, de *Dirofilaria immitis*, *Brugia pahangi* (Jaffe y Lambert, 1986), *Onchocerca gutturosa* (Pemberton y Barrett, 1989), *Onchocerca volvulus* (Liebau, et al., 1994b), *Heligmosomoides polygyrus* (Brophy, Brown y Pritchard, 1994b), *Schistosoma japonicum* (Smith, et al., 1986), y *Echinococcus granulosus* (Fernández y Hormaeche, 1994).

Las isoenzimas de GST de los digéneos *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica* y los céstodos *Schistocephalus solidus* y *Moniezia expansa* se han separado por cromatografía de intercambio iónico (O'Leary y Tracy, 1988; Taylor, et al., 1988; Brophy, et al., 1989a; Brophy, et al., 1989b). Las evidencias preliminares indican que la actividad de GST en los céstodos como *E. granulosus* (Morello, et al., 1982) e *Hymenolepis diminuta* (Brophy y Barrett, 1990) puede ser inducida por drogas como el fenobarbital.

Las GST's de los helmintos en general son inhibidas como las GST's de mamíferos, aunque las GST's de los céstodos y las de *S. mansoni* son relativamente más sensibles a la inhibición con azul de cianocron y clorotrifeniltin (Brophy y Barrett, 1990).

Se ha propuesto que las GST's son uno de los principales sistemas de detoxificación en helmintos y que tienen un potencial para neutralizar los derivados de las toxinas exógenas como los antihelmínticos. Por ejemplo el metrifonato, el cual se ha demostrado que es metabolizado por una GST de *S. mansoni* (O'Leary y Tracy, 1991).

Varios xenobióticos inducen la síntesis del RNAm que codifica para la GST e incrementan la actividad específica de la enzima en *S. mansoni* (Vandewaa, et al., 1993). Asimismo, en *Haemonchus contortus*, el aumento de la actividad de la GST se relaciona con la resistencia a las drogas (Kawalek, et al., 1984). Las GST's son un blanco potencial para la producción de drogas antihelminéticas, ya que se encuentran en varias etapas del desarrollo de los helmintos. Además, se sugiere que la GST participa en la protección de las células del parásito, contra la peroxidación de los lípidos producida por la respuesta inmune. Por tal razón, la inhibición de la GST de los parásitos ofrece la posibilidad de una mejor terapéutica al combinar inmuno y quimioterapia en contra de los parásitos (Brophy y Barrett, 1990).

Además, se propone que las GST's de *Schistosoma* son buenos candidatos para hacer vacunas en contra de la esquistosomiasis en varias especies de hospederos. Por ejemplo, se ha probado que la GST de 28kDa nativa, una GST recombinante, así como el péptido carboxilo y el péptido N-terminal, en diferentes hospederos han adquirido un 20-72% de protección. La inmunización de ratones de la cepa WEH1 129/J con la GST de 26 kDa recombinante de *S. japonicum*, produjo un 30% de protección (Smith, et al., 1986; Balloul, et al., 1987; Taylor, et al., 1988; Auriault, et al., 1990; Wright, et al., 1991; Bushara, et al., 1993; Xu, et al., 1993; Caprón, 1994). También inmunizaciones con las GST's de *Fasciola hepatica* produjeron un 57% de protección en ovejas (Sexton, et al., 1990; Hillyer, et al., 1992; Miller, et al., 1993; Sexton, et al., 1994). En nemátodos, como es el caso de *Haemonchus contortus* la inmunización con la GST no es protectora para el cerdo (Sharp, et al., 1991).

Como las GST's de mamíferos las GST's de helmintos se clasifican en 3 superfamilias. La superfamilia 1, que incluye a las GST's de 28 kDa de *Schistosoma*; la superfamilia 2, que comprende las GST's de 26 kDa de *Schistosoma*, de *Fasciola hepatica* 26/26.5 y de céstodos, como *Moniezia expansa* y *Schistocephalus solidus* y la tercera superfamilia, que incluye a las GST's expresadas por nemátodos parásitos.



Las subunidades de las GST en los céstodos tienen un peso molecular de 24-25 kDa. En general, éstas muestran una actividad significativa sólo con un sustrato utilizado por las GST's de mamíferos, que es el trans-4-fenil-3-buten-2-uno (Brophy y Barrett, 1990). La GST de *E. granulosus* tiene parecido bioquímico con las GST's de la clase Mu de mamíferos (Fernandez y Hormaeche, 1994).

Los Tremátodos digeneos tienen las 2 familias principales de las GST's, la superfamilia 2, que incluye a las GST's de 26 kDa y la superfamilia 1, que es la mayoritaria y que comprende a las de 28 kDa. Además, *Schistosoma mansoni* presenta una tercera familia con las propiedades de la clase teta de mamíferos, pues no se une al glutatión y reacciona pobremente con el CDNB (O'Leary y Tracy, 1991; O'Leary, et al., 1992). Las GST's de *Schistosoma japonicum* (Sj28) y la de *Schistosoma mansoni* (Sm28) presentan un 75% de homología entre sí y las Sm26 y Sj26 un 80% de homología. Un análisis de las secuencias de las GST's de *Schistosoma*, muestra que Sm28/Sj28 son blancos de la respuesta inmune del hospedero y la secuencia amino terminal de estas GST's cambia relativamente rápido, ofreciendo diferentes epítotos al hospedero (Hughes, 1993).

Las GST's Sm28 y Sj28 se parecen en actividad a las GST's clase Alfa, Mu y Pi de mamíferos (Taylor, et al., 1988, Walker, et al., 1993). Además, las GST's de *S. japonicum* (Sj26), *S. mansoni* (Sm26) y las de *Fasciola hepatica* 26/26.5 presentan 55% y 40% de homología, respectivamente con la clase Mu de mamíferos (Trottein, et al., 1990). Se han clonado y caracterizado varias GST's de *Schistosoma* y *F. hepatica* de la superfamilia 1 y 2 (Tiu, et al., 1988; Brophy y Barrett, 1990; Brophy, Crowley y Barrett, 1990; Pannaccio, et al., 1992; Trottein, et al., 1992; McNair, et al., 1993). En *F. hepatica* se han purificado siete formas de GST a partir de extractos crudos (Brophy y Barrett, 1990; Pannaccio, et al., 1992) y se han clasificado en GST's de "alta" y "baja" afinidad al glutatión. Sin embargo, cinco de estas GST's solubles de *F. hepatica* no pueden ser clasificadas bioquímicamente dentro de las clases específicas de mamíferos (Brophy y Barrett, 1990).

Por otro lado, las GST's Sm28 y Sj26 se han cristalizado y determinado su estructura cristalina (McTigue, et al., 1995). La inactivación completa de la Sj26 recombinante, mediante la modificación de seis residuos de histidina, sugiere que un residuo de histidina cercano al sitio activo es crítico para la actividad (Walker, et al., 1995).

Las GST's de los nemátodos tienen un peso molecular entre 22.5-36 kDa. Se han reportado GST's en *Heligmosomoides polygyrus* y *Ascaris suum*. Datos de secuencia amino terminal de éstas, así como ensayos bioquímicos muestran que su actividad es de la clase alfa (Brophy, et al., 1994a; Brophy, et al., 1994b; Liebau, et al., 1994a; Brophy, et al., 1995). Finalmente, la GST de *Onchocerca volvulus* tienen un parecido bioquímico con las GST's de la clase Pi de mamíferos (Salinas, et al., 1994).

### III. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue purificar, localizar y caracterizar bioquímicamente la enzima GST de *Taenia solium*.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 1. MATERIALES BIOLÓGICOS:

a) **Parásitos:** Los metacéstodos o cisticercos de *Taenia solium* se obtuvieron por disección del músculo esquelético de los cerdos infectados y los cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF de la cavidad peritoneal de los ratones de la cepa Balb/c infectados. Otros parásitos y tejidos utilizados fueron los gusanos adultos de *T. solium*, *T. taeniaeformis*, *T. saginata*, *Schistosoma mansoni* e hígado de cerdo, que nos fueron proporcionados por diferentes investigadores. Los cisticercos y otros tejidos se lavaron con PBS y almacenaron a  $-70^{\circ}$  C. Los metacéstodos utilizados en los ensayos de inmunolocalización se colectaron, lavaron en PBS y se incluyeron inmediatamente en Tissue Tek a  $-70^{\circ}$ C.

b) **Enzimas:** Las GST's de hígado de bovino y de conejo, la glutatión peroxidasa (GPx) de eritrocitos de bovino y la Glutatión reductasa, se compraron en Sigma Chemical Co.

##### 2. REACTIVOS:

La columna de GSH-sefarosa 4B se compró a Pharmacia Inc. Las membranas de nitrocelulosa de  $0.45 \mu\text{M}$  fueron de Millipore Corp; el adyuvante completo e incompleto de Freund de GIBCO-BRL; el anticuerpo anti IgG de conejo unido a peroxidasa de ZYMED; el clorotrifeníltín, el 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) y el 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano de Aldrich Chem. Comp. Inc; la acrilamida, glicina, 2-mercaptoetanol, Coomassie G-250 y otros reactivos para la electroforesis de la casa Bio-Rad Laboratories.

