

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
ENTIDAD: FACULTAD DE MEDICINA**

La enzima Glutación S-Transferasa de *Taenia solium*,  
su caracterización y evaluación en protección.

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMEDICAS)**

**P R E S E N T A:**

**Norberto Vibanco Pérez**

**Tutor: Dr. Abraham Landa Piedra**

23/7/11



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biología molecular de parásitos, del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, bajo la asesoría y dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. El comité tutorial de evaluación semestral estuvo formado por los doctores: Abraham Landa Piedra, Juan Pedro Laclette San Román y Ruy Enrique Pérez Montfort.**

**Este trabajo fue apoyado en parte por el proyecto 201437 de PAEP-UNAM (NVP), el proyecto IN201795 de PAPIIT-UNAM (ALP) y por el proyecto M9308-3326 de CONACyT (ALP). Una beca completa para estudios de posgrado del PAEP-UNAM (1997-2000) (NVP) y un complemento de beca de la ANUIES a través de la Universidad Autónoma de Nayarit (1997-2000) (NVP).**

# INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas utilizadas	3
I Introducción	5
I.1 Taeniosis y cisticercosis causada por <i>Taenia solium</i>	5
I.2 Control de la cisticercosis y taeniosis causadas por <i>T. solium</i>	6
I.2.1 Quimioterapia	7
I.2.2 Educación para la salud y mejores condiciones sanitarias	8
I.2.3 Vacunación	9
I.2.3.1 Vacunación contra cisticercosis causada por <i>T. solium</i>	9
I.2.3.2 Vacunación contra cisticercosis causada por otras especies del género <i>Taenia</i>	10
I.2.3.3 Selección de antígenos para vacunación	12
I.3 Enzimas detoxificantes como mecanismo de defensa de helmintos	13
I.4 La enzima Glutación S-transferasa	15
I.4.1 Generalidades	15
I.4.2 Presencia de la GST en helmintos	17
I.4.3 Localización de la enzima GST en helmintos	19
I.4.4 Relación entre las GSTs de helmintos y de mamíferos	21
I.4.5 Papel de la GST en la lipoperoxidación	21
I.4.6 Función de unión de GSTs a otros compuestos	22
I.4.7 Las GSTs de helmintos como antígenos	24

II Hipótesis	26
III Objetivos	27
III.1 Objetivos generales	27
III.2 Objetivos específicos	28
IV Metodología	29
IV.1 Material biológico	29
IV.2 Obtención de extractos crudos	29
IV.3 Purificación de GST	30
IV.4 Cuantificación de proteínas	31
IV.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	31
IV.6 Ensayos de inmunoelectrotransferencia	32
IV.7 Cromatografía de filtración en gel	33
IV.8 Producción de anticuerpos policlonales contra GST de <i>Taenia solium</i>	34
IV.9 Ensayos de actividad enzimática	35
IV.10 Ensayos de inhibición de la actividad enzimática	37
IV.11 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta	37
IV.12 Secuenciación amino terminal de proteínas	38
IV.13 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
IV.13.1 Obtención de un fragmento con secuencia de GST de <i>T. solium</i> (sonda)	38
IV.13.2 Obtención del fragmento completo que codifica para GST de <i>T. solium</i>	39
IV.14 Marcaje de la sonda	40
IV.15 Tamizaje de una biblioteca de ADNc de <i>Taenia solium</i> y aislamiento de clonas positivas	40

IV.16	Clonación de la secuencia que codifica para GST de <i>T. solium</i> en el vector de expresión pTRC99A	42
IV.17	Obtención y purificación de ADN	43
IV.17.1	Productos de PCR	43
IV.17.2	Plásmidos	43
IV.17.3	ADN genómico	44
IV.17.4	ADN de Fagos	45
IV.18	Secuenciación de ADN	46
IV.18.1	Fragmentos de PCR con marcaje radioactivo	46
IV.18.2	Fragmentos de PCR con marcaje fluorescente	47
IV.18.3	Plásmidos con marcaje radioactivo	48
IV.19	Deducción de la secuencia de aminoácidos	49
IV.20	Expresión de Glutación S-transferasa recombinante de <i>T. solium</i>	49
IV.21	Ensayos de Southern blot	50
IV.22	Ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis <i>Taenia crassiceps</i> –ratón	51
IV.23	Tipificación de inmunoglobulinas por el método de ELISA.	53
V	Resultados	55
V.1	Actividad de Glutación S-transferasa en el metacéstodo de <i>Taenia solium</i>	55
V.2	Peso molecular del monómero y de la forma dimérica de GST nativa de <i>T. solium</i>	55
V.3	Parámetros cinéticos de la GST de metacéstodo de <i>T. solium</i> (fGSTTs)	59
V.4	Actividad de la fGSTTs sobre distintos sustratos y sensibilidad a inhibidores	60
V.5	Comparación inmunológica de la GST de <i>T. solium</i> con GSTs de otras especies	61

V.6	Inmunolocalización de la enzima en la larva de <i>T. solium</i>	62
V.7	Secuencia amino terminal de la GST nativa de <i>T. solium</i>	64
V.8	Obtención por PCR, de fragmentos del gen que codifica para la GST de <i>T. solium</i> y secuenciación	65
V.9	Aislamiento de clonas de una biblioteca de ADNc de metacéstodo de <i>T. solium</i>	67
V.10	Restricción de clonas de ADNc	68
V.11	Secuenciación de la clona y alineamiento múltiple con GSTs de helmintos y cerdo	70
V.12	Southern blot	72
V.13	Clonación en el vector de expresión pTRC99A	73
V.14	Expresión y caracterización de la GST recombinante de <i>T. solium</i>	74
V.15	Ensayos de protección en el modelo <i>T. crassiceps</i> –ratón	78
V.16	Respuesta inmune humoral de los ratones en los ensayos de protección	84
VI	Discusión	86
VII	Conclusiones	101
VIII	Perspectivas	102
IX	Referencias	103
X	Anexos	116

## RESUMEN

La taeniosis y la cisticercosis causadas por *Taenia solium* son parasitosis que representan un problema de salud en la población humana y porcícola. La vacunación contra la cisticercosis porcina es considerada una de las estrategias para el control de estas parasitosis. Una de las formas usadas para seleccionar antígenos que induzcan una respuesta inmune protectora es la búsqueda de biomoléculas indispensables para la sobrevivencia del parásito. La enzima Glutación S-transferasa ha sido usada como antígeno en ensayos de protección, debido a su participación en la detoxificación de sustancias generadas por radicales libres de oxígeno. En este trabajo se purificó una fracción con actividad de GST a partir de un extracto crudo de cisticerco (fGSTTs). Esta fracción está constituida por dos formas de GST de peso molecular de 26 y 28 kDa. La secuencia amino terminal y características metabólicas la ubican como GST clase  $\mu$ . La fGSTTs posee capacidad detoxificante sobre hidroperóxidos lipídicos y carbonilos citotóxicos. La proteína se encuentra formando un gradiente desde las células protonefridiales hasta el tegumento del cisticerco. Inmunológicamente se encuentra relacionada con GSTs de varias especies del género *Taenia*, pero no con GSTs de mamíferos. Se clonó y expresó el ADNc que codifica para la GST de 26 kDa. Esta proteína recombinante por su actividad y secuencia fue clasificada como una GST de clase  $\mu$ . La fGSTTs, las formas monoméricas de 26 y 28 kDa de GST puras y la GST recombinante, se usaron en ensayos de protección en el modelo de cisticercosis *T. crassiceps*-ratón. La fGSTTs indujo una respuesta inmune protectora capaz de reducir la carga parasitaria en un 90%, las formas de 26 y 28 kDa inducen niveles de protección del 50 y 74% respectivamente, mientras que la GST recombinante solo 25%. El tipo de respuesta inmune protectora es compatible con el tipo TH1. Estos hallazgos proveen evidencias de que la GST de *Taenia solium* puede ser un antígeno candidato para ser usado en ensayos de protección contra la cisticercosis en cerdos.



## ABSTRACT

The taeniosis and the cysticercosis caused by *Taenia solium* represents a health problem on the human and porcine population. The vaccination against the porcine cysticercosis is one of the strategies for the control of these infections. One of the ways used to select protective antigens is the search of indispensable biomolecules for the survival of the parasite. The enzyme Glutathione S-transferase is considered a target antigen for immunoprotection due to its role in the detoxification of toxic substances generated by free oxygen radicals. In this work we purified a fraction with GST activity from cysticerci crude extract (fGSTTs). Two GST forms with molecular weight of 26 and 28 kDa constitute this fraction. The N-terminal sequence and metabolic characteristics locate it as mammalian  $\mu$  GST class. The fGSTTs can detoxify lipid hydroperoxides and secondary products of lipid peroxidation. The protein is located in the tegument, throughout the parenchyma, in the cytoplasm of protonephridial and tegumentary cytons of the cysticercus. Immunological relationship was found with GSTs from parasites of the *Taenia* genus, but not to mammalian GSTs. The entire coding region of the 26 kDa *T. solium* GST (GSTrTs) was cloned into the pTRC99A expression vector. The GSTrTs showed biochemical and N-terminal sequence homologies with the mammalian  $\mu$  GST class. The fGSTTs, the 26 and 28 kDa GST monomeric forms and the GSTrTs were used in protection trials in the cysticercosis model *T. crassiceps* - mouse. The fGSTTs was capable of conferring a 90% of reduction in the number of cysticerci, the forms of 26 and 28 kDa induce protection levels of the 50 and 74% respectively, while the GSTrTs 25%. The profile of the immune response against the enzyme was compatible with the TH1 type. These findings suggest that the GST of *Taenia solium* is an interesting target for protection trials against the porcine cysticercosis.

## Abreviaturas

°C	grados centígrados
10X	diez veces la concentración
2X	dos veces la concentración
A	adenina
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BSA	albúmina sérica bovina
C	citosina
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
Ci	curie
cm <sup>-1</sup>	1/centímetro
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
ddATP	trifosfato de didesoxiadenosina
ddCTP	trifosfato de didesoxicitidina
ddGTP	trifosfato de didesoxiguanosina
ddNTPs	trifosfato de didesoxiribonucleósidos
ddTTP	trifosfato de didesoxitimidina
dNTPs	trifosfato de desoxiribonucleósidos
DTT	ditiotreitól
EC	extracto crudo
ECMTs	extracto crudo del metacéstodo de <i>Taenia solium</i>
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
fGSTTs	fracción de glutatión S-transferasa de <i>Taenia solium</i>
Fig	figura
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	gramo
g	gravedad
G	guanina
GSH	glutatión reducido
GST	glutatión S-transferasa
GSTrTs	glutatión S-transferasa recombinante de <i>Taenia solium</i>
IgA	inmunoglobulina clase A
IgE	inmunoglobulina clase E
IgG	inmunoglobulina clase G
IgG <sub>2A</sub>	inmunoglobulina clase G subclase 2A
IPTG	isopropil tio-β-D-galactosidasa
kDa	kilodaltones
L	litro
λ	longitud de onda
M	molar
mg	miligramos

min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
mM <sup>-1</sup>	1/milimoles
mmol	milimol
N	normal
NADPH	fosfato de nicotinamida adenín dinucleótido reducido
nm	nanómetro
pb	pares de bases
PBS	solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial hidrógeno
PM	peso molecular
pm	picomoles
PMSF	fluoruro de p-Fenil metilsulfonilo
PVDF	fluoruro de polivinilideno
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundos
T	timina
TAE	amortiguador de Tris-acetato y EDTA
TE	amortiguador de Tris-HCl y EDTA
TLCK	N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona
U	unidades
U/mL	unidades por mililitro
v/v	volumen a volumen
$\Delta\epsilon$	coeficiente de extinción
$\alpha\text{S}^{35}$	azufre 35 alfa
$\mu\text{Ci}$	microcurie
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micrómetro

# I INTRODUCCION

## I.1 Taeniosis y cisticercosis causada por *Taenia solium*

En México la taeniosis causada por el estadio adulto de *Taenia solium* y la cisticercosis humana y porcina causada por la larva de este helminto, son parasitosis que representan tanto un problema de salud pública como económico. (Acevedo, 1982; Larralde y cols.; 1992; Tsang y Wilson 1995).

El hombre es el único hospedero definitivo natural de *Taenia solium* y adquiere la taeniosis al ingerir carne de cerdo cruda o mal cocida parasitada con metacéstodos viables, la ingestión de carne infectada con metacéstodos da origen a la *Taenia* adulta en el intestino delgado, ahí madura y produce huevos, los cuales son liberados en las heces (Malagón, 1989).

La cisticercosis es la enfermedad causada por el establecimiento del metacéstodo de *Taenia solium* (cisticerco) en los tejidos del hombre y del cerdo, siendo este último el hospedero intermediario natural, mientras que el hombre es considerado hospedero accidental. Esta enfermedad se adquiere al ingerir huevos de *Taenia solium* que son expulsados en las heces de un portador del parásito adulto. Con ayuda de los jugos gástricos, la oncosfera se libera de los huevos y se activa (Molinari y cols., 1988), migra y se establece en algún tejido del cuerpo del hospedero donde se desarrolla en metacéstodo. En el cerdo, la infección se facilita por sus hábitos coprofágicos y en el hombre al ingerir alimentos o agua contaminados con heces de individuos teniósicos (Cox, 1982).

A pesar de que los estudios epidemiológicos no han sido sistemáticos, los datos disponibles en publicaciones científicas indican que la frecuencia de taeniosis en nuestro país en las últimas décadas varía entre el 0.2 al 3.4% (Sarti, 1997) y los datos de las autoridades de salud notifican un promedio anual de 13000 casos entre 1986 y 1990 mientras que a partir de 1991 dicho promedio se ha sostenido en 8000 casos en promedio (Secretaría de Salud, 1996).

Para la cisticercosis humana las estadísticas oficiales disponibles reportan 500 casos anuales como promedio, variando la seroprevalencia positiva entre el

0.1 al 12% dependiendo de la región estudiada y la técnica diagnóstica empleada (Sarti, 1998)

La forma de cisticercosis más grave es aquella en la que el metacéstodo se desarrolla en el sistema nervioso central, lo que dependiendo de la localización, número, estado y tipo de parásitos puede ser asintomática, causar graves trastornos incluyendo la muerte (Zenteno, 1982; Del Bruto y Sotelo, 1988). La neurocisticercosis es la principal causa de epilepsia tardía en nuestro país con un 50% de frecuencia (Medina, 1990).

En ambas enfermedades existe un subregistro de los casos ya que pocas de las instituciones que prestan servicios de salud a población abierta cuentan con la infraestructura que les permita realizar un diagnóstico preciso, por lo que es muy probable que estas cifras sean mayores.

Aunque la situación real actual de la cisticercosis porcina no está totalmente identificada en cuanto a su magnitud, se han reportado infecciones que van desde el 0.2% en rastros y hasta el 25% en animales de crianza rústica, existiendo también subregistros al respecto pues existen lugares en que no se reporta de manera oficial (Acevedo, 1982; Aluja, 1982; Sarti, 1989; Molinari y cols., 1993; Molinari y cols., 1997).

## **I.2 Control de la cisticercosis y taeniosis causadas por *T. solium***

Evidentemente, el cortar el ciclo de vida del parásito (Figura 1) en cualquiera de sus etapas, posibilitaría disminuir la incidencia de ambas enfermedades parasitarias.

Las dos grandes posibilidades son matar al parásito una vez que este se ha establecido en sus hospederos o, evitar el establecimiento del parásito en ellos.

En el primer caso la opción es la quimioprofilaxis con fármacos contra el metacéstodo o el adulto de *Taenia solium*, en el segundo caso la prevención puede lograrse mediante el uso de mejores prácticas higiénicas, mejorando la crianza de cerdos o con la utilización de vacunas.

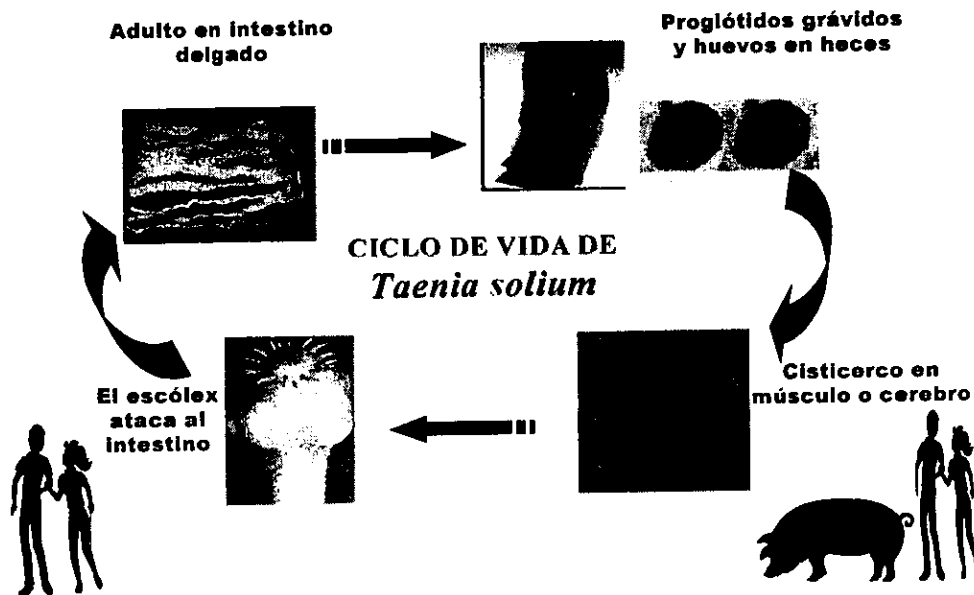


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

### I.2.1 Quimioterapia

La quimioterapia contra la forma adulta de *Taenia solium* es una alternativa propuesta por la Organización Mundial de la Salud para controlar a corto plazo el binomio taeniosis-cisticercosis basándose en que el hombre es el único hospedero definitivo, que los individuos teniósicos son la única fuente de infección para el hospedero intermediario (cerdo) y para el hombre mismo, además que no existen reservorios silvestres diferentes a los cerdos y que se dispone de fármacos efectivos en contra del parásito. (Flisser y cols., 1990; Pawlowski, 1991; Shantz y cols., 1993; OPS, 1997; Flisser y cols., 1997)

En México se han realizado estudios en comunidades rurales evaluando esta estrategia, los resultados muestran heterogeneidad en cuanto al valor de su aplicación, encontrando en dos casos que la taeniosis disminuyó a corto plazo y de manera temporal después de administrar masivamente tratamiento tenicida con praziquantel (Díaz y cols., 1991; Sarti, 1998), mientras que en otro caso la

cisticercosis porcina aumentó después de administrar el mismo fármaco a la población humana (Keilbach y cols., 1989).

Un riesgo de esta estrategia es que en ocasiones se agravan los síntomas de neurocisticercosis cuando no está previamente diagnosticada, además, esta estrategia, para considerarla efectiva se requiere que sea aplicada al total de los individuos, es decir, que sea masiva (OPS, 1997; Lightowlers, 1999).

Por otro lado, la resistencia a fármacos es un serio fenómeno que se incrementa en un gran número de enfermedades parasitarias, así mismo, la posibilidad de reinfección también es una desventaja de esta estrategia. Aunado a lo anterior, los costos asociados al desarrollo de nuevos fármacos son altos, lo cual hace voltear los ojos hacia otras estrategias, que combinadas con estas, puedan coadyuvar al control del binomio taeniosis-cisticercosis (Smith, 1992; Lightowlers, 1999).

## **I.2.2 Educación para la salud y mejores condiciones sanitarias**

Para el control a largo plazo la Organización Panamericana de la Salud ha planteado implementar una mejor educación para la salud, modernización de las prácticas de cría de cerdos, eficiente inspección de carne, acceso a facilidades sanitarias adecuadas, aumento de infraestructura para la detección y tratamiento de teniósicos (OPS, 1997; Chantz y cols., 1993).

Algunas de estas medidas son aplicables para el control de otras enfermedades, por ejemplo, en América Latina para eliminar el riesgo del cólera, el costo es de más de 200 billones de dólares. Recursos que no son posibles canalizar con tal fin a pesar de que el cólera es una enfermedad calificada como terrible y que amenaza la vida (OPS, 1997). La pregunta entonces es: ¿será posible invertir esta suma para el control de la taeniosis-cisticercosis ?

En un estudio realizado en una zona rural de México, se implementó una intervención basada en educación para la salud y se evaluó el impacto que tuvo tanto en la reducción de la taeniosis como en la cisticercosis porcina a los 6 y a los

36 meses después de la intervención. Los resultados indican que tanto a los 6 como a los 36 meses después de la intervención hubo reducciones importantes tanto en la taeniosis como en la cisticercosis porcina. Sin embargo, durante el periodo de evaluación en la zona de estudio coincidió una campaña de prevención del cólera y un programa de mejoramiento del ganado porcino, por lo que los resultados no pueden ser atribuidos totalmente a la campaña diseñada para resolver el problema de la taeniosis-cisticercosis (Sarti, 1998). Una de las ventajas de estas estrategias es, precisamente, que los beneficios obtenidos tendrían impacto positivo para más de una parasitosis, sin embargo, como desventaja se señala que la transmisión podría seguir presentándose debido a la migración de la población y requiere de un avance económico nacional muy alto (Lightowlers, 1999).

### **I.2.3 Vacunación**

#### **I.2.3.1 Vacunación contra cisticercosis causada por *Taenia solium*.**

Se sabe que los metacéstodos son susceptibles a la eliminación por la respuesta inmune y que en diferentes momentos de la infección tanto la inmunidad mediada por anticuerpos y la inmunidad celular representan un papel efectivo en contra de ténidos (Soulsby y Lloyd, 1982; Bojalil y cols., 1993; Lightowlers y cols., 2000).

El cerdo es un animal cuyo tiempo de vida es relativamente corto ya que se cría para su consumo y una vacuna para usarse en ellos no requeriría que confiriera protección de muy larga duración por lo que una vacuna contra la cisticercosis se considera que sería una herramienta útil para romper el ciclo de vida de *T. solium*.

Extractos crudos de metacéstodos de *T. solium* usados como antígenos para proteger cerdos contra retos experimentales con huevos del parásito lograron reducir en un 85% la implantación de metacéstodos, de los metacéstodos



implantados en los animales inmunizados el 40% estaban destruidos y el resto en diferentes estados de degeneración (Molinari y cols., 1983). Otro experimento utilizando también extracto crudo del parásito confirma el reporte de altos niveles de protección en cerdos contra la cisticercosis porcina (Nascimento, 1987).

En una zona endémica de cisticercosis porcina en México, la inmunización de cerdos con extracto de metacéstodo de *T. solium*, logró reducir, después de un año de inmunización sistemática, la frecuencia de cisticercosis porcina del 5.4% al 0% (Molinari y cols., 1993; Molinari y cols., 1997).

También se ha intentado la protección cruzada, utilizando antígenos de líquido vesicular y proteínas semipurificadas de *T. crassiceps*, al inmunizar 6 cerdos, obtuvieron un 48 y 96% de protección respectivamente (Manoutcharian y cols., 1996).

Dos aspectos de estos datos son relevantes, primero, es evidente que en el extracto parasitario hay componentes antigénicos que son capaces de despertar una respuesta inmune protectora en el cerdo, lo cual hace factible la utilización de una vacuna contra la implantación de esta fase del parásito. Segundo, actualmente su utilización masiva es inviable ya que el material parasitario utilizado como antígeno es imposible conseguirlo en las cantidades requeridas para tal fin. Por ello se hace necesario la identificación y producción de antígenos cuya fuente de abastecimiento no sea directamente el parásito

Recientemente una mezcla de antígenos recombinantes, utilizado con éxito para la protección de borregos contra *T. ovis*, fue usado en el modelo *T. solium* – cerdo y aunque fue realizado con una pequeña cantidad de cerdos los resultados son prometedores (Plancarte y cols., 1999)

### **I.2.3.2 Vacunación contra cisticercosis causada por otras especies del género *Taenia***

La necesidad de contar con esquemas de vacunación contra la cisticercosis causada por diferentes especies del género *Taenia* ha llevado a la comunidad científica a la utilización de antígenos de diferente origen.