Los reactivos Tritón X-100, EDTA, Tris, ácido clorhídrico, sulfato de amonio, 3,3' diaminobencidina (DAB), Tween-20, cloruro de sodio, Tissue Tek, albúmina sérica bovina (BSA), glicerol, fosfato dibásico y monobásico de sodio, NADPH, fosfato de potasio, peróxido de hidrógeno, hidroperóxido de terbutilo, verde de indocianina, ácido etacrínico, glutatión (GSH), hidróxido de aluminio, acetona, los inhibidores de proteasas: Aprotinina, TLCK, Leupeptina, PMSF y el anticuerpo anti IgG de conejo-FITC fueron de la marca Sigma Chemical Co.

Todos los demás reactivos utilizados en esta tesis fueron de la mejor calidad disponible en el mercado.

### 3. MÉTODOS:

#### a) Preparación de los extractos crudos:

i) Con PBS-Tritón 1%-EDTA 0.5 mM, pH 7.4: Aproximadamente 10 g de cada uno de los diferentes parásitos, así como 10 g de hígado de cerdo se descongelaron rápidamente y homogeneizaron en 50 ml de amortiguador de extracción (PBS, pH 7.4 conteniendo: 1% de Tritón X-100 y 0.5 mM de EDTA) en un polytrón (Brinkmann Instruments) a máxima velocidad durante un minuto por tres veces en hielo. Se centrifugó el homogeneizado a 40,000 xg durante 15 min en una ultracentrífuga TL-100 de Beckman y el sobrenadante se utilizó para la purificación de la GST. Los extractos de *T. solium* y *T. crassiceps* preparados de esta manera se denominaron EC-s y EC-c, respectivamente.

ii) Con PBS-NaCl 0.35 M, pH 7.4: Metacéstodos de *T. solium* (10 g) se trataron como arriba, con la diferencia de que la homogeneización se llevó a cabo en un amortiguador de extracción de PBS conteniendo: 0.35 M NaCl, 25 µg/ml de Aprotinina, 0.1 mM de TLCK, 2.5 mM de EDTA, 25 µg/ml de Leupeptina, 12 mM de 2-mercaptoetanol y 0.006% de PMSF. El sobrenadante se dializó contra amortiguador de PBS, se hicieron alicuotas y se congelaron a -20°C, hasta su uso. Este extracto se denominó ECI-s.

#### b) Purificación de la Glutación S-transferasa:

Aproximadamente siete ml de extracto preparado con Tritón X-100 a una concentración de -5 mg/ml se pasaron através de una columna de GSH-sefarosa 4B con un volumen de 2 ml. Después de pasado el extracto, la columna se lavó con 20 ml de amortiguador de PBS. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con 10 ml del amortiguador de elución (glutación 5 mM en tris/HCl 50 mM, pH 8.0). Se colectaron fracciones de 2 ml y se les midió absorbencia a 280 nm en un espectrofotómetro (Modelo Pye Unicam PU 8600, marca Philips). La fracción eluida se dializó contra PBS y concentró por liofilización hasta obtener una concentración de 2-4 mg/ml.

#### c) Determinación de la concentración de proteínas:

Las determinaciones de proteínas de todas las fracciones se realizaron por los métodos de Lowry modificado de Hartree y de Bradford (Lowry, et al., 1951; Bradford, 1976).

**d) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio:**

La composición polipeptídica de todas las fracciones fue resuelta en geles reducidos de placa al 12.5% (Laemmli, 1970). Se utilizaron 10-15 µg de muestra por carril. Los geles se tificaron con azul brillante de Coomassie G-250. Las proteínas BSA (68 Kda), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), beta-lactoglobulina (18 kDa) y lisosima (14 kDa) se usaron como estándares de peso molecular.

**e) Preparación de suero anti-Glutatión S-transferasa de *Taenia solium*:**

Un Conejo Nueva Zelanda de 2 meses de edad, se inmunizó por vía subcutánea con 500 µg de GST-s en PBS, mezclada con adyuvante completo de Freund (v/v). El conejo se inmunizó tres veces cada dos semanas con 100 µg de GST-s, mezclada con adyuvante incompleto de Freund (v/v). Una semana después de la segunda inmunización el conejo se sangró para determinar la respuesta de anticuerpos en contra de la GST-s, por medio de inmunolectrotransferencia (IET). Finalmente, una semana después de la tercera inmunización, el conejo se sangró por punción cardiaca. La sangre se dejó coagular y el suero se recuperó centrifugando a 1,800 xg.

**f) Preparación de anticuerpos específicos anti-Glutatión S-transferasa de *Taenia solium*:**

Las membranas de nitrocelulosa conteniendo aproximadamente 1 mg de GST-s se incubaron con 5 ml de suero anti-GST-s diluido 1:50 con PBS-Tween 20 al 0.3%, toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con 5 ml por 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.3%. Los anticuerpos adsorbidos se eluyeron con 0.5 ml de una solución de glicina 0.1 M y cloruro de sodio 0.15 M, pH 2.6. La fracción eluida se neutralizó inmediatamente con 1.3 ml de PBS 10 X, pH 7.4. Los anticuerpos eluidos se dializaron contra PBS y concentraron por liofilización. Los anticuerpos se resuspendieron a una concentración de 0.4 mg/ml y su especificidad probada por IET. Estos anticuerpos específicos anti-GST-s se utilizaron para los ensayos de localización (Sambrook, et al., 1989).

**g) Inmunolectrotransferencia:**

Los SDS-PAGE al 12.5% conteniendo 10-15  $\mu\text{g}$  de cada fracción por carril, se transfirieron por 1 h a 5 mA por  $\text{cm}^2$  de gel a membranas de nitrocelulosa (NC), utilizando una cámara de transferencia semi-seca (Modelo Trans blot SD de Bio-Rad Laboratories). Las membranas de NC se incubaron 1 h con anticuerpos anti-GST-s diluidos 1:500 en PBS-Tween 20 al 0.3% y leche semidescremada Svelty de Nestle al 5%. Las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.3% por tres veces, 5 minutos cada vez. Después de este lavado las membranas se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo hecho en cabra, acoplado a peroxidasa diluido 1:2,000 en PBS-Tween 20 al 0.3%. Finalmente las membranas se revelaron con una solución conteniendo 20 mg de DAB, 3  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% en 100 ml de PBS. La reacción enzimática se detuvo lavando repetidamente con agua destilada (Towbin, et al., 1979).

**h) Inmunofluorescencia indirecta:**

Los metacéstodos de *T. solium* incluidos en Tissue-Tek, se utilizaron para hacer cortes de 6-8  $\mu\text{m}$  con un crióstato (Modelo Cryo-cut de American Optical Corp.). Los cortes se fijaron en acetona por 10 min a 4°C y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Se incubaron con anticuerpos específicos anti-GST-s con una concentración de 0.4 mg/ml en PBS-BSA 1%, Tween 20 al 0.05%, durante toda la noche, a 4°C en una cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.05% por 10 min 4 veces con agitación suave e incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo hecho en cabra acoplado a FITC diluido 1:50, durante 1 h a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados en condiciones idénticas al primer anticuerpo y se montaron en glicerol:PBS (9:1). Al final, se observaron y fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia (Modelo Optiphot, marca Nikon). Como control negativo se empleó una fracción de IgG de conejo normal (Weller, 1954; Thompson, 1977; Balloul, et al., 1987).

**i) Ensayo de actividad de Glutación peroxidasa:**

La actividad de GPx dependiente e independiente de selenio, se midió utilizando  $-2 \mu\text{g}$  de la GST-s. Se incubó la GST-s en un ml de amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, EDTA 1 mM a pH 7.7, con azida de sodio 1 mM, NADPH 0.15 mM, GSH-Reductasa 0.25 U, GSH 5 mM y peróxido de hidrógeno para medir la actividad dependiente de selenio. Con hidroperóxido de terbutilo se midió la actividad independiente de selenio. La concentración de ambos sustratos fue de 10-70 mM. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y se midió cada 8 seg a una longitud de onda de 340 nm ( $\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), en un espectrofotómetro (Beckman modelo C-650) durante un intervalo de 0-4 min. La GPx de eritrocitos de bovino  $2 \mu\text{g}$  se utilizó como estándar (Boveris, et al., 1994).

**j) Ensayo de actividad de Glutación S-transferasa:**

La actividad de GST se midió con  $5 \mu\text{g}$  de muestra de proteína pura y  $100 \mu\text{g}$  para extractos crudos en un volumen total de 1 ml de reacción, usando un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, con EDTA 1 mM pH 6.5 y diferentes concentraciones de glutación y segundos sustratos. Para el caso de 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) se emplearon concentraciones entre 0.5-3.0 mM, con una concentración de GSH de 1 mM, para el caso de ácido etacrínico las concentraciones fueron 0.05-1.0 mM, con una concentración de GSH de 0.25 mM y para el 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano las concentraciones fueron de 0.05-5 mM con una concentración de GSH 5 mM. Las reacciones se midieron a una longitud de onda de 340, 270 y 360 nm, respectivamente en un espectrofotómetro (Beckman modelo C 650). La actividad se midió por cambios en la absorbencia durante un intervalo de 0-1 min a  $25^\circ\text{C}$ . La mezcla de la reacción sin la enzima sirvió como blanco y la GST comercial de hígado de bovino como control positivo (Habig, et al., 1974; Habig y Jakoby, 1981).

**k) Ensayo de inhibición:**

Se mantuvieron las mismas condiciones que en el ensayo de actividad con CDBN. Los inhibidores fueron el verde de indocianina a una concentración de 0.1 mM y 20 nM (Ketley, et al., 1975) y el clorotrifeníltín a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  y a 0.01  $\mu\text{M}$  (Kalim y Mannervik, 1986).