Se ha demostrado que se puede inducir resistencia a la cisticercosis causada por la larva de *Taenia saginata* por una infección previa (inmunidad concomitante) o cuando se utilizan extractos del parásito como antígeno (Gallie y Sewell, 1972; Rickard y Brumley, 1981).

Con una mezcla de dos antígenos oncosferales recombinantes de *T. saginata* se induce una protección del 99.8% contra la infección experimental con huevos del parásito en ganado bovino (Lightowlers y cols., 1996).

En otros hospederos de ténidos también se han obtenido distintos grados de protección usando antígenos no obtenidos directamente del parásito, un ejemplo es la protección obtenida (75-94%) con proteínas oncosferales recombinantes provenientes de *Taenia ovis* en un modelo en borregos. (Johnson y cols., 1989).

Esta vacuna en particular, la cual se puede producir a gran escala, ha pasado las pruebas de calidad necesarias para poderse aplicar a la población de ganado bovino y actualmente está disponible de manera comercial como péptido recombinante, sin embargo los criadores de ganado ovino no la han incorporado a sus esquemas básicos de vacunación, entre otras razones, por el costo que representa (Rickard y cols., 1995; Dempster y cols. 1996)

En la cisticercosis murina causada a ratas por *Taenia taeniaeformis* al usar una proteína recombinante oncosferal de este parásito, se logran niveles de protección del 95% (Ito y cols., 1991).

La cepa ORF de *Taenia crassiceps* es capaz de desarrollarse y proliferar fácil y rápidamente en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c de manera experimental (Freeman, 1962; Smith y cols., 1972) , así mismo se ha demostrado la reactividad y protección cruzada entre *T. solium* y *T. crassiceps* (Larralde y cols., 1989; Sciutto y cols., 1990) por lo que este modelo de cisticercosis es muy usado para probar, de manera primaria, antígenos candidatos en ensayos de protección.

En este modelo de protección (*T. crassiceps*-ratón) se han ensayado varios antígenos: extracto crudo de *T. solium* y *T. crassiceps* (Sciutto y cols., 1990), proteínas purificadas de *T. crassiceps* (Valdés, 1994), antígenos recombinantes de

*T. crassiceps* (Manoutcharian y cols., 1996), plásmidos conteniendo la secuencia nucleotídica que codifica para antígenos de *T. crassiceps* (Rosas y cols., 1998), epítopes antigénicos tipo T de *T. crassiceps* fusionados a la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y expresados en fagos (Manoutcharian y cols., 1999), péptidos sintéticos (Toledo y cols., 1999). Todos con resultados que ubican a los antígenos ensayados como posibles candidatos a una vacuna en el modelo natural *T. solium* – cerdo. Sin embargo se ha considerado que los resultados en este modelo son inconsistentes y que solo en el modelo *T. solium*-cerdo se puede realmente evaluar el valor protector de un antígeno (Lightowlers y cols., 2000).

Estos ejemplos ponen claramente de manifiesto que, con moléculas altamente específicas del parásito que puedan ser obtenidas en cantidades suficientes y con la pureza necesarias, es posible obtener una vacuna contra la cisticercosis causada por cada una de las especies del género *Taenia*.

Igualmente esta información pone de manifiesto que es factible que a partir de evaluar en modelos heterólogos los distintos antígenos candidatos es posible seleccionar los que potencialmente puedan ser útiles en el modelo homólogo respectivo, es decir, antígenos evaluados con éxito en el modelo *T. crassiceps* – ratón pudieran ser útiles en el modelo *T. solium* –cerdo.

### **I.2.3.3 Selección de antígenos para vacunación.**

Antígeno, adyuvante, tiempos y ruta de inmunización son aspectos a considerar al momento de elaborar una vacuna. La selección del antígeno es la primera etapa e implica considerar la posibilidad de utilizar el parásito completo vivo atenuado o muerto, un extracto total del parásito, una fracción semipurificada o purificada extraída del parásito, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos o epítopes expresados en diferentes sistemas. Una vez seleccionado el antígeno el siguiente evento es realizar los ensayos de protección utilizando distintos esquemas de inmunización y adyuvantes.

En el caso de parásitos y sobre todo con aquellos que no se pueden multiplicar en cultivo, como es el caso de los helmintos, usar los parásitos o componentes extraídos directamente de ellos solo se puede hacer de manera

experimental, por lo que la estrategia de usar componentes purificados, susceptibles de producirse de manera recombinante o de sintetizarlos es una aproximación factible, este concepto se basa en el hecho de que la inmunidad protectora es el resultado de una estimulación inmune por uno o por pocos antígenos presentes en los parásitos (Smith, 1992).

La selección racional de antígenos candidatos para vacunación a partir de organismos tan complejos como los helmintos es difícil, por lo que es necesario conocer a fondo los mecanismos que estos parásitos emplean para evadir las defensas del hospedero y los mecanismos que el hospedero emplea para resistir a la infección, cosa que, no en todos los casos es posible, sin embargo una estrategia es utilizar anticuerpos con actividad antiparasitaria presente en suero de pacientes inmunes a la infección para identificar antígenos candidatos. Otra estrategia es utilizar sistemas que permitan evaluar la respuesta inmune de tipo celular en respuesta a algunos antígenos candidatos (Smith, 1992).

Otra estrategia utilizada es seleccionar biomoléculas que sean vitales para el parásito, ya sea aquellas que forman parte de su metabolismo normal o aquellas involucradas en la evasión de la respuesta inmune del hospedero.

### **I.3 Enzimas detoxificantes como mecanismo de defensa de helmintos**

Como es sabido, varios helmintos permanecen en su hospedero por tiempo indefinido, lo cual logran gracias a la capacidad que tienen de evadir los mecanismos de defensa que contra el, monta el hospedero, uno de estos mecanismos es la utilización de enzimas antioxidantes que le permiten metabolizar los radicales de oxígeno producidos por los leucocitos (Brophy y Pritchard, 1992).

Como respuesta a la presencia de agentes extraños, algunas células del proceso inflamatorio llevan a cabo un fenómeno llamado estallido respiratorio, el cual implica la producción y excreción de sustancias tóxicas como radicales de

oxígeno, entre otros el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos (Johnston y Kitagawa, 1985).

Estos intermediarios reactivos de oxígeno (IROs) son capaces de causar daño a membranas lipídicas o dañar proteínas y ácidos nucleicos si logran entrar en contacto con ellos. Los hidroperóxidos lipídicos formados pueden convertirse en carbonilos citotóxicos, ambas entidades químicas pueden tener efectos adversos más agresivos, que los causados por sus precursores, sobre las biomoléculas mencionadas (Brophy y Pritchard, 1992).

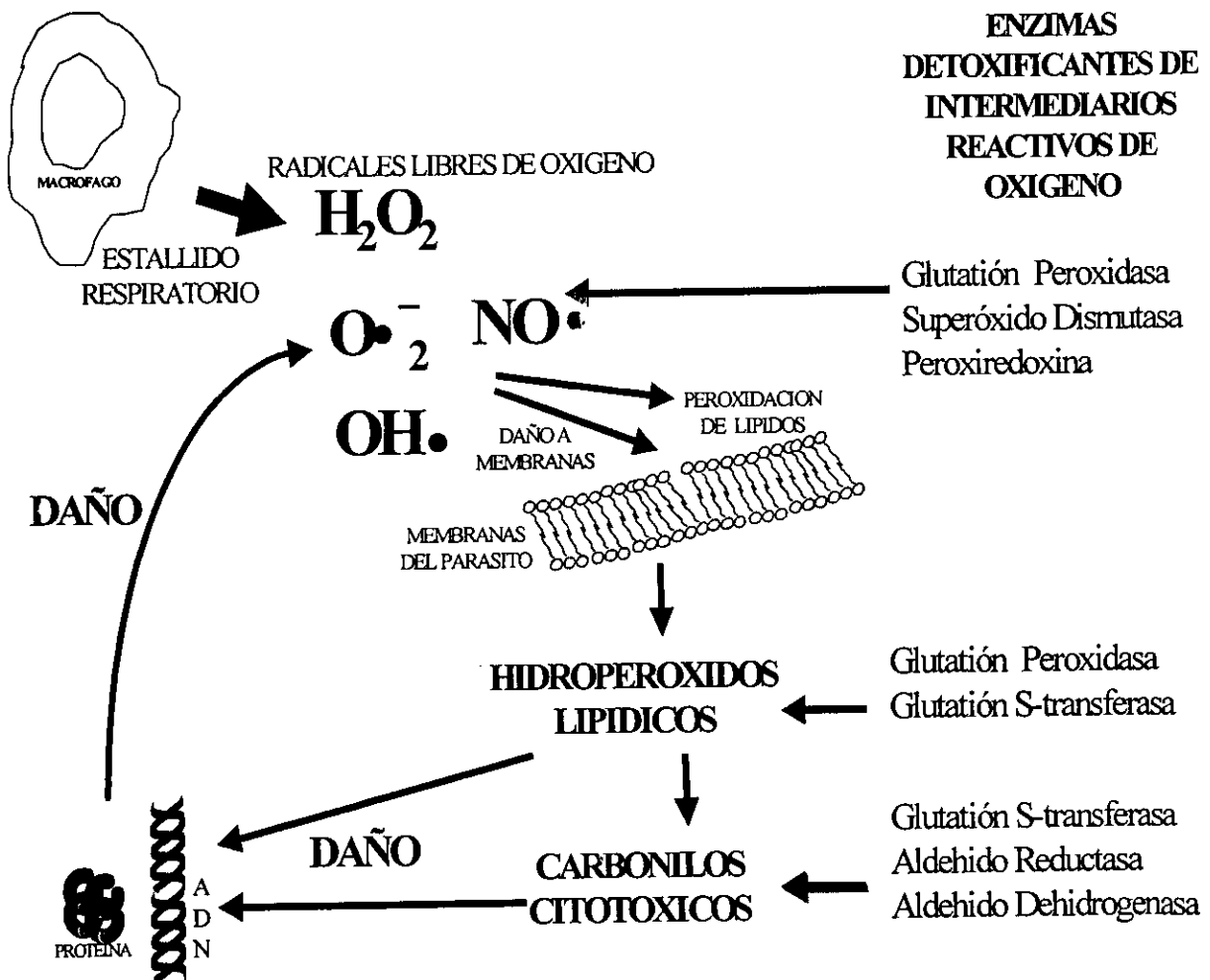


Figura 2. Estallido respiratorio de macrófagos, intermediarios reactivos de oxígeno (IROs) que se forman, daños que causan y enzimas de origen parasitario que intervienen en la detoxificación de IROs.

A partir de fines de la década pasada se han empezado a caracterizar enzimas de helmintos que están involucradas en la protección del parásito contra radicales libres derivados del metabolismo del oxígeno del hospedero, entre ellas la Superóxido dismutasa, Glutación peroxidasa, Glutación S-transferasa, Glutación reductasa, Peroxiferredoxina (Leid y cols., 1989). Esto con el fin de evaluar su potencial como antígenos efectivos en esquemas de protección.

Como se observa en la Figura 2, las enzimas parasitarias del sistema de detoxificación de IROs actúan a diferentes niveles, la Superóxido dismutasa actúa sobre el radical Superóxido, convirtiéndolo en Peróxido de Hidrógeno que es metabolizado por la Glutación peroxidasa o por la Peroxiredoxina.