Se calculó el  $I_{50}$  de cada inhibidor para las GST's mediante la fórmula:  $I_{50} = (1 + [S]/K_m) K_i$  en donde [S] es la concentración del inhibidor,  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten para el inhibidor y la  $K_i$  es la constante de inhibición. La  $K_i$  se calculó con la siguiente fórmula:  $K_i = [E][I]/[EI]$ , en donde [E] es la concentración de la enzima, [I] es la concentración del inhibidor y [EI] es la concentración del complejo enzima-inhibidor. Finalmente se determinaron los tipos de inhibición para cada inhibidor, a partir de gráficas de Lineweaver-Burk (Mannervik y Danielson, 1988).

#### 1) Ensayo de protección:

Se experimentó con 30 ratones hembras, de 4-6 semanas de edad de la cepa Balb/c, y se dividieron en 4 grupos de 6-7 ratones cada uno. Los ratones se inmunizaron 2 veces por vía subcutánea, con cada una de las proteínas, mezcladas con 2.5  $\mu$ g de hidróxido de aluminio. Los antígenos que se usaron para cada grupo fueron: Extracto de *T. solium* (ECI-s) 100  $\mu$ g; GST-s 10  $\mu$ g; GST-c 10  $\mu$ g y un grupo con hidróxido de aluminio 2.5  $\mu$ g como control negativo.

Los ratones se sangraron antes del inicio de las inmunizaciones y dos semanas después de la segunda inmunización. Dos semanas después de ésta inmunización, los ratones se infectaron intraperitonealmente con 10 cisticercos de *T. crassiceps* con un tamaño de 2-3 mm de la cepa ORF (Sciutto, et al., 1991). A las cuatro semanas de infección los ratones se sangraron y sacrificaron por dislocación cervical. La carga parasitaria de cada ratón se midió contando los metacéstodos recuperados de la cavidad peritoneal. Los resultados se analizaron estadísticamente para medir el porcentaje de protección. Se calculó la media ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar (S) del número de cisticercos obtenidos para cada grupo y la eficiencia de protección se evaluó con la siguiente fórmula:  $EP(\%) = [n \text{ en control} - (n \text{ en inmunizado})] / n \text{ en control}$ , donde n es igual a la media del número de cisticercos encontrados (Valdéz, et al, 1994).

Se estimó por IET la producción de anticuerpos en cada uno de los ratones antes y después de las inmunizaciones.

## V. RESULTADOS

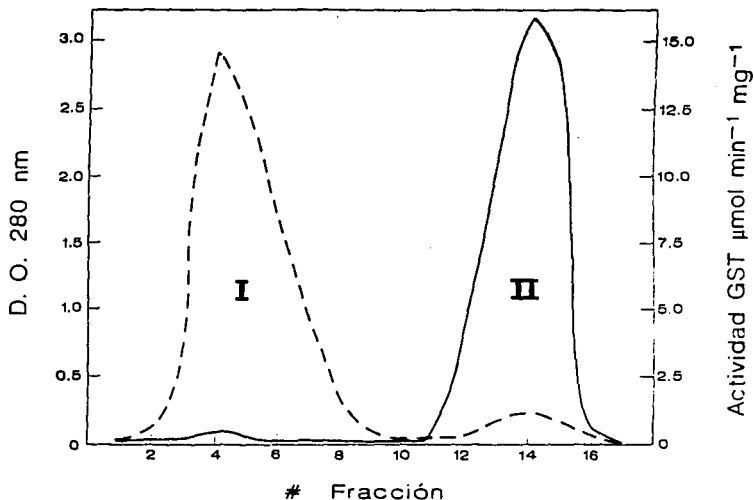
### 1. PURIFICACIÓN DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE *Taenia solium*:

La figura 4 muestra el perfil característico de la elución de un extracto crudo de *T. solium* (EC-s), pasado a través de la columna de GSH-sefariosa 4B. En él se midieron la absorbencia a 280 nm y la actividad de GST con CDNB. Considerando las medidas de absorbencia, se observa que el pico I (fracciones 1-10) tiene una mayor absorbencia (máximo 2.8) que el pico que forman las fracciones 11-17 (máximo 0.25), ésto era de esperarse pues en el pico I estaban todas las proteínas del extracto y en el pico de las fracciones 11-17 sólo estaba la GST-s. En cuanto a la actividad, se observa un comportamiento contrario al de la absorbencia, es decir, en el pico de las fracciones 1-10 hay poca actividad (máximo 0.34  $\mu$ molas/min mg) y en el pico II (fracciones 11-17) existió mayor actividad que alcanzó 16  $\mu$ molas/min mg. Es importante mencionar que la actividad del extracto EC-s medida antes de pasar por la columna, fue de 0.53  $\mu$  molas/min mg. Asimismo, se observa que el material eluido de la columna con glutatión (GSH) presentó un enriquecimiento de aproximadamente 30 veces en la actividad de GST en comparación con la actividad obtenida del extracto crudo antes de ser pasado por la columna.

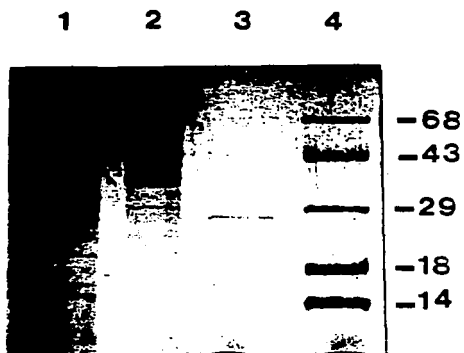
La figura 5 muestra los patrones electroforéticos en SDS-PAGE de las fracciones EC-s, EC-s pasado por la columna de GSH-sefariosa 4B y la fracción eluida con GSH. En los geles teñidos con azul brillante de Coomassie, se observa que el EC-s presenta más de 30 bandas diferentes con pesos moleculares que varían entre 10-200 kDa. En contraste, la fracción eluida con glutatión presentó una sola banda de alrededor de 26 kDa. La banda presente en la fracción eluida se denominó como la glutatión S-transferasa de *T. solium* (GST-s). Cabe mencionar que la GST-s constituye  $\approx$ 3% del total de las proteínas totales solubles del metacéstodo de este parásito.

### 2. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ESPECIFICOS ANTI-GLUTATIÓN S-TRANSFERASA DE *Taenia solium*:

Se utilizó la GST-s para producir un suero hiperinmune en conejo. La fracción de inmunoglobulinas (Ig's) anti-GST-s obtenida por precipitación con sulfato de amonio se usó para realizar una inmunoelectrotransferencia (IET) con las diferentes fracciones involucradas en la purificación de GST-s.



**Figura 4.** Perfil de elución y de actividad enzimática de la GST-s. Se pasó un extracto (EC-s) por la columna (Pico I), a continuación se lavó la columna con PBS y se eluyó con 5 mM de GSH (Pico II), la proteína se midió por absorbencia a 280 nm (--) y la actividad enzimática (—) de la GST-s se determinó utilizando el sustrato clásico CDNB.



**Figura 5.** Gel de poliacrilamida con SDS al 12.5% teñido con azul de Coomassie, de la purificación de la GST de *T. solium* (GST-s). 1: EC-s; 2: EC-s pasado por GSH-sefarosa 4B; 3: GST-s y 4: Estándares de peso molecular: BSA (68 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), beta-lactoglobulina (18 kDa) y lisozima (14 kDa).

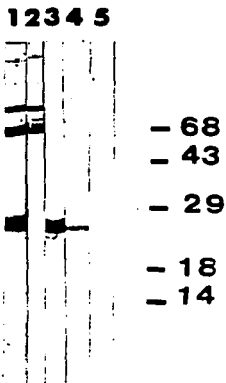
Las membranas de nitrocelulosa (NC) conteniendo el EC-s, EC-s pasado por la columna de GSH-sefarosa 4B y la GST-s, se incubaron con las Ig's anti-GST-s. La figura 6 muestra que la fracción Ig's anti-GST-s reconoció tres bandas de aproximadamente 80, 70 y 26 kDa en el EC-s y solamente 2 bandas de 80 y 70 kDa en el EC-s pasado por GSH-sefarosa 4B. En contraste, sólo reconoció una banda intensa de 26 kDa en la fracción que contiene la GST-s. Es importante mencionar que la proteína de 26 kDa quedó prácticamente eliminada del extracto EC-s que fue pasado por la columna de GSH-sefarosa 4B, ya que los anticuerpos no la reconocieron. Considerando que los anticuerpos identifican las bandas de 80 y 70 kDa, se procedió a obtener anticuerpos específicos que reconocieran solamente a la proteína de 26 kDa. Ésto se llevó a cabo, adsorbiendo los anticuerpos a membranas de NC que contenían solamente la GST-s (banda de 26 kDa). Los anticuerpos específicos obtenidos se evaluaron por IET (Figura 6, línea 4). El objetivo fue obtener anticuerpos que sólo reconocieran la banda de 26 kDa (GST-s).

### **3. LOCALIZACIÓN DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN EL TEJIDO DEL METACÉSTODO de *Taenia solium*:**

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cortes de pared vesicular del metacéstodo de *T. solium*. Para estos ensayos, se utilizaron los anticuerpos específicos anti-GST-s que reconocen solamente a la banda de 26 kDa (GST-s). La figura 7, muestra que la GST-s está presente en el citoplasma de las células que forman el sistema protonefridial (células formadoras de los canales) y en el parénquima. Así como, distribuida en todo el tejido formando un gradiente que va de las células del protonefridio hacia el tegumento, en donde se observa una gran concentración. Los ensayos de inmunoperoxidasa indirecta y los estudios de IET para detectar la GST-s en la superficie y en el fluido vesicular de cisticercos, salieron negativos.