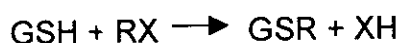
Si se forman hidroperóxidos lipídicos la Glutación S-transferasa y la Glutación peroxidasa forman la segunda línea de defensa, pero si se forman carbonilos citotóxicos entran en juego enzimas del tercer nivel, entre ellas la Glutación S-transferasa, Glutación reductasa y Aldehído reductasa (Brophy y Pritchard, 1992).

## **I.4 La enzima Glutación S-transferasa**

### **I.4.1 Generalidades**

Las Glutación S-transferasas (GSTs; EC 2.5.1.18) son una superfamilia de enzimas multifuncionales diméricas que conjugan el azufre de la cisteína de Glutación reducido (GSH:  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) a centros electrofílicos de compuestos orgánicos hidrofóbicos que pueden ser proveídos por un átomo de carbón, nitrógeno o azufre. Estos conjugados se hacen más solubles, facilitándose su eliminación de las células (Wilce y Parker., 1994; Hayes y Pulford, 1995)

La reacción general que cataliza esta enzima es la siguiente:



Esta reacción es una de las primeras etapas de la vía del ácido mercaptúrico, en la cual los xenobióticos hidrofóbicos (sustancias químicas que no

tienen utilidad metabólica y que pueden ser tóxicos) son inactivados y eliminados del organismo (Habig y cols., 1974; Precious y Barret, 1989)

La actividad enzimática de la GST descrita en 1961 por dos grupos independientes ha sido intensamente estudiada (Combes y Stakelum, 1961; Booth y cols., 1961).

Las GSTs son consideradas vitales para el metabolismo efectivo de detoxificación de xenobióticos electrofílicos en una gran variedad de organismos (Hayes y Pulford, 1995).

Además, estas enzimas pueden detoxificar compuestos tóxicos producidos endógenamente, incluyendo los productos secundarios de la peroxidación de lípidos (Ketterer y cols., 1988)

Los substratos realizan tres diferentes tipos de reacción con el GSH, llamadas conjugación a GSH, conjugación a hidroperóxidos e isomerización de doble enlace.

Ejemplos del primer tipo de substratos son: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) considerado el substrato universal de las GSTs, 1,2-dicloro-4 nitrobenceno (DCNB), 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi) propano (EPNP) y 4-hidroxi non-2-enal (HNE). Hidroperóxido de cumeno (CuOOH) e hidroperóxidos de terbutilo (tBuOOH) son ejemplos substratos del segundo tipo, esta actividad enzimática se conoce de Glutación peroxidasa independiente de Selenio. Finalmente,  $\Delta^5$ androsteno-3,17-diono (ADO) representa un substrato para una reacción de isomerismo tipo doble enlace (Ketterer y cols., 1988).

La enzima liga con alta afinidad a esteroides, bilirrubina, grupo hemo, carcinógenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, dexametasona y numerosos aniones orgánicos (Mannervik y Danielson, 1988; Pickett, 1989). Los conjugados formados por la reacción de conjugación, son exportados activamente por una bomba dependiente de ATP (Ishikawa, 1992).

Una característica importante de la superfamilia de las GSTs es la existencia de distintas formas con diferente peso molecular y dentro de ellas pueden existir isoformas, las cuales poseen el mismo peso molecular pero presentan diferencias en su estructura primaria y como consecuencia, diferencias

en sus estructuras secundaria y terciaria, influyendo esto en sus características metabólicas, por lo que pueden existir isoformas con diferente habilidad para metabolizar un substrato en particular y con localizaciones específicas. Las principales GSTs de mamíferos son citosólicas solubles con cuatro principales clases independientes, denominadas  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ . Además existen las GSTs ligadas a membranas, microsomales y la C<sub>4</sub> sintetasa (Mannervik y cols., 1985; Meyer y cols., 1991; Dirr y cols., 1994).

La clasificación está basada, además de su localización, en los substratos utilizados, la especificidad de inhibidores, criterios inmunológicos, secuencias de aminoácidos y localización cromosomal. Sin embargo, a pesar de que esta clasificación es suficiente para GSTs de mamíferos, otras GSTs y tipo GSTs, que han sido secuenciadas y caracterizadas a partir de organismos no mamíferos, no pueden ser en ocasiones fácilmente ubicadas en estas clases de GSTs de mamíferos (Snyder y Maddison, 1997).

Las GSTs citosólicas están compuestas de dos subunidades, de aproximadamente 23-28.5 kDa cada una, sin embargo se ha descrito una forma de GST de 13 kDa. Estas subunidades son dimerizadas por interacciones no covalentes y poseen dos sitios activos por dímero, los cuales funcionan independientemente uno de otro. Estas enzimas existen tanto en forma de homodímeros como de heterodímeros. No han sido descritos heterodímeros de diferentes clases (Mannervik, 1985; Tahir y Mannervik, 1986; Manoharan, 1992; Wilce y Parker, 1994).

#### **I.4.2 Presencia de la GST en helmintos**

La actividad enzimática de GST ha sido descrita en extractos crudos de adultos y larvas de varios helmintos como céstodos (*Dipylidium caninum*, *Ligula intestinalis*); trematodos (*Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma margrebowiei*) y nemátodos (*Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Cooperia onchopora*, *Brugia pahangi*, *Onchocerca gutturosa*) (Jaffe y Lambert, 1986; Pemberton y Barret, 1989; Brophy y cols., 1990)



Por otro lado, han sido purificadas por cromatografía de afinidad varias formas de la enzima GST de pesos moleculares que van desde los 23 a los 28.5 kDa. Además, se han purificado isoformas de la enzima en una misma especie de parásito.

Se han aislado los genes que codifican para la GST de varios helmintos y se han expresado como proteínas recombinantes. En el cuadro 1 se muestra una lista de helmintos de los cuales se han purificado una o varias formas de GST, así como los pesos moleculares de ellas entre otras características (Vibanco-Pérez y Landa, 1998).

La presencia de diferentes formas e isoformas de la enzima en la misma especie de parásito está ampliamente documentada, en céstodos *Moniezia expansa* presenta cuatro formas de la enzima (Brophy, Southan y Barret, 1989), mientras que *Schistocephalus solidus* presenta varias isoenzimas (Brophy y cols., 1989).

En nemátodos tenemos ejemplos como el de *Diriofilaria immitis*, la cual presenta una forma microsomal y otra citosólica (Jafe y Lambert, 1986), el adulto de *Heligmosomoides polygyrus* presenta dos formas y cuatro isoformas (Brophy y cols., 1994). En *Onchocerca volvulus* se han descrito dos formas con diferente especificidad a substratos (Liebau, Wildenburg y cols., 1996) y *Trichinella spiralis* presenta dos formas y tres isoformas (Rojas y cols., 1997)

Dentro de los tremátodos, cuatro especies del género *Schistosoma* (*bovis*, *haematobium*, *japonicum* y *mansoni*) presentan dos formas, una de 26 y otra de 28 kDa y cada una de estas formas presenta isoformas (Trottein y cols., 1992). Particularmente *S. mansoni* contiene al menos 5 isoformas que representan entre el 2 y 4% de la proteína soluble de los gusanos machos (O'leary y cols., 1992). Para *Fasciola hepatica* se han reportado hasta 8 isoenzimas cuatro de las cuales han sido clonadas (Brophy y Barret, 1990; Miller y cols., 1994; Rossjohn y cols., 1997).

Estos ejemplos de la abundancia de formas e isoformas sugieren fuertemente la heterogeneidad de funciones metabólicas que cumple esta enzima en los organismos mencionados.

### CUADRO 1

Glutación S-transferasas de Helmintos parásitos purificadas por cromatografía de afinidad, relación con GSTs de mamíferos y capacidad de detoxificación.

GSTs provenientes de:	Forma Monomérica PM (kDa)	Relación con clases de GSTs de Mamíferos	Actividad con hidroperóxidos*	Actividad con carbonilos reactivos <sup>&amp;</sup>
<b>CESTODOS</b>				
<i>Echinococcus granulosus</i>	24	μ	NR	NR
<i>Echinococcus multilocularis</i>	25.5	μ	+	+
<i>Hymenolepis diminuta</i>	24	NR	NR	NR
<i>Moniezia expanza</i>	24.5	μ α	+	+
<i>Schistocephalus solidus</i>	24	μ	+	+
<b>TREMATODOS</b>				
<i>Fasciola hepatica</i>	26, 26.5	μ	+	+
<i>Schistosoma bovis</i>	26, 28	NR	NR	NR
<i>Schistosoma haematobium</i>	26, 28	NR	NR	NR
<i>Schistosoma japonicum</i>	26, 28	α μ	+	+
<i>Schistosoma mansoni</i>	26, 28	α μ π	+	+
<b>NEMATODOS</b>				
<i>Ascaris summ</i>	24, 25, 26	α μ	+	+
<i>Dirofilaria immitis</i>	28	NR	+	ND
<i>Haemonchus contortus</i>	23, 23.5, 24	α	NR	+
<i>Heligmosomoide polygyrus</i>	23, 24	α	NR	NR
<i>Onchocerca volvulus</i>	24	π	+	+
<i>Trichinella spiralis</i>	28, 28.5	NR	+	NR

+ = Actividad presente    NR = No reportada    ND = No detectada  
 \* = Al menos un Hidroperóxido lipídico    & = Al menos un carbonilo reactivo

#### I.4.3 Localización de la enzima GST en Helmintos

En el céstodo *Echinococcus granulosus* la GST fue detectada en el parenquima, sin embargo, no se observó ninguna asociación con alguna estructura en particular (Fernández y Hormaeche, 1994).

En *Onchocerca volvulus* la enzima GST fue encontrada en la hipodermis, la pared del receptáculo seminal y espermatozoides (Salinas y cols., 1994). Además, una forma de esta enzima es excretada *in vitro* por el gusano, esta forma

particular de GST es una glicoproteína, la cual posee un péptido señal hidrofóbico en la parte amino terminal, los perfiles de localización correlacionan con su especificidad a substratos (Liebau, Wildenburg y cols., 1996).

En el caso de *Trichinella spiralis* se demostró que en conejos infectados con el parásito, era posible encontrar GST del parásito en circulación (Rojas y cols., 1997). También se sabe que en todos los gusanos examinados de *Ascaris summ* la GST se ha localizado en su intestino (Liebau y cols., 1997).

La enzima GST está asociada al epitelio intestinal del tremátodo *Fasciola hepatica* (Wijffels y cols., 1992) y solo una de las cuatro clonas que codifican para isoformas de GST en este parásito fue localizada en el parenquima y en el intestino del gusano adulto. Esto sugiere que la expresión de las isoenzimas de GST es tejido específica (Creaney y cols., 1995).

En *Schistosoma mansoni* la información disponible es controversial, ya que mientras algunos investigadores encuentran a la GST en el tegumento, células protonefridiales, células del parénquima subtegumental, epitelio esofágico, órganos genitales y células germinales de este parásito, otro grupo solo logró evidenciar su presencia en una subpoblación de células del parenquima en todos los estados de desarrollo del parásito (Porchet y cols., 1994). También se ha sugerido que la proteína es secretada del parásito (Liu y cols., 1996).

En *Fasciola hepatica* esta comprobado que *in vitro* el parásito secreta una forma de GST que participa en un fenómeno de supresión de la respuesta inmune celular en rata y se postula que esta forma de la enzima pudiera jugar un papel importante en la evasión del parásito de la respuesta inmune montada por el hospedero (Cervi y cols., 1999)

Estas evidencias acerca de la distribución de la enzima GST en diferentes estructuras del parásito, su presencia en la interfase hospedero-parásito y el hecho de que se está secretando, indican que esta enzima juega un papel importante en el metabolismo de los parásitos sobre compuestos tóxicos producidos endógenamente por el parásito o de origen exógeno producidos o ingeridos por el hospedero.