### **4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA:**

La Tabla I muestra los resultados de la actividad específica de la glutatión peroxidasa (GPx) dependiente e independiente de selenio. La GST-s presentó actividad de GPx independiente de selenio, debido a que utilizó el sustrato de hidroperóxido de terbutilo. Contrariamente, no tuvo actividad dependiente de selenio ya que no usó como sustrato al peróxido de hidrógeno.



**Figura 6.** Inmunoelctrotransferencia de la purificación de la GST-s. Membranas conteniendo: 1: EC-s; 2: EC-s pasado por GSH-sefarosa 4B; 3: GST-s; 4 y 5: EC-s. Las membranas 1-3 se incubaron con los anticuerpos anti-GST-s; la membrana 4 se incubó con anticuerpos específicos (adsorbidos) anti-GST-s y la membrana 5 se incubó con gamma normal de conejo. Los anticuerpos unidos a la membrana se revelaron con un segundo anticuerpo unido a peroxidasa. Los estándares de peso molecular son los mismos de la figura 5.

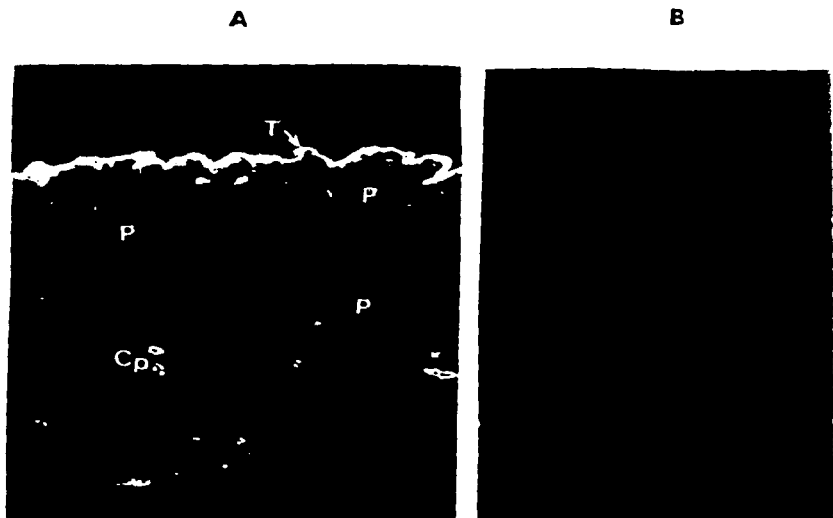


Figura 7. Inmunofluorescencia indirecta en cortes de congelación de la pared vesicular del metacéstodo de *T. solium*: A: incubado con los anticuerpos específicos (adsorbidos) anti-GST-s y B: con gamma normal de conejo. Las letras indican los tejidos en donde se localiza la GST-s: T: tegumento; P: parénquima y Cp: células del sistema protonefridial.

La GPx de eritrocitos de bovino tuvo actividad con los dos sustratos, ya que las GPx's de mamíferos tienen actividad con ambos sustratos en comparación con las GST's de mamíferos y de helmintos que sólo presentan actividad de GPx independiente de selenio (Wendel, 1980; Mannervik y Danielson, 1988). Es importante notar que la actividad de la GPx independiente de selenio que tuvo la GST-s fue 400 veces menor (0.48  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ), comparada con otras GPx's de mamíferos, incluyendo el estándar de GPx de bovino (200  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ).

Tabla I. Determinación de la actividad de GPx ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) dependiente ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e independiente (Hpx. Terbutilo) de selenio de la GST de *T. solium*. Se empleó como control la GPx de bovino.

Sustrato/Enzima	GST-s	GPx de bovino
Hpx. Terbutilo	0.48	200
$\text{H}_2\text{O}_2$	No detectada	121

##### 5. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA:

Se midió la actividad específica de GST utilizando el sustrato clásico para todas las GST's, el 1-cloro 2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) y otros sustratos como el ácido etacrínico y el 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano. En la Tabla II se aprecia a la GST-s con una actividad específica de 16  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  con el CDNB. Asimismo, la GST-s presentó una actividad específica con ácido etacrínico de 0.011  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  y no tuvo actividad con el sustrato 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano. Se utilizó la GST de hígado de bovino como control positivo en los ensayos. Es importante mencionar que las GST's de mamíferos clase Pi exhiben una gran actividad con ácido etacrínico (0.9-4  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) comparada con las de clase alfa (0.01-1.2  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) y las Mu (0.08-0.6  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) (Mannervik, et al., 1985). Por otro lado, las GST's clase Mu de mamíferos tienen gran actividad con el sustrato 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano, a diferencia de las GST's de helmintos que no presentan actividad con éste sustrato (Brophy, Crowley y Barrett, 1990; O'Leary, et al., 1992; Walker, et al., 1993).



Tabla II. Comparación de la actividad específica ( $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) de las GST's de *T. solium* (GST-s) y de hígado de bovino medida con diferentes sustratos.

Sustrato/Enzima	GST-s	GST de bovino
CDNB	16	20
Ac. etacrínico	0.011	0.072
1,2-epoxi-3-p	No detectada	0.03

#### 6. ENSAYO DE INHIBICIÓN:

La determinación de la inhibición de la actividad de GST se llevó a cabo con los sustratos verde de indocianina y clorotrifeniltín, que son inhibidores de la actividad de algunas clases de GST's en tremátodos. La tabla III, muestra que el clorotrifeniltín fue mejor inhibidor de la actividad de la GST-s puesto que su concentración fue menor ( $1.52 \mu\text{M}$ ) que la del verde de indocianina ( $4.56 \mu\text{M}$ ), para alcanzar una inhibición del 50 % ( $I_{50}$ ). La GST de bovino usada como control en el ensayo, alcanzó una  $I_{50}$  con una concentración 3.5 veces menor de clorotrifeniltín y 3 veces menor para verde de indocianina, comparada con las concentraciones utilizadas para la GST-s. El verde de indocianina tuvo una inhibición de tipo no competitiva y el clorotrifeniltín de tipo competitiva. Se emplearon estos sustratos porque hay trabajos en los que se reporta, que el azul de cibacron, el clorotrifeniltín y el verde de indocianina son inhibidores clásicos de las GST's de mamíferos y de tremátodos tales como las GST-1, 2, 3, 4 y la GST 28 recombinante de *S. mansoni*, así como de la GST 26 recombinante de *S. japonicum* (O'Leary, et al., 1992; Walker, et al., 1993).

Tabla III. Inhibición determinada como  $I_{50}$  [ $\mu\text{M}$ ] para la GST-s. Como control se utilizó la GST de hígado de bovino.

Inhibidores/Enzima	GST-s	GST bovino
V. Indocianina	4.56	1.24
C. trifeniltín	1.52	0.52

### 7. ENSAYO DE PROTECCIÓN:

La Tabla IV resume los resultados obtenidos del ensayo de protección en ratones de la cepa Balb/c. Para este ensayo se usó la GST del metacéstodo de *T. crassiceps*. Se llevó a cabo su purificación, siguiendo la metodología ya descrita en la sección de materiales y métodos (Sección IV). La fracción obtenida se denominó glutatión S-transferasa de *T. crassiceps* (GST-c). Los resultados indican que el extracto de *T. solium* (ECI-s) obtuvo una eficiencia de protección del 56%, las fracciones GST-s de 25% y GST-c de 49%. Aunque sólo se empleó una dosis de 10 µg de las GST's, con esta dosis se presentó una clara reducción en la carga de parásitos en los ratones previamente inmunizados. Asimismo, por medio de IET se observó que los sueros previos a la inmunización no presentaron reconocimiento de ningún antígeno en el ECI-s. Contrariamente, los sueros obtenidos después de la segunda inmunización y al sacrificio de los ratones mostraron la producción de anticuerpos específicos en contra de sus respectivos antígenos.

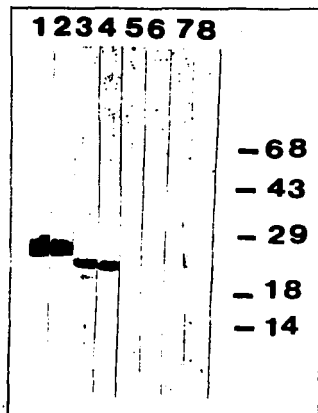
Tabla IV. Comparación de la eficiencia de protección utilizando las glutatión S-transferasas de *T. crassiceps* (GST-c) y de *T. solium* (GST-s) y un extracto crudo de *T. solium* (ECI-s). El control negativo fue PBS.

Grupo	Dosis µg	No. Ratones	No.cist.X+/-S	EP(%)
GST-c	10	6	166.3+/-55.4	49
GST-s	10	7	243.8+/-43.4	25
ECI-s	100	7	141.6+/-44.8	56
PBS	---	7	325.6+/-40.6	0

### 8. IDENTIFICACION DE LA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA EN OTRAS ESPECIES:

Para este ensayo se purificaron las GST's de los adultos de *T. solium*, *T. saginata* y *T. taeniaeformis* y *S. mansoni*, así como las del hígado de cerdo. Siguiendo el protocolo de purificación antes mencionado (Sección IV). Se adicionó una GST comercial de hígado de conejo que funcionó como control. Las diferentes GST's se corrieron en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana conteniendo cada una de las GST's puras se incubó con la fracción de Ig's anti-GST-s, que como ya se mencionó reconocen una banda de 26 kDa en la fracción de GST-s (ver Figura 6).