#### **I.4.4 Relación entre las GSTs de helmintos y de mamíferos.**

Para las GSTs de helmintos no hay una clasificación establecida, por lo que, cuando se caracteriza bioquímica o genéticamente una forma de GST de parásitos es práctica común tratar de asignarle una clase de GSTs de mamíferos. La clasificación de GSTs de mamíferos está basada en especificidades a substratos e inhibidores, en el uso de métodos inmunológicos y secuencias amino terminal. Sin embargo, las características de las GSTs de helmintos no permite, en ocasiones, incluirla dentro de las cuatro principales clases citosólicas establecidas ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ), por ejemplo las cuatro formas de GSTs descritas para *Moniezia expansa* no muestran una clara relación bioquímica con ninguna de las clases mencionadas, sin embargo la secuencia amino terminal, las ubica entre las clases  $\mu$  y  $\alpha$  (Brophy, Southan y Barret, 1989).

En el mismo sentido, una GST recombinante purificada del céstodo *Echinococcus multilocularis* muestra clara homología en su secuencia con la clase  $\mu$ , sin embargo, el análisis bioquímico no permite una clara clasificación (Liebau, Müller y cols., 1996).

En contraste, *Schistocephalus solidus* posee una forma de GST que bioquímicamente y considerando su secuencia amino terminal puede incluirse claramente en la clase  $\mu$  de las GSTs de mamíferos (Brophy y cols., 1989).

El Cuadro 1 muestra un listado de céstodos, tremátodos y nemátodos en los cuales se han identificado GSTs y su parentesco con las clases de GSTs de mamíferos.

#### **I.4.5 Papel de la GST en la lipoperoxidación**

Los parásitos, como los mamíferos y otros organismos, están en contacto con una gran variedad de moléculas tóxicas como radicales o intermediarios reactivos de oxígeno producidos por el metabolismo endógeno normal, por agentes farmacológicos y por elementos efectores de la respuesta inmune del hospedero, como el estallido respiratorio de macrófagos y otras células. Estas

moléculas pueden causar lipoperoxidación en las membranas celulares, formándose hidroperóxidos lipídicos que pueden ser transformados a carbonilos citotóxicos, causando severos daños a los componentes de las estructuras celulares que eventualmente matan al parásito (Brophy y Barret 1990a, Ketterer y cols., 1988).

En mamíferos, la línea principal de defensa contra estos compuestos es un grupo de enzimas oxidativas, muchas de estas oxidaciones son dependientes del citocromo P-450 y citocromo b<sub>5</sub>.

En platelmintos parásitos y nemátodos, el citocromo P-450 está ausente. La protección ocurre a tres niveles, en el primero, Superóxido dismutasa y Peroxidasas remueven los radicales libres antes del proceso de lipoperoxidación. Una segunda línea de defensa contra la lipoperoxidación es por parte de las enzimas dependientes de Glutación, la Glutación peroxidasa y la Glutación S-transferasa, estas enzimas detoxifican hidroperóxidos lipídicos antes de su transformación a productos secundarios. El nivel final de protección es directamente contra carbonilos citotóxicos y entre otras, la enzima Glutación S-transferasa inactiva estos compuestos (Brophy y Barret, 1990; Brophy y cols., 1990).

Los xenobióticos son compuestos que contienen grupos reactivos que pueden entrar a la segunda fase de conjugación sin entrar previamente, a la primera fases del metabolismo (Pemberton y Barret, 1989).

En el Cuadro 1 se muestra que en todos los grupos de helmintos en los que se ha buscado, se ha encontrado que la enzima GST, presenta actividad específica con al menos un hidroperóxido lipídico y un carbonilo citotóxico. Esto indica que las GSTs de helmintos parásitos están involucradas en la segunda y tercera línea de defensa contra los daños causados por la lipoperoxidación.

#### **I.4.6 Función de unión de GSTs a otros compuestos.**

Las GSTs se pueden unir a un amplio rango de ligandos hidrofóbicos y ser inactivadas. Por ejemplo GSTs de céstodos, nemátodos y tremátodos son

inhibidas *in vitro* por varios compuestos como hematina y sus derivados, ácidos biliares, ácidos grasos, azul de cibacron, cloruro de trifeniltin y bromosulfaleina, estos últimos tres inhibidores son usados para clasificar las GSTs de mamíferos (Brophy, Southan y Barret, 1989; Liebau y cols., 1997; Walker y cols., 1993)

Las GSTs de helmintos presentan la capacidad para unirse a fármacos y algunas veces metabolizarlos. En nemátodos la GST de *Ascaris suum* liga a antihelmínticos tales como albendazol, bitionol y hexaclorofen (Liebau y cols., 1997).

Respecto a céstodos, la principal GST de *Moniezia expansa* une a varios antihelmínticos comerciales pero parece que no puede conjugarlos con GSH (Brophy, Southan y Barret, 1989). La principal GST de *Schistocephalus solidus* puede unir a varios antihelmínticos con excepción del praziquantel (Brophy y cols., 1989).

El mismo fenómeno es observado en cepas de tremátodos del género *Schistosoma*, particularmente *S. mansoni* (Walker y cols., 1993; Kats y cols., 1994). En contraste, los diclorvos (la forma activa de la droga antiesquistosomal metrifonato) sirven como un sustrato para algunas isoformas de GSTs de *S. mansoni* (O'leary y Tracy, 1991)

La GST recombinante de *S. japonicum* en su forma cristalina libre de ligandos y los cristales de la GST de *S. japonicum* unidas a praziquantel evidenciaron una región adyacente a la región de GSH, donde se unen ligandos hidrofóbicos y sustratos xenobióticos.

Praziquantel se une a un sitio específico del dímero, interfiriendo con xenobióticos y sustratos electrofílicos endógenos grandes, los cuales se extienden dentro de la región de unión de praziquantel. Esto no es así con sustratos pequeños, es decir el praziquantel ligado a la molécula de GST actúa como un inhibidor tipo no-sustrato (McTigue y cols., 1995).

Estos hallazgos son importantes ya que algunos fármacos son usadas actualmente en el tratamiento de algunas infecciones causadas por helmintos, como la taeniosis y la cisticercosis.

### I.4.7 Las GSTs de helmintos como antígenos.

Una proteína con las características hasta aquí descritas, se puede considerar importante para el metabolismo de detoxificación y consecuentemente para la supervivencia del parásito. Esta es la razón por la que varias GSTs de helmintos han sido empleadas como antígenos en ensayos de protección en varios modelos de parasitosis (excepto céstodos) empleando una amplia variedad de protocolos. El cuadro 2 resume los resultados de varios ensayos de protección donde las protecciones alcanzadas van desde el 0% hasta el 89%.

La importancia de la enzima y la factibilidad de usarla como antígeno protector fue puesto de manifiesto en un experimento en el cual obtuvieron ratones transgénicos que expresaban la GST de 28 kDa de *S. mansoni*. Si estos ratones transgénicos eran infectados con el parásito la carga parasitaria se incrementaba significativamente respecto a los ratones no transgénicos. En contraste los niveles de IgGs anti GST de 28 kDa de *S. mansoni* en los animales transgénicos eran significativamente más bajos que en los no transgénicos, encontrando los mismo resultados cuando el experimento fue repetido con ratones previamente inmunizados con la GST de 28 kDa de *S. mansoni*. Esto argumenta a favor de que la enzima GST juega un papel central en la viabilidad del parásito (Xu y cols. 1997).

La respuesta inmune contra esta enzima ha sido estudiada principalmente en el tremátodo *Schistosoma*. Por ejemplo, sueros obtenidos de bovinos vacunados subcutáneamente con la GST recombinante de 28 kDa de *S. bovis* y expuesto a *S. mattheei* mostraron títulos altos de IgG e IgA específicas (Grzych, 1998), esto en contraste con lo encontrado al inmunizar oralmente a ratones con GST recombinante de *S. japonicum*, que mostraron altos títulos de IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgM pero no IgA (Yang y cols., 1997).

Ratas inmunizadas intradérmicamente con un plásmido conteniendo ADN que codifica para la GST de 28 kDa de *S. mansoni* produjeron IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> en su suero. El perfil inmunológico fue de tipo Th1, además, el suero de estas ratas

indujo una respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos *in vitro* (Dupre y cols., 1997). Sin embargo, en ratones inmunizados contra esquistosomiasis a través de mucosas usando GST de 28 kDa de *S. mansoni* asociada a liposomas, se promovió una respuesta compatible con el tipo TH2 con presencia de anticuerpos específicos IgA a nivel intestinal e IgG<sub>1</sub> más IgG<sub>2b</sub> en suero (Ivanoff y cols., 1996). Estos datos muestran que la respuesta inmune contra las GSTs de helmintos depende fundamentalmente del modelo animal y el protocolo usado

## CUADRO 2

### Ensayos de protección usando glutatión S-transferasa de helmintos como antígeno

Helminto	Fuente de antígeno	Hospedero	Adyuvante empleado	Vía de inmunización	% de Protección	
<b>NEMATODOS</b>						
<i>H. contortus</i>	Nativa	Cobayo	Freund	s.c.	S/P	
<b>TREMATODOS</b>						
<i>F. hepatica</i>	Nativa	Rata	Freund	s.c.	S/P	
<i>F. hepatica</i>	Nativa	Oveja	Freund	s.c.	57	
<i>F. hepatica</i>	Nativa	Oveja	Freund	s.c.	44	
<i>F. gigantica</i>	Nativa	Oveja	MF59	s.c.	16	
<i>S. matteei</i>	Recombinante de <i>S. bovis</i>	Oveja	Freund	i.m.	50	GA
					89	HH
<i>S. japonicum</i>	Recombinante	Bufalos	Freund	s.c.	22.3	GA
					50	HH
					40	VH
<i>S. mansoni</i>	Recombinante	Ratón	Liposome	Oral	52	GA
					53	Ht
					53	HH
<i>S. mansoni</i>	Recombinante	Monos	MDP	s.c.	74	HH
<i>S. japonicum</i>	Recombinante	Cerdo	Al(OH) <sub>3</sub>	i.m.	28.5	GA
					53.5	HT
<i>S. bovis</i>	Nativa	Bovino	Freund	i.m.	N/P	GA
					56-82	HH

GA=Gusano adulto, HH=Huevos en heces, Ht=huevos en tejidos, HT=huevos totales, VH=Viabilidad de huevos MDP=Muramil dipéptido, i.m.=intramuscular, s.c.= subcutánea



## HIPOTESIS

La enzima Glutación S-transferasa presente en la larva de *Taenia solium* realiza funciones de detoxificación sobre algunos tóxicos para el parásito, al utilizarla como antígeno en su forma nativa o recombinante, se espera, logre inducir una respuesta inmune protectora significativa.

## OBJETIVOS GENERALES

- Purificar y caracterizar la enzima Glutación S-transferasa a partir del metacéstodo de *Taenia solium* (fGSTTs).
- Clonar, caracterizar y expresar ADNc que codifique para la Glutación S-transferasa del metacéstodo de *Taenia solium* (GSTrTs).
- Evaluar la Glutación S-transferasa nativa (fGSTTs) y recombinante (GSTrTs) en ensayos de protección en el modelo *Taenia crassiceps* –ratón.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Purificar GST a partir de un extracto crudo de metacéstodo de *Taenia solium*.
- Determinar las características bioquímicas y los parámetros cinéticos de la GST del metacéstodo de *T. solium* (fGSTTs)
- Obtener una secuencia amino terminal de la GST de larva de *T. solium*.
- Producir anticuerpos específicos contra la GST de larva de *T. solium*.
- Establecer la relación inmunológica entre la GST de *T. solium* y las GSTs de otros helmintos, así como de algunos mamíferos hospederos.
- Determinar la localización de la enzima en el parásito.
- Obtener un fragmento del gen que codifica para la enzima GST de *T. solium* (sonda).
- Aislar clonas que codifiquen para la proteína GST de *T. solium* de una colección de ADNc. del parásito
- Establecer la secuencia de nucleótidos y deducir la secuencia de aminoácidos del gen que codifica para la enzima GST de *T. solium*.
- Establecer el número de genes que codifican para la GST de *T. solium*.
- Insertar en un vector de expresión la región de un ADNc que codifique para la GST de *T. solium*.
- Producir GST recombinante de *T. solium*.
- Caracterizar bioquímica y enzimáticamente la GST recombinante de *T. solium* (GSTrTs)
- Evaluar el grado de protección que se logra al utilizar como antígeno la fGSTTs y GSTrTs en el modelo *Taenia crassiceps* - ratón
- Determinar las características de la respuesta inmune humoral en los ensayos de protección.