En la figura 8, se observa que los anticuerpos anti-GST-s reconocieron bandas de diferente peso molecular en cada carril: para el caso del gusano adulto de *T. solium* una banda de 26 kDa, para el caso de gusano adulto de *T. saginata* una banda de 24 y para el gusano adulto de *T. taeniaeformis* una de 24 kDa. Sorprendentemente, los anticuerpos anti-GST-s no reconocieron las GST's de *S. mansoni*, hígado de cerdo y de conejo que presentan pesos moleculares de 28, 26 y 26 kDa, respectivamente.



**Figura 8.** Identificación de las GST's de diferentes especies por medio de la Inmunolectrotransferencia utilizando los anticuerpos anti-GST-s: 1 y 8: *T. solium* metacéstodo; 2: *T. solium* adulto; 3: *T. saginata* adulto; 4: *T. taeniaeformis* adulto; 5: *S. mansoni* adulto; 6: hígado de cerdo; 7: hígado de conejo. Las membranas 1-7 se incubaron con anticuerpos anti-GST-s y la membrana 8 con gamma normal de conejo. Un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa se utilizó para revelar los anticuerpos unidos específicamente a la membrana.

## VI. DISCUSIÓN

Se han aislado varias GST's de extractos crudos de helmintos y del hígado de mamíferos, mediante cromatografías de afinidad, utilizando el sustrato específico GSH o derivados acoplados a soportes inertes, como sefarosa o agarosa. Siguiendo la misma estrategia, se decidió purificar la GST de *Taenia solium*. Se obtuvo una fracción denominada GST-s, que presentó una banda de ~26 kDa en SDS-PAGE. Los estudios de la actividad enzimática y la cuantificación de la proteína, mostraron que esta proteína constituye aproximadamente el 3% del total de las proteínas, extraídas del metacésto. Esto concuerda con lo reportado para otras GST's, las cuales constituyen del 2 al 4% del total de proteínas citosólicas de algunos helmintos (O'Leary y Tracy, 1991). Asimismo, en mamíferos se sabe que el 3% de las proteínas totales del hígado lo constituyen sus diferentes GST's (Mannervik y Danielson, 1988).

En cuanto a los resultados obtenidos por IET utilizando los anticuerpos anti-GST-s, éstos reconocieron tres proteínas con pesos de 26, 70 y 80 kDa en el extracto crudo del metacésto. Sin embargo, los mismos anticuerpos sólo reconocieron la banda de 26 kDa en la fracción eluida de GST-s. Esto puede tener varias explicaciones. La primera es que junto con la GST-s se eluyeron las proteínas de 70 y 80 kDa y cuando el conejo se inmunizó produjo anticuerpos no sólo contra la GST-s sino también contra las proteínas de 70 y 80 kDa. Una segunda razón puede deberse a que los anticuerpos anti-GST-s reconocen epitopos en otras proteínas del extracto (reacciones cruzadas) y una tercera puede deberse a que las bandas de 70 y 80 kDa sean otras GST's que se copurifican por este método o bien que se encuentran unidas a membranas o que están agregadas. Por tal motivo, se decidió obtener anticuerpos específicos anti GST-s adsorbiéndolos y eluyéndolos a la banda de 26 kDa de la fracción de GST-s. Se escogió la banda de 26 kDa debido a que los monómeros de estas proteínas en SDS-PAGE tienen aproximadamente este peso molecular.

Los anticuerpos adsorbidos (específicos) se utilizaron para localizar la GST en el tejido del metacéstodo de *T. solium*. Los resultados indican que la GST-s está presente en el citoplasma de las células protonefridiales y en el tegumento. Además, se observa en el parénquima de la pared, un gradiente que aumenta del sistema protonefridial hacia la superficie del metacéstodo (tegumento). Estos resultados sugieren que la GST se sintetiza en las células protonefridiales y se distribuye a todo el parénquima incluyendo el tegumento. Los datos coinciden con lo reportado para otras GST's de helmintos, en donde también éstas se han localizado en parénquima, tegumento, tejido muscular y epitelio intestinal. Además, en *S. mansoni*, se propone que la síntesis se lleva a cabo en las células protonefridiales (Balloul, et al., 1987, Taylor, et al., 1988; Trottein, et al., 1990; Pannaccio, et al., 1992; Fernández y Hormaeche, 1994; Creaney, et al., 1995). En contraste, se sabe que algunas GST's de *S. mansoni* Sm28, *S. japonicum* y *Onchocerca volvulus* se exportan a la superficie y se secretan, ya que se han detectado en el suero de individuos infectados (Balloul, et al., 1987, Davern, et al., 1990, Liebau, et al., 1994a). Para el caso de la GST-s, los ensayos de IET mostraron su ausencia en el fluido vesicular. Asimismo los ensayos preliminares de inmunoperoxidasa indirecta para detectar la GST-s en la superficie, resultaron negativos. Lo que sugiere que esta proteína no es secretada.

Las GST's tienen entre sus múltiples funciones, actividad de GPx independiente de selenio. Esta actividad es importante en la detoxificación de los hidroperóxidos orgánicos. La GST-s tuvo una actividad de GPx independiente de selenio, con el sustrato hidroperóxido de terbutilo de 0.48  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ . Actividad que se encuentra en el intervalo de actividad de las GST's de clase Mu de mamíferos 0.1-0.7  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ , pero por debajo de las GST's de clase alfa (Mannervik, et al., 1985). Para la determinación de la actividad de GST se empleó el sustrato clásico para la demostración de todas las GST's el CDNB (Mannervik y Danielson, 1988). La GST-s presentó una actividad de 16  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$  con este sustrato, actividad comprendida en los intervalos de actividad de las GST's de otros helmintos, tales como *S. mansoni* (5-44  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) (O'Leary, et al., 1992), *F. hepatica* (8-38  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) y con los de mamíferos

(0.15-190  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) (Brophy, Crowley y Barrett, 1990). Otro sustrato importante para distinguir a las diferentes clases de GST's, es el ácido etacrínico. La GST-s manifestó una actividad de 0.011  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ . Esta actividad está dentro del intervalo de actividad de las GST's de mamíferos clase Alfa (0.01-1.2  $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ ) y muy por debajo de las GST's de clase Pi que presentan gran actividad con este sustrato (Mannervik, et al., 1985). El tercer sustrato fue el 1-2 epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano, con el cuál la GST-s no reaccionó. Cabe mencionar que este sustrato sólo es utilizado por las GST's de mamíferos y no presenta actividad con GST's de helmintos (Mannervik y Danielson, 1988).

Otro criterio importante para distinguir las clases de GST's, es la sensibilidad a los inhibidores. Se ha observado que las GST's de helmintos son inhibidas de manera similar a las GST's de mamíferos, aunque las GST's de céstodos y tremátodos son relativamente más sensibles a ésta inhibición (Brophy y Barrett, 1990). La GST-s presentó una inhibición con verde de indocianina (4.56  $\mu\text{M}$ ) y con clorotrifeniltín (1.52  $\mu\text{M}$ ). Esta última inhibición se encuentra dentro del intervalo de las GST's clase Alfa de mamífero (0.3-30  $\mu\text{M}$ ) (Mannervik, et al., 1985). Es importante mencionar que el clorotrifeniltín inhibe mejor a las GST's de clase Mu (0.04-0.5  $\mu\text{M}$ ) que a las de clase alfa (0.3-30  $\mu\text{M}$ ) y Pi (>10  $\mu\text{M}$ ) de mamíferos (Mannervik, et al., 1985; O'Leary y Tracy, 1988; Brophy, Brown y Pritchard, 1994b). Se ha visto que el verde de indocianina inhibe a las GST's 1, 2, 3 y 4 de *S. mansoni* en un intervalo de 2.7-20  $\mu\text{M}$  (O'Leary, et al., 1992), la inhibición que se obtuvo con este inhibidor para la GST-s pertenece a este intervalo. La GST-s tuvo inhibición no competitiva con verde de indocianina y competitiva con clorotrifeniltín, estos datos concuerdan con lo reportado para las GST's de mamíferos (Mannervik y Danielson, 1988). En general, se puede pensar por los datos antes mencionados, que la GST-s tiene características enzimáticas semejantes a las de la clase Alfa y Mu de mamíferos. Estos datos concuerdan con los otros intentos para clasificar las GST's de helmintos (Brophy, Brown y Pritchrd, 1994b). En este sentido algunos autores han empezado a sugerir que se proponga una nueva clasificación para las GST's.

Por otro lado, esta enzima es uno de los principales sistemas de detoxificación de tóxicas endógenas y exógenas en los organismos, incluyendo los helmintos (O'Leary y Tracy, 1991). Además, las GST's de *S. mansoni*, *S. japonicum* y *F. hepatica* se han propuesto como candidatos para vacunación, mostrando un intervalo de protección del 29-72% en diferentes hospederos (Smith, et al., 1986; Balloul, et al., 1987; Taylor, et al., 1988; Auriault, et al., 1990; Wright, et al., 1991; Bushara, et al., 1993; Xu, et al., 1993; Capron, 1994; Sexton, et al., 1992; Hillyer, et al., 1992; Miller, et al., 1993). En este aspecto, los resultados del ensayo de protección utilizando la GST-s y la GST-c presentaron una eficiencia del 25% y del 49% en la reducción de cisticercos, respectivamente. Este ensayo sugiere que las GST's disminuyen la carga de cisticercos y que tienen una especificidad, ya que con la GST-c se obtuvo mayor protección. Los ratones inmunizados con las GST's presentaron anticuerpos específicos contra las GST. Los resultados anteriores son importantes, porque al utilizar una proteína pura para inmunizar, se eliminan antígenos que aumentan el número de parásitos y que están presentes en los extractos totales de metacéstodos. Este efecto se ha observado en cerdos y ratones (Rodarte, 1992; Valdez, et al., 1994).