## IV METODOLOGIA

### IV.1 Material Biológico

Los metacéstodos o cisticercos de *Taenia solium* se obtuvieron por disección del músculo esquelético de cerdos infectados de manera natural, los metacéstodos de la cepa ORF de *Taenia crassiceps* fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones infectados experimentalmente. Los gusanos adultos de *Taenia saginata* fueron obtenidos de un individuo humano infectado naturalmente y tratado con niclosamida (Yomesan, Bayer) y los gusanos adultos de *Taenia taeniaeformis* cepa MRn y de *T. solium* se recuperaron de infecciones experimentales de gatos y hámsters respectivamente. Los ejemplares de *Schistosoma mansoni* fueron donados amablemente por el Dr. William Casten de la Universidad de Harvard, EUA.

Los hígados frescos de ratones y conejos fueron obtenidos de animales sacrificados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM y de cerdo de una granja porcícola local. Los parásitos en estadio de larva y de adulto así como los tejidos hepáticos obtenidos de la forma descrita fueron lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.4) con antibióticos (1000 U/mL de penicilina y 1000 U/mL de estreptomycin) y fueron guardados a -70°C hasta su uso.

Se utilizaron las cepas *Escherichia coli* JM105 [(supE endA sbcB15 hsdR4 rpsL thiΔ (lac-proAB)] y C600hfl<sup>-</sup> (SupE44,thi<sup>1</sup>, LeuB6, lacY1, tonA21, L-(r<sub>k</sub>,m<sub>k</sub>+)mcrA-,hfl-).

### IV.2 Obtención de extractos crudos

Se pesaron 10 g. de los parásitos o de tejido hepático de cada una de las especies animales utilizadas, se les agregó 50 mL de solución de extracción (6 mL PBS 10X pH 7.4, 0.6 mL de Tritón comercial, 0.6 mL de EDTA 0.5M) más

inhibidores de proteasas (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aprotinina, 0.1mM de TLCK, 2.5mM de EDTA, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de leupeptina, 12mM de 2-mercaptoetanol y 0.006% de PMSF), todo mantenido a 4°C. Se homogeneizaron en un homogenizador de tejidos Polytrón (Brinkmann Instruments) a máxima velocidad, durante un minuto por un minuto de descanso, 3 veces manteniendo la mezcla en hielo.

La suspensión obtenida se centrifugó a 35,000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga TL-100 Beckman. Se colectó el sobrenadante, se hicieron alícuotas y se congelaron a -20°C. A este extracto se le denominó extracto crudo (EC). Específicamente al EC del metacéstodo de *Taenia solium* se denominó ECMTs

### IV.3 Purificación de GST

La purificación de GST a partir de los distintos extractos crudos (ECs) de parásitos y tejido hepático se realizó por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de 2 mL de una matriz de Sepharosa 4B con glutatión reducido (GSH) acoplado (GSH-Sepharosa de la casa comercial Pharmacia, Uppsala, Suecia).

La columna de GSH-Sepharosa se lavó exhaustivamente con PBS pH 7.4, posteriormente se equilibró con 10 ml de una solución de PBS-Tritón 1% (amortiguador de columna). Aproximadamente 10 mL de EC diluido 1:2, previamente con amortiguador de columna y filtrado a través de una membrana milipore de 0.22  $\mu\text{M}$ , fueron aplicados a la columna.

Una vez pasado el EC por la columna, esta se lavó dos veces con 10 mL de PBS pH 7.4 con la finalidad de remover todo lo que no se unió específicamente al GSH. La elución del material unido se realizó con una solución 5mM de Glutatión reducido en 50 mM de Tris HCl pH 8.0, (solución de elución) y se colectaron fracciones de 1 mL a las cuales se les determinó su concentración de proteína a 280 nm y se almacenaron a 20°C hasta su uso.

A la fracción de Glutatión S-transferasa purificada, a partir del extracto crudo de metacéstodos de *Taenia solium* por cromatografía de afinidad en la

columna GSH-Sefarosa 4B, se le denominó fGSTTs y a las restantes simplemente GST.

#### **IV.4 Cuantificación de proteínas**

Las proteínas obtenidas y utilizadas en todos los ensayos, fueron cuantificadas por cualquiera de dos métodos: espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 280 nm, usando como blanco de calibración el amortiguador que contenía la proteína a evaluar en un espectrofotómetro Du 640 Beckman y por el método de Lowry (Lowry 1951), como se describe enseguida. Por duplicado se colocaron en tubos de ensayo 200  $\mu$ L de la muestra y se les agregaron 1 mL de la solución "C" compuesta por 50 partes de la solución "A" ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, NaOH 0.1M Tartrato de sodio y potasio al 2%) más 1 parte de solución "B" ( $\text{CuSO}_4$  0.05%), la mezcla se agitó, después de lo cual se colocó en reposo 10 min a temperatura ambiente. Se le agregaron 100  $\mu$ L de la solución de Folin diluida 1:2 y se dejan reposar 45 min, posteriormente se leyó la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro modelo Du 640 Beckman.

#### **IV.5 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Aproximadamente 100  $\mu$ g de EC de parásitos o 2.5  $\mu$ g de cada muestra o fracción purificada se mezclaron volumen a volumen (v/v) con amortiguador de muestra de Laemmli 2X (SDS 3%, Tris HCl 62.5 mM y 2- $\beta$  mercaptoetanol 5%, pH 6.8) y se hirvieron durante 2 min.

Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 10 o al 12.5% según la resolución deseada de las bandas (Laemmli 1970). Para visualizar las bandas de las proteínas separadas los geles fueron teñidos por cualquiera de tres tinciones: con azul de Coomassie, Plata o Sulfato de Zinc.

En la primera tinción, los geles se sumergieron en una solución de azul de Coomassie (Metanol 50%, azul de Coomassie R-350 0.05%, ácido acético 10%) durante 2 horas, posteriormente se destiñeron con una solución de ácido acético al 10% en agitación a temperatura ambiente hasta que solo las bandas de proteínas se observaron teñidas.

En la tinción con Plata, los geles se colocaron por 10 min en una solución fijadora (Metanol 40%, Formaldehído 0.0185%) con agitación lenta, se desechó la solución fijadora y se lavaron 2 veces con agua durante 5 min con agitación lenta. Se agregaron 50 mL de una solución de Tiosulfato de Sodio al 0.02% y se agitó lentamente 1 min, se desechó esta solución y se lavó nuevamente 2 veces con agua 5 min cada vez. Posteriormente se adicionaron 50 mL de una solución de Nitrato de Plata al 0.1% y se agitó lentamente durante 10 min. Se desechó la solución de Plata y se lavó rápidamente con agua e inmediatamente con un poco de solución reveladora (Carbonato de Sodio 3%, Tiosulfato de Sodio 0.0004%, Formaldehído 1.85%), enseguida se agregaron 50 mL de la misma solución reveladora, se agitó hasta que la intensidad de las bandas fue la adecuada, la reacción se detuvo agregando Acido Cítrico 2.3 M y se lavó con agua.

Para la tercer tinción, los geles se sumergieron durante 15 min en una solución de SDS 0.1 % e imidazole 0.2 M, se desechó esa solución y se enjuagaron rápidamente con agua, posteriormente se agregó una solución de Sulfato de Zinc 0.2 M, agitando hasta observar las bandas de aspecto traslúcido sobre el fondo blanco opalescente, la reacción se detuvo colocando los geles en agua.

#### **IV.6 Ensayos de inmunoelectrotransferencia**

Después de separar los polipéptidos en los geles de poliacrilamida estos fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa.

Los geles, las membranas de nitrocelulosa, papeles filtro del tamaño de los geles, las esponjas de una mini cámara de transferencia marca Biorad, se humedecieron en solución amortiguadora de transferencia (Tris-HCl 25 mM,

Glicina 192 mM, Metanol), posteriormente se colocaron estos elementos en el contenedor de geles de acuerdo al siguiente orden, recomendado por los fabricantes: un par de papeles filtro, sobre ellos el gel, encima la membrana de nitrocelulosa y nuevamente un par de papeles filtro procurando que no quedaran burbujas en ninguno de los casos, después de colocar el contenedor de geles en la cámara (el gel hacia el ánodo) y llenar la cámara con el amortiguador de transferencia se aplicó una corriente de 240 miliamperes durante una hora.

Una vez completada la transferencia, se cortaron tiras de nitrocelulosa de aproximadamente 4 mm conteniendo las proteínas correspondientes y se bloquearon durante 15 min a temperatura ambiente con una solución de PBS con Leche Svelty al 5% y Tween 20 al 0.3%. Posteriormente se agregó el suero o el anticuerpo a evaluar (1<sup>er</sup> anticuerpo) a la dilución adecuada en la misma solución de bloqueo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente; las tiras se lavaron 3 veces durante 5 min cada vez con una solución de PBS con Tween 20 al 0.3% (PBS-Tween).

Se agregó un anticuerpo conjugado a peroxidasa (2<sup>do</sup> anticuerpo) y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min, dicho anticuerpo poseía especificidad para reaccionar con las inmunoglobulinas de la especie a evaluar, la dilución utilizada en cada caso fue la recomendada por el proveedor o la determinada experimentalmente. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y 1 con PBS para posteriormente incubar 5 min a temperatura ambiente en la solución reveladora (Diaminobencidina al 0.02% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%), parando la reacción con agua.

#### **IV.7 Cromatografía de filtración en gel**

Aproximadamente 20 µg de la fracción de GST del extracto crudo de metacéstodos de *Taenia solium* (fGSTTs) o de la GST recombinante en una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.05 M con EDTA 1 mM, se filtraron a través de una columna Superdex 75 HR 10/30 de Pharmacia, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron fracciones de 0.5 mL y se les determinó la



actividad sobre el sustrato CDNB tal como se describe más adelante. Se usaron como marcadores de peso molecular la Ribonucleasa A (12 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa) y albúmina sérica bovina (67 kDa).

#### **IV.8 Producción de anticuerpos policlonales contra GST de *Taenia solium***

Se utilizó un conejo Nueva Zelanda de aproximadamente 2 meses de edad, subcutáneamente se le inyectaron 100 µg de fGSTTs en PBS mezclados volumen a volumen con Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante, a los 0, 15 y 30 días. Después de la segunda inmunización se sangró al conejo para evaluar la producción de anticuerpos anti- fGSTTs, después de la tercera inmunización se obtuvo la mayor cantidad de sangre posible mediante punción cardíaca, el suero sanguíneo se obtuvo mediante centrifugación. El suero obtenido se precipitó con Sulfato de Amonio a una concentración final del 33.3%, después de centrifugar la suspensión a 10000 X g se desechó el sobrenadante y el precipitado se disolvió y dializó exhaustivamente con PBS, se hicieron alícuotas de esta solución de inmunoglobulinas anti la fracción de GST de *Taenia solium* (anti- fGSTTs) y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Con la finalidad de separar exclusivamente los anticuerpos específicos dirigidos contra la banda principal de fGSTTs se cortó la parte de la membrana de nitrocelulosa que contenían aproximadamente 1 mg de la banda que correspondía al peso aproximado de 26 kDa de la fracción, y se incubó a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos anti fGSTTs diluidos 1:50 con PBS-Tween 0.3%.