Finalmente, el ensayo de identificación de GST's en otras especies mostró que los anticuerpos contra la GST-s reconocieron a las GST de varios ténidos (*T. saginata* y *T. taeniaeformis*). Pero no a las GST's de *S. mansoni* y de los mamíferos cerdo y conejo. Lo antes mencionado, sugiere que existe cierto grado de homología entre las GST's de los ténidos y una diferencia con las GST de *S. mansoni*, de cerdo y conejo. Es importante hacer notar que este resultado también se ha descrito por otros autores, que han trabajado con otros tipos de GST's (Mannervik, et al., 1985).



En resumen, en este trabajo, se presenta la primera purificación y caracterización parcial de la enzima Glutación S-transferasa de *T. solium*. El disponer de una proteína pura permitirá realizar estudios más finos y entender la relación hospedero-parásito en la cisticercosis causada por *T. solium*. Asimismo, conocer la importancia que esta enzima juega en la detoxificación de drogas y metabolitos tóxicos, producidos por la respuesta inmune del hospedero. Los estudios de protección realizados y de su similitud con otras GST's de ténidos y de su diferencia con la de mamíferos, en especial el cerdo hospedero intermediario, proponen a esta proteína como candidato a ser tomada en cuenta para vacunación.

## VII. CONCLUSIONES

1.- La GST-s (monómero) presentó un tamaño de  $\approx 26$  kDa en SDS-PAGE.

2.- Esta enzima constituye aproximadamente el 3% del total de proteínas solubles del metacéstodo de *T. solium*.

3.- La GST-s se localiza en el citoplasma de las células del sistema protonefridial, el tegumento y dispersa en el parénquima de la pared del metacéstodo.

4.- La GST-s presentó características bioquímicas similares a las de clase Alfa y Mu de mamíferos.

5.- La GST-s se propone como otro candidato para ser utilizada en ensayos de protección en contra de la cisticercosis originada por *T. solium*.

## VIII. REFERENCIAS

- Acevedo-Hernández, A.** 1989. Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México, 251.
- Allan, J. C., Craig, P. S.** 1989. Coproantigen in gut tapeworm infections: *Hymenolepis diminuta* in rats. Parasitol. Res. 76:68.
- Allan, J. C., Avila, G., García-Noval, J., Flisser, A., Craig, P. S.** 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. Parasitology. 101(Pt 3):473.
- Allan, J. C., Mencos, F., García-Noval, J., Sarti, E., Flisser, A., Wang, Y., Liu, D., Craig, P. S.** 1993. Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. Parasitology. 107(Pt 1):79.
- Aluja, A.** 1982. Frequency of porcine cysticercosis in México. In Cysticercosis: Present state of Knowledge and Perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lactette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds.). Academic Press, New York, p 52.
- Asada, J., Otagaki, H., Kaji, F., Aokage, K., Ochi, G.** 1956. On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. Tokyo Iji Shinshi. 73:153.
- Ash, L. R., Oriol, T. C.** 1987. Parasites: Guide to laboratory procedures and identification. Chicago, ASCP Press. 256.
- Auriault, C., Gras-Masse, H., Pierce, R. J., Butterworth, A. E., Wolowczuk, I., Caprón, M., Ooma, J. H., Balloul, J. M., Khalife, J., Neyrinck, J. L., Tartar, A., Koech, D., Caprón, A.** 1990. Antibody response of *Schistosoma mansoni*-infected human subjects to the recombinant p28 glutathione S-transferase and to synthetic peptides. J. Clin. Microbiol. 1918.

- Balloul, J. M., Grzych, J. M., Pierce, R. J., Capron, A.** 1987. A purified 28 000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 138(10):3448.
- Blocki, F. A., Schlievert, P. M., Wackett, L. P.** 1992. Rat liver protein linking chemical and immunological detoxification systems. *Nature.* 360:269.
- Boveris, A., Cadenas, E., Ernster, L., Fraga, C. G., Puntarulo, S.** 1994. Oxygen radicals in Biochemistry, Biophysics and Medicine. School of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Argentina. 66 p.
- Bowles, J., McManus, D. P.** 1994. Genetic characterization of the Asian *Taenia* a newly described taeniid cestode of humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50(1):33.
- Bradford, N. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248.
- Brophy, P. M., Southan, C., Barret, J.** 1989a. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *J. Biochem.* 262:939.
- Brophy, P. M., Papadopoulos, A., Touraki, M., Coles, B., Körting, W., Barrett, J.** 1989b. Purification of cytosolic glutathione transferase from *Schistocephalus solidus* (placercoid) interaction with anthelmintics and products of lipid peroxidation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36:187.
- Brophy, P. M., Barrett, J.** 1990. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology.* 100:345.
- Brophy, P. M., Crowley, P., Barrett, J.** 1990. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39:155.

- Brophy, P. M., Brown, A., Pritchard, D. L.** 1994a. Parasitic helminth glutathione S-transferase: an update on their potential as targets for immuno-and chemotherapy. *Exp. Parasitol.* 79:89.
- Brophy, P. M., Brown, A., Pritchard, D. I.** 1994b. A PCR strategy for the isolation of glutathione S-transferases (GST's) from nematodes. *Int. J. Parasitol.* 24(7):1059.
- Brophy, P.M., Smith, A.B., Brown, A., Behnke, J.M., Pritchard, D.I.** 1995. Differential expression of glutathione S-transferase (GST) by adult *Heligmosomoides polygyrus* during primary infection in fast and slow responding host. *Int. J. Parasit.* 25(5):641.
- Bushara, H. O., Bashir, M. E. N., Malik, K. H. E., Mukhtar, M. M., Trottein, F., Caprón, A., Taylor, M. G.** 1993. Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole limpet haemocyanin. *Parasit. Immunol.* 15:383.
- Capron, A.** 1994. Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and Update. *Trop. Geogr. Med.* 46(4):242.
- Cheng, T. C.** 1986. General Parasitology. Segunda Edición. Academic Press, New York, USA. p 387-430.
- Chotmongkol, V.** 1993. Treatment of neurocysticercosis with a two week course of albendazole. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 24(2):396.
- Contreras, C. L.** 1989. Aspectos más sobresalientes de la inspección sanitaria de suinos en los rastros del D. F. y en otros del país en busca del cisticerco de *Taenia solium*. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México. 257.
- Corona, T., Pascoe, D., González-Barranco, D., Abad, P., Landa, C., Estanol, B.** 1986. Anticysticercosis antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 49:1044.

- Correa, D., Sandoval, M., Harrison, L., Parkhouse, M., Plancarte, A., Mexa-Lucas, A., Flisser, A. 1989. Human neurocysticercosis: Comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:814.
- Cogle, W. G., Lightowers, M. W., Henrik, B. O., Rickard, M. D., Johnson, K. S. 1991. Molecular cloning of *Taenia taeniaeformis* oncosphere antigen genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45:137.
- Creaney, J., Wijffels, G. L., Sexton, J. L., Sandeman, R. M., Spithill, T. W., Parsons, J. C. 1995. *Fasciola hepatica*: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* 81:106.
- Creasy, J. L., Alarcón, J. J. 1994. Magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. *Top. Magn. Reson. Imaging.* 6(1):59.
- Davern, K. M., Tiu, W. H., Samaras, N., Gearing, D. P., Hall, B. E., García, E. G., Mitchell, G.H. 1990. *Schistosoma japonicum*: monoclonal antibodies to the Mr 26, 000 schistosome glutathione S-transferase (Sj26) in an assay for the circulation antigen in infected individuals. *Exp. Parasitol.* 70:293.
- Díaz-Camacho, S; Candil-Ruiz, A; Uribe-Beltrán, M. y Willms K. 1989. Epidemiología de teniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A; Malagón, F. (eds). Limusa, México. 243.
- Diwan, A. R., Coker-Van, M., Brown, M., Sibianto, D. B., Yolken, R., Desowitz, R., Escobar, A., Gibbs, C., Gadjusek, C. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticercosis of *Taenia solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31:364.

Douch, P. G. C., Buchanan, L. L. 1978. Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris suum* and *Moniezia expansa*. *Xenobiotica*. 8:171.

Som, K. S., Rim, H. J. 1993. Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp. n. Korean J. Parasitol. 31(1):1.

Espejo, H. 1977. Tratamiento de infecciones por *H. nana*, *T. saginata*, *T. solium* y *D. pacificum* con praziquantel. Bol. Chileno Parasitol. 32:39.

Fernández, C., Hormaeche, C. E. 1994. Isolation and biochemical characterization of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protozooscolec. Int. J. Parasitol. 24(7):1063.

Fischer, C., Nostatian, R., Habtemichael, N., Tolle, R., Riemenschneider, V., Geyer, E. 1994. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. Trop. Med. Parasitol. 45(4):324.

Flisser, A. 1988. Neurocysticercosis in México. Parasitology Today. 4(5):131.

Flisser, A. 1990. Cysticercosis. Parasitology. 12(3):50.

Flisser, A., Plancarte, A., Correa, D., Rodríguez-Del Rosal, E., Feldman, M., Sandoval, M., Torres, M., Mera, A., Parkhouse, R. M. E., Harrison, L. S. J., Wilson, M., Avila, G., Allan, J., Craig, P. S., Vallejo, V., Ortíz, D., García, E., McManus, D. P. 1990. New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 65(Supl 1):95.

Gallie, G. J. y Sewell, M. M. H. 1972. The survival of *Cysticercus bovis* in resistant calves. Vet. Rec. 91:481.

Gallie, G. J. y Sewell, M. M. H. 1974. The serological response of three months old calves to infection with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and their resistance to reinfection. Trop. Anom. Hlth and Prod. 6:163.

Gallie, G. J. y Sewell, M. M. H. 1976. Experimental immunization of six month old cysticercus stage of *Taenia saginata*. Trop. Animal Hlth. and Prod. 8:233.

Gallie, G. J. y Sewell, M. M. H. 1981. Inoculation of calves and cattle with oncospheres of *Taenia saginata* and their resistance to reinfection. Trop. Anom. Hlth. and Prod. 13:147.

García, H. H., Herrera, G., Gildman, R. H., Tsang, V. C., Filcher, J. B., Díaz, J. F., Candy, E. J., Miranda, E., Maranjo, J. 1994. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50(2):152.

Gottstein, B., Tsang, V. C. W., Schantz, P. M. 1986. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 35:308.

Gottstein, B., Zini, D., Schantz, P.M. 1987. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop. Med. Parasitol. 38:299.

Grogl, M., Estrada, J. J., Mac Donald, G., Khun, R. E. 1985. Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. J. Parasitol. 71:433.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 22(25):7130.

Habig, W. H., Jakoby, W. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. Methods in Enzimology. 77:398.

Harrison, L. J. S., Delgado, J., Parkhouse, R. M. E. 1987. Differentiation of *Taenia saginata* and *Taenia solium* by the use of cloned DNA fragments. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:174.



- Harrison, L. J. S., Delgado, J., Parkhouse, R. M. E. 1988. DNA probes in the differentiation of human *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:939.
- Harrison, L. J. S., Parkhouse, R. M. E. 1989. *Taenia saginata* and *Taenia solium*: reciprocal models. Acta Leiden. 57(2):143.
- Harrison, G. B., Heath, D. D., Dempster, R. P., Lawrence, S. B., Lightowers, M. W., Rickard, M. D. 1993. Identification of host-protective antigens of *Taenia ovis* oncospheres. Int. J. Parasitol. 23(1):41.
- Heath, D. 1982. In vitro culture of cysticerci: an aid to investigation of morphological development and host-parasite relationships. En: Cysticercosis present status knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York. USA. 477.
- Hillyer, G. V., Soler de Galanes, M., Battisti, G. 1992. *Fasciola hepatica*: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase. Exp. Parasitol. 75:176.
- Hird, W., Pullen, M. 1979. Tapeworms, meat and man: a brief review and update of cysticercosis caused by *Taenia saginata* and *Taenia solium*. J. Food Protection. 42:58.
- Holy, J. M., O'Leary, K. A., Tracy, J. W. 1989. Immunocitochemical localization of the mayor glutathione S-Transferase in adult *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 75:181.
- Howell, M. J., Hargreaves, J. J. 1989. Characterization of cloned antigens of *Taenia ovis*. Int. J. Parasitol. 19(6):631.
- Hughes, A. L. 1993. Rates of aminoacid evolution in the 26- and 28-kDa glutathione S-Transferase of *Schistosoma*. Mol. Biochem. Parasitol. 58:43.

Ito, A., Bogh, H. O., Lightowers, M. W., Mitchell, G. F., Takami, T., Kamiya, M., Onitake, K., Rickard, M. D. 1991. Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44(1):43.

Ito, A., Asano, K., Okamoto, K. 1994a. Protective antibodies against *Taenia taeniaeformis* in rats infected with eggs or injected with non-viable oncospheres or recombinant antigens of oncospheres. *Parasit. Immunol.* 16(9):463.

Ito, A., Fan, P. C., Chung, W. C., Suzuki, M. 1994b. Cross protection against *Taenia taeniaeformis* in rats vaccinated with non-viable oncospheres of Asian *Taenia* or *Taenia saginata*. *J. Helminthol.* 68(1):83.

Jaffe, J. J., Lambert, R. A. 1986. Glutathione S-Transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia Pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:199.

Johnson, K. S., Harrison, G. B. L., Lightowers, M. W., O'Hoy, K. L., Cogle, W. G., Dempster, R. P., Lawrence, S. B., Vintor, J. G., Heath, D. D., Rickard, M. D. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 338:585.

Kalin, T. M., Mannervik, B. 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 261(3):1048.

Kawalek, J. C., Rew, R. S., Heavner, J. 1984. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a cambendazole-resistance and a susceptible strain. *Int. J. Parasitol.* 14:173.

Keilbach, N. M., de Aluja, A. S., Sarti-Gutierrez, E. 1989. A programme to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*): experiences in a Mexican village. *Acta Leiden.* 57(2):181.

- Ketley, J. M., Habig, H., Jakoby, B.** 1975. Binding of nonsubstrate ligands to the glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* 250(22):8670.
- Ketterer, B., Meyer, D. J., Clark, A. G.** 1989. Soluble glutathione transferase isozymes. En *Glutathione Conjugation: its mechanism and biological significance*. Ed. Sies, H. y Ketterer, B. Londres, Academic Press. p 73.
- Laclette, J. P., Ornelas, I., Merchant, M., Willms, K.** 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: *Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. Beltran, F. (Eds.). Academic Press, New York. 375.
- Laemli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680.
- Landa, A.** 1988. Estudio de las glicoproteínas de superficie del cisticerco de la *Taenia solium*. Maestría en Ciencias. Tesis. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 83 p.
- Landa, A.** 1992. *Taenia solium*: clonación, caracterización y expresión del gen del antígeno B. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 61 p.
- Larralde, C., Laclette, J. P., Owen, C. S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Díaz, M. L., Govezensky, T., Montoya, R. M., Goodsaid, F.** 1986. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: Elisa and hemagglutination tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:965.
- Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R. M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M. L., Sciutto, E.** 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114(9):926.

- Larrañaga, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutiérrez, B., Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública Méx.* 34:197.
- Liebau, E., Schonberg, O. L., Walter, R. D., Henkle-Duhrsen, K. J. 1994a. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63(1):167.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Walter, R. D., Henkle-Duhrsen, K. J. 1994b. A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*. *Infect. Immun.* 62(11):4762.
- Lightowers, M. W., Rickard, M. D. 1993. Vaccination against cestode parasites. *Immunol. Cell Biol.* 71(Pt 5):443.
- Lombardo, L., Mateos, J. H., Estaño, I. B. 1982. La cisticercosis cerebral en México. *Gac. Med. Mex.* 118:1.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Lloyd, S., Soulsby, E. J. L. 1976. Passive transfer of immunity to neonatal calves against metacestodes of *Taenia saginata*. *Vet. Parasit.* 2:355.
- Mannervik, B. 1985. Isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzimol. Rel. Areas Mol. Biol.* 57:357.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jennson, H., Kalim Thair, M., Warholm, M., Jornvall, H. 1985. Identification of 3 classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:7202.
- Mannervik, B., Danielson, V. H. 1988. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23(3):283.

- McManus, D. P., García-Zepeda, E., Reid, A., Rishi, A. K., Flisser, A. 1989. Human cysticercosis and taeniasis: molecular approaches for specific diagnosis and parasite identification. *Acta Leiden*. 57(2):81.
- McMair, A. T., Dissous, C., Duvaux-Miret, O., Caprón, A. 1993. Cloning and characterization of the gene encoding the 28-kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene*. 124(2):245.
- McTigue, M. A., Williams, D. R., Tainer, J. A. 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246(1):21.
- Miller, B., Golberg, M. A., Heiner, D. G., Myers, A., Goldberg, A. 1984. A new immunologic test for CNC cysticercosis. *Neurology*. 34:695.
- Miller, C. M. D., Howell, M. J., Boray, J. C. 1993. Host effects on glutathione S-transferase activity in *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* 23(8):1073.
- Mohammad, I. N., Heiner, D. C., Miller, B. L., Goldberg, M. A., Kagan, I. G. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. *J. Clin. Microbiol.* 20:775.
- Molinari, J. L., Meza, R., Suárez, B., Palacios, S., Tato, P., Retana, A. 1983a. *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasitol.* 55:340.
- Molinari, J.L., Meza, R., Tato, P. 1983b. *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp. Parasitol.* 56:327.
- Molinari, J. L., Tato, P., Sepúlveda, J., Cáraz, A. 1986. Ultrastructural study of damaged cysticerci from naturally parasitized, immunized hogs. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 28:47.