Posteriormente se lavó la membrana tres veces con PBS-Tween 0.3%, los anticuerpos unidos específicamente a la membrana se eluyeron con 0.5 mL de una solución de glicina 0.2 M pH 2.6, inmediatamente se neutralizó la fracción eluida con 1.3 mL de PBS 10X, pH 7.4. Los anticuerpos así eluidos se dializaron contra PBS, se concentraron por liofilización y se reconstituyeron a una concentración de 0.4 mg/mL para su almacenaje a -20°C hasta su uso. Estos

anticuerpos específicos se denominaron anti-GSTTs (anticuerpos anti la banda de 26 kDa de GST de *Taenia solium*)

#### IV.9 Ensayos de actividad enzimática

En todos los casos la actividad de GST fue medida a una temperatura de 25°C, se usaron 5 µg de la muestra a analizar, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL ajustándolo con solución amortiguadora de reacción (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM y EDTA 1 mM), se utilizó GSH como sustrato, se midió el cambio de absorbancia durante un intervalo de un minuto en un espectrofotómetro Du 640 Beckman y la mezcla de reacción sin enzima se utilizó para calibrar el aparato a 0. En el ensayo de actividad enzimática, dependiendo del segundo sustrato a evaluar se varió su concentración, la concentración de GSH, el pH de la solución amortiguadora de reacción y la lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda específica, estos datos se resumen en la Cuadro 3.

Para realizar el cálculo de actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción descrito en la literatura para cada sustrato (Cuadro 3). Los sustratos con solubilidad limitada en agua se prepararon como soluciones "concentradas" en etanol; la concentración del etanol en el ensayo se mantuvo por abajo del 5% (Habig y cols. 1974, Habig y Jakoby 1981, Brophy, Southan y Barret. 1989).

Con la finalidad de calcular la Km (Constante de Michaelis) y la Vmax (velocidad máxima) de GST se realizaron ensayos como los que se describieron anteriormente, utilizando CDNB como sustrato a diferentes concentraciones, el cálculo de estas constantes se realizó gráficamente.

Para calcular la actividad específica se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta DO / \text{min (cm}^{-1}/\text{min)} \times \text{Volumen total (mL)}}{\epsilon \text{ (mL}/\mu\text{mol} \times \text{cm}^{-1}) \times \text{proteína (mg)}}$$

$$\text{Actividad específica} = \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$$

Donde:

$\Delta DO$  = Incremento de la absorbancia en un minuto

Volumen total = Volumen en que se llevó a cabo la reacción

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción

proteína = cantidad total de enzima en el ensayo

### CUADRO 3.

**Substratos y su concentración, pH del amortiguador de reacción, concentración del cosustrato GSH, longitud de onda y coeficiente de extinción usados en la determinación de la actividad específica de GST.**

Substrato	segundo substrato mM	pH amortiguador	GSH mM	$\lambda$ nm	$\epsilon$ mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
1-Cloro-2,4-dinitrobenceno	1	6.5	1	340	9.6
1,2-dicloro-4-nitrobenceno	1	7.5	5	345	8.5
Bromosulfaleina	0.03	7.5	5	330	4.5
Acido Etacrínico	0.2	6.5	0.25	270	5.0
1,2-Epoxy-3-(p-nitrofenoxi, propano	5.0	6.5	5	330	0.5
Hexa-2,4-dienal	0.050	6.5	2.5	280	-34.2
trans-Non-2-enal	0.025	6.5	1	225	-19.2

Para evaluar la actividad de Glutación peroxidasa de la GST, sobre hidroperóxido de cumeno (selenio independiente) y sobre peróxido de hidrógeno (selenio dependiente) se preparó una mezcla que contenía Azida de Sodio 1 mM, Hidroperóxido de Cumeno o Peróxido de Hidrógeno 0.5 mM, NADPH 0.15 mM, GSH 5 mM y Glutación Reductasa 0.25 mM en un volumen tal de solución amortiguadora de reacción (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM y EDTA 1 mM) que considerando la muestra a evaluar se tuviera un volumen final de reacción de 1 mL. Esta mezcla se monitoreó durante 1 minuto en un espectrofotómetro Du 640 Beckman a una

longitud de onda de 340 nm, inmediatamente se agregaron 5  $\mu\text{g}$  de la muestra de la enzima a evaluar y se monitoreó la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos a 25°C. Para obtener la actividad específica se utilizó el valor de  $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  como coeficiente de extinción, tal como se señala para esta técnica descrita originalmente por Paglia y Valentine (1967) y modificada por Boveris y cols. (1994).

#### **IV.10 Ensayos de inhibición de la actividad enzimática**

La inhibición de la actividad de GST se midió como  $I_{50}$ , considerando esta como la concentración del inhibidor, a la cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática. Se realizaron ensayos de actividad de GST como se describió anteriormente, usando CDNB como sustrato y en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores Bromo osulfaleina (Sigma), azul de Cibacrón (Sigma) y Cloruro de Trifeniltín (Aldrich). La  $I_{50}$  se estimó gráficamente de acuerdo a lo reportado por Mannervik y Danielson (1988).

#### **IV.11 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta**

Se obtuvieron por disección metacéstodos a partir de cerdos infectados naturalmente, estos fueron lavados con PBS e incluidos en Tissue-Tek (Laboratorios Miles, Indianapolis, Indiana) e inmediatamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^\circ\text{C}$ . Se realizaron cortes de entre 6 y 8  $\mu\text{M}$  en un crióstato (Cryo-cut, American Optical Corp.), los cuales se fijaron en acetona durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$  y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. En una cámara húmeda durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ , se incubaron los cortes con anticuerpos específicos anti-GSTTs a una concentración de 0.4 mg/mL en PBS con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% y Tween 20 al 0.05%,

Los cortes fueron lavados suavemente durante 10 min 4 veces, utilizando PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubaron, durante 1 hora a temperatura ambiente, con un segundo anticuerpo anti inmunoglobulinas clase G de conejo hecho en

cabra y conjugado a Isotiocianato de Fluoresceina (FITC) (Sigma) diluido 1:50 en PBS-BSA 1%, Tween 20 0.05%.

Se lavaron los cortes nuevamente de la manera descrita, se montaron en una solución 9 a 1 de Glicerol-PBS y fueron observados y fotografiados en un microscopio con sistema de epifluorescencia (Nikon Optiphot). Como control negativo una serie de cortes fueron incubados con suero normal de conejo como primer anticuerpo. (Grzanna, 1982).

#### **IV.12 Secuenciación amino terminal de proteínas**

Aproximadamente 100 µg de la proteína a secuenciar fue corrida electroforéticamente en gel de poliacrilamida al 12.5% con SDS y transferido a una membrana de PVDF (Immobilon. Millipore), mediante la técnica de degradación de Edman y utilizando un secuenciador de fase gaseosa se determinó la secuencia amino terminal (Hewick y cols., 1981)

#### **IV.13 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

##### **IV.13.1 Obtención de un fragmento con secuencia de GST de *T. solium* (sonda)**

A partir de la secuencia de aminoácidos obtenida para la parte amino terminal de la GST de *Taenia solium* se diseñó uno de los oligonucleótido iniciadores, llamado NH<sub>2</sub>TGST (5'ACNCTNGCNTAYTGGGAYAT3'). El otro oligonucleótido se diseñó a partir de la secuencia consenso del sitio activo de GSTs de otras especies, y se denominó GST-26-3' (5'CATACCGTGCTTGTC NGCDAT3'). Como molde se utilizaron 100 ng de ADNc obtenido a partir de ARNm de metacéstodo de *T. solium* , 50 ng de cada uno de los iniciadores específicos, una concentración final 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada uno de los dNTPs (A, C, G, T), 50 mM de KCl 10 mM de Tris HCl pH 8.3 y 5U de la enzima

Taq polimerasa (Biotecsa, México). El volumen final de reacción se ajustó a 100  $\mu$ L con agua desionizada estéril. La amplificación se llevó a cabo con un ciclo de 3 min a 95°C, 1 min a 50°C y 2 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C, y 2 min a 72°C, finalmente 1 ciclo de 1 min a 50°C y 5 min a 72°C.

Los productos así generados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002M) con Bromuro de Etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/mL, para visualizar el ADN se le hizo incidir luz UV a una longitud de onda de 254 nm.

En todos los casos en que se realizó una electroforesis de ADN en agarosa, en uno de los carriles se colocaron marcadores de peso molecular conocido (ADN del fago  $\lambda$  digerido con la endonucleasa Hind III o el plásmido pBR322 digerido con la enzima de restricción Msp I) y a partir de estos se estimó el peso molecular de las bandas de interés.

#### **IV.13.2 Obtención del fragmento completo que codifica para GST de *T. solium***

Con la finalidad de obtener el fragmento completo de ADN contenido en cada una de los fagos de las clonas seleccionadas como positivas, después del tamizaje terciario (ver adelante), se realizó una PCR utilizando como molde 1  $\mu$ L de ADN de fago de cada una de las clonas, como iniciadores se usaron 50 ng de los oligonucleótidos denominados  $\lambda$ gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso, los cuales reconocen regiones que flanquean la región de clonación del fago  $\lambda$ gt10 en que se construyó la biblioteca, por lo que el producto obtenido debía contener la secuencia de parte del vector y del inserto completo.

La rutina de amplificación fue: 1 ciclo (3 min a 95°C, 1 min a 50°C y 2 min a 72°C), 30 ciclos (1 min a 95°C, 1 min a 50°C, y 2 min a 72°C), y 1 ciclo (1 min a 50°C y 5 min a 72°C). La purificación del fragmento obtenido, se realizó utilizando perlas de vidrio de la manera que se describe posteriormente.

#### **IV.14 Marcaje de la sonda**

Una vez que se comprobó que el fragmento purificado codificaba para una GST, se procedió a utilizarlo como molde para generar una sonda radioactiva, para tal fin se utilizó el paquete de marcaje con iniciadores al azar (Random Primer DNA Labeling System de Gibco). Se usaron 25 ng de ADN molde purificado, disueltos en 45  $\mu$ L de amortiguador TE, los cuales se hirvieron durante 5 min e inmediatamente se colocaron en hielo. A un tubo "RTS RadPrime DNA Labeling System" del paquete empleado se le agregaron los 45  $\mu$ L conteniendo los 25 ng de ADN molde, se rehidrataron completamente los componentes de la reacción agitando suavemente, se le adicionaron 5  $\mu$ L de ( $\alpha$ - $^{32}$ P) dCTP (3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci / $\mu$ L), se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 10 min. La reacción fue detenida mediante la adición de 5  $\mu$ L de EDTA 0.2M y la sonda quedó lista para su uso, mientras tanto se guardó a -20°C.

#### **IV.15 Tamizaje de una biblioteca de ADNc de *Taenia solium* y aislamiento de clonas positivas.**

Se tamizó una biblioteca de ADNcs contenidos en el fago  $\lambda$ gt10 y obtenida a partir de ARNm de metacéstodo de *T. solium*. Esta contenía insertos de cualquier tamaño y se denominó total, con un título de  $6.4 \times 10^9$  fagos/mL.

Se mezclaron bacterias *Escherichia coli* cepa C600hfl con aproximadamente 45,000 fagos de la biblioteca y se incubaron a 37°C durante 30 min. Después de esta incubación las bacterias infectadas se mezclaron con agar Top-SOBM (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 0.7%) fundido a 48°C y se sembraron sobre agar SOBm (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05 KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agar bacteriológico 1.5%) en cajas de petri de 120 mm de diámetro, las cuales se incubaron a 37°C hasta la aparición de placas líticas.

Después de permanecer 2 horas en refrigeración, se hicieron dos replicas de las placas líticas sobre membranas de nitrocelulosa, esto se realizó

manteniendo las membranas sobre las placas por 2 minutos, cuidando hacer las marcas pertinentes para su posterior ubicación. Las placas líticas (fagos) fueron sometidas a un proceso de desnaturalización con una solución de NaOH 0.5M, NaCl 1.5 M, durante 3 min con la finalidad de que las partículas virales liberaran su ADN sobre la membrana, inmediatamente después se neutralizó el pH alcalino con una solución de Tris HCl 1M y NaCl 1.5 M pH 8.0 durante 3 min y se embebió en una solución de SSC 5X (NaCl 0.75M, Citrato de Sodio 0.075 M). Entonces, el ADN fue fijado a la membrana mediante luz ultravioleta en un UV Spectrolinker XL-1500 Crosslinker (Spectronic Corp.) utilizando la opción "Optimal Crosslink". Las membranas se prehibridaron con una solución SSC 5X, Formamida 50%, SDS 0.2%, Sarcosil 0.1%, reactivo de bloqueo 5% (Boehringer 1993657-11) a 45°C durante 4 horas, sobre esta misma solución se añadió la sonda marcada radioactivamente y se incubó a la misma temperatura durante toda la noche. Después de retirar la solución con la sonda radioactiva, las membranas se lavaron exhaustivamente a 50°C con una solución de SSC 2X y SDS 0.5%, se secaron y fueron expuestas sobre películas de autorradiografía X-OMAT (Kodak) por 24 horas dentro de un contenedor oscuro con placa intensificadora a -70°C., las placas fueron reveladas y fijadas.