- Molinari, J. L., Tato, P., Aguilar, T., Patet, A. 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarynchus saginatus*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30:325.
- Molinari, J. L., Tato, P., Lara-Aguilera, R., White, C. 1993a. Effects of serum from neurocysticercosis and viability of *Taenia solium* oncospheres. J. Parasitol. 79(1):124.
- Molinari, J. L., Soto, R., Tato, P., Rodríguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J., Patet, A. 1993b. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in México: a field and laboratory study. Am J. Trop. Med. Hyg. 49(4):502.
- Morello, A., Repetto, I., Atlas, A. 1982. Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. Comp. Biochem. Physiol. 728:449.
- Nascimento, E., Nogueira, P. M. P., Tavares, C. A. P. 1987. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. Parasitol. Res. 73:446.
- Nieto, D. 1956. Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by mean of the spinal fluid complement fixation test. Neurology. 6:725.
- O'Leary, K. A., Tracy, J.W. 1988. Purification of three cytosolic glutathione S-transferase from adult *Schistosoma mansoni*. Arch. Biochem. Bioph. 264:1.
- O'Leary, K. A., Tracy, J. W. 1991. *Schistosoma mansoni*: glutathione S-transferase catalized detoxification of dichlorvos. Exp. Parasitol. 72:355.
- O'Leary, K. A., Hathaway, K. M., Tracy, J. W. 1992. *Schistosoma mansoni*: single-step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4. Exp. Parasitol. 75:47.
- Pannacio, M., Wilson, L. R., Cramer, S. L., Wuffels, G. L., Spithill, T. W. 1992. Molecular characterization of cDNA sequences encoding glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. Exp. Parasitol. 74:232.

- Pawlowski, E. S.** 1991. Control of *Taenia solium* and cysticercosis by focus-oriented chemotherapy of taeniasis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 22(Sup 1):284.
- Pemberton, K. D., Barrett, J.** 1989. The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). Int. J. Parasitol (En prensa).
- Pemble, S., Taylor, J. B.** 1992. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-Theta glutathione transferase cDNA sequences. Biochem J. 287:957.
- Pemble, S., Schroeder, K. R., Spencer, S. R., Meyer, D. J., Hallier, E., Bolt, H. M., Ketterer, B., Taylor, B.** 1994. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. Biochem. J. 300:271.
- Plancarte, A., Texas, M., Flisser, A.** 1994. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. Int. J. Parasitol. 24(5):733.
- Ramírez-Bon, E., Merchant, M., González-del Pliego, M., Canedo, L.** 1982. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltran, F. (eds). Cysticercosis: Present states of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. USA. 261.
- Rickard, M. D., Boddington, E. B., McQuade, N.** 1977. Vaccination of lambs against *Taenia ovis* infection using antigens collected during in vitro culturation of larvae passive protection via colostrum from vaccination. Res. Vet. Sci. 23:368.
- Rickard, M. D., Brusley, J. L.** 1981. Immunization of calves against *Taenia saginata* infection using antigens collected by in vitro incubation of *Taenia saginata* oncospheres or ultrasonic disintegration of *Taenia saginata* and *T. hydatigena* oncospheres. Res. Vet. Sci. 30:99.

**Rishi, A. K., McManus, D. P.** 1988. Molecular cloning of *Taenia solium* genomic characterization of taeniid cestodes by DNA analysis. *Parasitology*. 97:161.

**Rodarte, L. F.** 1992. Evaluación experimental de la capacidad de protección de antígenos de *Taenia solium*. Tesis. Universidad Autónoma de México, México, D. F., México, 44 p.

**Rydzewski, A. K., Chisholm, E. S., Kagan, I. G.** 1975. Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescent antibody and agar precipitin test. *J. Parasitol.* 61:154.

**Salinas, G., Braun, G., Taylor, D.W.** 1994. Molecular characterisation and localisation of an *Onchocerca volvulus*  $\pi$ -class glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:1.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. p 18.16-18.18.

**Sanchetec, P. C., Vankataraman, S., Dharmija, R. M., Roy, A. K.** 1994. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *J. Assoc. Physicians India.* 42(2):116

**Sarti, E., Schantz, P.M., Plancarte, A., Wilson, M., Gutierrez, I. O., López, A. S., Roberts, J., Flisser, A.** 1992. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Méx. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(6):677.

**Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R. M., Díaz, M. L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G., Larraide, C.** 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasit. Immunol.* 12:687.



Sciutto, E., Fragoso, G., Díaz, M. L., Valdéz, F., Montoya, R. M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77:243.

Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L. F., Hernández, M., Villalobos, M. N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S., Larralde, C. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60:53.

Schantz, P. M., Shanks, D., Wilson, M. 1980. Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:609.

Schantz, P. M., Sarti-Gutierrez, E. 1989. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden.* 57(2):153.

Sexton, J. L., Milner, A. R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., Thompson, C., Wilson, L., Spithill, T. W., Mitchell, G. F., Campbell, N. J. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* 145(11):3905.

Sexton, J. L., Wilce, M. C. J., Colin, T., Wijffels, G. L., Salvatore, L., Feil, S., Parker, M. W., Spithill, T. W., Morrison, C. A. 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. *J. Immunol.* 152:1861.

Sharp, P. J., Smith, D. R. J., Bach, W., Wagland, B. M., Cobon, G. S. 1991. Purified glutathione S-transferase from parasites as candidate protective antigens. *Int. J. Parasitol.* 21:839.

Smith, D. B., Davern, K. M., Board, P. G., Tiu, W. U., García, E. G., Mitchell, G. F. 1986. Mr 26 000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEH 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83:8703.

**Sotelo, J., Escobedo, F., Rodríguez-Carbajal, J., Torres, B., Rubo-Donnadieu, F.** 1984. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N. Engl. J. Med.* 310:1001.

**Sotelo, J., Guerrero, V., Rubio-Donnadieu, F.** 1985. Neurocysticercosis a new clasification based on active and inactive forms. Study of 753 cases. *Arch. Intern. Med.* 154:442.

**Soulsby, E. J. L., Lloyd, S.** 1982. Passive immunization in cysticercosis: characterization of the antibodies concerned. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., et al (eds). New York: Academic Press. 539.

**Sutton, R. J.** 1979. The passive transfer of immunity to *Taenia ovis* in lambs via colostrum. *Res. Vet. Sci.* 27:197.

**Taylor, J. B., Vidal, A., Torpier, G., Meyer, D. J., Roitsch, C., Balloul, J. M., Southan, C., Sondermeyer, P., Pemble, S., Lecocq, J. P., Caprón, A., Ketterer, B.** 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO Journal.* 7:465.

**Tellez-Girón, E., Ramos, M. C., Dufour, L., Alvarez, P., Montante, M.** 1987. Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standar ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37:169.

**Thompson, R.** 1977. *Techniques in clinical immunology.* Backwell Scientific Publ. Oxford. p 85.

**Tiu, W. U., Davern, M., Wright, M. D., Board, P. G., Mitchell, G, F.** 1988. Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferase of *Schistosoma japonicum* and *Schisrosoma mansoni*. *Parasit. Immunol.* 10:693.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

49

**Torres, L. A.** 1990. Evaluación del efecto de diferentes dosis de praziquantel en cerdos parasitados naturalmente con el metacástono de la *Taenia solium*. Maestría en Ciencia Veterinaria, Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 106 p.

**Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:4350.

**Trottein, F., Kieny, M. P., Verwaerde, C., Torpier, G., Pierce, R. J., Balloul, J. M., Schitt, D., Lécocq, J. P., Caprón, A.** 1990. Molecular cloning tissue distribution of a 26 kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. Mol. Biochem. Parasitol. 41:35.

**Trottein, F., Godin, C., Pierce, R. J., Sellin, B., Taylor, M. G., Gorillot, I., Silva, M. S., Lécocq, J. P., Caprón, A.** 1992. Inter-species variation of schistosome 28-kDa glutathione S-transferases. Mol. Biochem. Parasitol. 54:63.

**Tsang, V. C. W., Brand, J. A., Boyer, A. E.** 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J. Infect. Dis. 159:50.

**Valdéz, F., Hernández, M., Góvorensky, T., Fragoso, G., Sciutto, E.** 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the promising antigens in the induction of protective immunity. J. Parasitol. 80(6):931.

**Vandewas, E. A., Campbell, C. K., O'Leary, K. A., Tracy, J. W.** 1993. Induction of *Schistosoma mansoni* glutathione transferase by xenobiotics. Arch. Biochem. Biophys. 303:15.

**Velasco-Suárez, M., Bravo, M. A., Quirasco, F.** 1982. Human cysticercosis: medical implication and economic impact. In Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larraide, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. 63.

- Verster, A.** 1969. A taxonomic revision of the genus *Taenia*. *J. Vet. Res.* 36:3.
- Walker, J., Crowley, P., Moreman, A. D., Barrett, J.** 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61:255.
- Walker, J., Crowley, P., Barrett, J.** 1995. Chemical modification of a cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*: evidence for an essential histidine residue. *Exp. Parasitol.* 80:616.
- Wang, C. Y., Zhang, H. H., Ge, L. Y.** 1992. A Mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma.* 11(6):825.
- Weller, T., Coons, A.** 1954. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:789.
- Wendel, A.** 1980. Enzymatic basis of detoxification. *Jacoby, W. B. ed., Academic Press, New York, 333.*
- Wright, M. D., Harrison, R. A., Melder, A. M., Newport, G. R., Mitchell, G. F.** 1991. Another 26-kilodalton glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49:177.
- Xu, Ch. B., Verwaerde, C., Gras-Nasse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., Wolowczuk, I., Tartar, A., Caprón, A.** 1993. *Schistosoma mansoni* 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino-and carboxyl-terminal domains. *J. Immunol.* 150(3):940.
- Zaman, V.** 1979. II Helminths (Cestodes). *En: Atlas of Parasitology. Adis. Press. Austria. p 131.*