Las clonas fueron consideradas positivas si se encontraba una marca intensa en la misma posición en las dos réplicas correspondientes a la misma caja. Las zonas donde se identificaron las placas líticas positivas del primer tamizaje fueron recogidas del agar y resuspendidas individualmente en 1 mL de medio SM (NaCl 0.58%, MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0.2%, Tris-HCl 0.05% pH 7.5, gelatina 0.01%).

A partir de la suspensión de las clonas positivas obtenidas en el tamizaje primario, se llevó a cabo un tamizaje secundario y terciario, sembrando 1000 y 100 fagos de cada una de las clonas positivas. El tamizaje secundario y terciario se realizaron de la misma forma que el primario. Finalmente los fagos de las clonas positivas se resuspendieron en medio SM y se guardaron a 4°C.



#### **IV.16 Clonación de la secuencia que codifica para GST de *T. solium* en el vector de expresión pTRC99A.**

A uno de los fragmentos de ADN de *T. solium* que su secuencia reveló que correspondía a una GST, se le generó un sitio Nco I corriente arriba del codón de inicio y un sitio de restricción para la enzima Bam HI corriente abajo del codón de termino de la región codificante, esto a partir de usar el fragmento como molde para una reacción de PCR donde se usaron oligonucleótidos diseñados con tal fin (GSTX1 5'CATGCCATGGCACCTACTTTGGCTT3' Y GSTX2 5'CCCAAGC TTGGGCTAGCAGTCGCCGCGC3'). A 500 ng del producto resultante purificado con perlas de vidrio, se les digirió simultáneamente con 1U de cada una de las enzimas Nco y Bam HI utilizando 10  $\mu$ L del amortiguador recomendado por los proveedores en un volumen total de 100  $\mu$ L, después de incubarlo 2 horas a 37°C fue precipitado con 10  $\mu$ L de Acetato de Sodio 3M y 250 mL de etanol absoluto frío, se incubó toda la noche a -20 °C, se centrifugó a 16000 X g durante 15 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó y resuspendió en 25  $\mu$ L de TE.

Paralelamente se digirieron y purificaron 500 ng del vector de expresión pTrc99A (Pharmacia, Biotech) con las enzimas Nco y Bam HI como se describió para el fragmento.

Para realizar la ligación del fragmento al vector se utilizó el paquete de ligación T4 de Life Technology. Se mezclaron 10 ng del vector pTRC99A con 100 ng del fragmento a insertar (GST de *T. solium*) digeridos como se indicó, se les agregó 2  $\mu$ L del amortiguador de ligación 10X y 1 U de la enzima T4 ligasa, llevando a un volumen total de 20  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O desionizada y estéril, la reacción se incubó durante 16 horas a 16°C y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Aproximadamente 10 ng de la ligación se mezclaron con 100  $\mu$ L de una suspensión de bacterias *E. coli* competentes de la cepa, se incubaron en hielo durante 30 min, posteriormente 2 min a 42°C y nuevamente en hielo 2 min. Se agregaron 900  $\mu$ L de medio LB (Tryptone 1%, Extracto de levadura 0.05%, NaCl

1%) y se incubaron a 37°C una hora con agitación moderada. El 10 y 80% de la suspensión de bacterias transformadas se sembraron en cajas de petri que contenían agar LB (Medio LB con agar 1.5%) con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C toda la noche.

## **IV.17 Obtención y purificación de ADN**

### **IV.17.1 Productos de PCR**

Los fragmentos obtenidos por PCR con las condiciones descritas anteriormente se purificaron cortando la región del gel de agarosa en donde se corrió dicho fragmento, disolviéndola con agitación en 1 mL de solución de NaI 6 M a 37°C. Una vez disuelta se le agregaron 4 µL de perlas de vidrio (partículas de vidrio que sedimentan a menos de 0.25 cm/min) y se incubó durante dos horas a 4°C con agitación eventual, se centrifugó a 5000 X g durante 30 segundos, se desechó el sobrenadante y las perlas fueron lavadas con 500 µL de NaI y dos veces con solución de lavado (NaCl 0.2 M Tris-HCl 20 mM pH 7.2, EDTA 2 mM y Etanol 50%). Las perlas se colocaron a 37°C hasta que se secaron, el ADN se eluyó agregando 25 µL de solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) e incubaron 30 min a 37°C (Vogelstein y Gillespie, 1979).

Se comprobó la presencia y pureza del ADN mediante electroforesis en agarosa. La cuantificación de la concentración de ADN obtenido se obtuvo al leer la absorbancia a 260 nm.

### **IV.17.2 Plásmidos**

Bacterias que fueron transformadas con el plásmido, fueron recuperadas y crecidas durante toda la noche en 50 mL de medio LB-ampicilina a 37°C. Se centrifugó el cultivo a 6000 X g durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el

paquete bacteriano fue resuspendido en 5 mL de una solución compuesta por Glucosa 50mM, EDTA 10mM, y Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y mantenido a temperatura ambiente durante 10 min.

Se le adicionaron 10 mL de una solución de NaOH 0.2 M y SDS 1%, después de mezclar suavemente e incubar 10 min en hielo, se le agregaron 7.5 mL de Acetato de Amonio 7.5M, se agitó intensamente en vortex y se dejó en hielo 10 min.

Se recuperó el sobrenadante después de centrifugar la mezcla 10 min a 4°C y 6000 X g, a éste, se le agregaron 15 mL de isopropanol y después de incubarlo 10 min en hielo se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones anteriores. El precipitado se resuspendió en 200 µL de TE y se le agregaron 2 µL de ARNasa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C 30 min. Se añadieron 200 µL de fenol, se mezcló y se realizó la extracción de la fase acuosa mediante centrifugación, se realizaron dos extracciones más con una mezcla volumen a volumen de fenol y cloroformo y finalmente dos con cloroformo solo. La fase acuosa recuperada se aplicó a una columna de sefarosa 4B de 10 mL (1 x 6 cm), la columna fue equilibrada con TE. Se colectaron fracciones de 0.5 mL y fueron analizadas en relación con su contenido de ADN plasmídico mediante electroforesis en geles de agarosa.

Las fracciones con ADN plasmídico fueron precipitadas añadiendo 1/10 del volumen de la fracción de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 2.5 veces el volumen de la fracción de etanol absoluto frío, se colocaron 30 min a -70°C, posteriormente se centrifugaron a 16000 X g 10 min a 4°C. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó, fue resuspendido con 30 µL de TE y cuantificada su concentración espectrofotométricamente a 260 nm.

#### **IV.17.3 ADN genómico**

Se obtuvo ADN genómico (ADNg) de *T. solium*, 5 g de metacéstodos fueron congelados por adición de nitrógeno líquido y pulverizados sobre un mortero, se centrifugó rápidamente a 5000 X g durante 5 min, se deshecho el

sobrenadante y al sedimento se le adicionaron 50 mL de solución de (Tris-HCl 0.05 M pH 8.0, EDTA 0.1 M y Sarcosil 0.5%) para disgregar los grumos y se incubó una hora a 37°C en presencia de 20 µg/mL de ARNasa. Después se agregaron 100 µg/mL de Proteinasa K, se incubó la mezcla 3 horas a 55°C y 1 hora a 65°C, transcurrido este tiempo se añadió NaCl a una concentración final de 2M, se agitó suavemente durante 2 min y se centrifugó a 4000 X g durante 10 min.

Se realizaron dos extracciones con fenol y dos con cloroformo v/v centrifugando a 4000 X g por 10 min cada vez. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se le adicionó Isopropanol frío v/v, se agitó suavemente y se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 12000 X g para recuperar el ADN, el precipitado se lavó dos veces con Etanol al 70%, se secó y se resuspendió en TE, se incubó a 65°C 30 min. Se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm y se guardó a 4°C hasta su uso.

#### IV.17.4 ADN de Fagos

*Escherichia coli* C600hfl fue infectada con  $5 \times 10^6$  fagos de cada una de las clonas positivas resultantes del tamizaje terciario, se mezclaron con medio top-SOBM-agarosa (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05%, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agarosa 0.7%) fundido a 48°C y se sembraron sobre SOBManagarosa (Tryptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.05 KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y agarosa 1.5%) en cajas de petri de 120 mm de diámetro, las cuales se incubaron a 37°C hasta la confluencia de las placas líticas. Las partículas virales fueron recuperadas de la superficie de las placas adicionando 5 mL de medio SM y agitando lentamente durante 1 hora. La suspensión recuperada se mezcló con 200 µL de cloroformo y después de centrifugarla a 6000 X g se obtuvo el sobrenadante, del cual se tomaron 700 µL y se le adicionaron 700 µL de polietilenglicol (PEG) al 20% con 2% de NaCl 2M y se incubaron a 4°C durante 1 hora.

Se centrifugó la suspensión a 16000 X g durante 15 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µL

de SM, se le adicionaron 2  $\mu\text{g}$  de ARNasa A, 0.2  $\mu\text{g}$  de ADNasa y se incubaron 30 min a 37°C. Entonces fueron adicionados 2  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% y 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.5 pH 8 y durante 15 min se incubó a 68°C para después añadirle 200  $\mu\text{L}$  de fenol saturado con TE y mezclarlos vigorosamente durante 1 min, manteniéndolos a temperatura ambiente durante 3 min, posteriormente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se mezclaron vigorosamente. Esta mezcla se centrifugó a 16000 X g durante 2 min y se recuperó la fase acuosa para otra extracción con cloroformo, Finalmente a la fase acuosa que resultó de esta última extracción se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de isopropanol, la mezcla se mantuvo toda la noche a -20°C, después se centrifugó a 16000 X g por 10 min a 4°C, el precipitado se lavó agregando 200 mL de etanol frío al 70%, se centrifugó en las condiciones anteriores y se retiró todo el sobrenadante, el precipitado se secó a 37°C y se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de TE.

## **IV.18 Secuenciación de ADN**

### **IV.18.1 Fragmentos de PCP con marcaje radiactivo.**

Para esta reacción de secuencia se utilizó el paquete de secuenciación Circunvent (Termal cycle sequencing kit. Biolabs. New England) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Aproximadamente 300 ng del fragmento purificado se mezclaron con 15 pm del iniciador NH<sub>2</sub>TGST o GST-26-3', 1.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador, 1  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100, 1  $\mu\text{L}$  de enzima Circunvent, 2  $\mu\text{L}$  de  $\alpha\text{S}^{35}$  (dATP 500-1200 Ci/mmol de Amersham) y H<sub>2</sub>O hasta completar 15  $\mu\text{L}$ . De esta mezcla se agregaron 3.2  $\mu\text{L}$  a cada uno de cuatro tubos que contenían respectivamente 3  $\mu\text{L}$  de ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP. La reacción de PCR se corrió en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) usando el programa SEQ 50 con la siguiente rutina: 20 ciclos de 20 seg a 94°C, 20 seg a 50°C y 20 seg a 72°C. La reacción se detuvo añadiendo 4  $\mu\text{L}$  de la solución terminadora.

En una cámara de secuencia modelo S2 (Gibco BRL Sequencing System), se corrieron a 55 watts, 3  $\mu$ L de cada una de las reacciones de secuencia en un gel de acrilamida al 6% de 1mm de grosor [33.75 g de Urea, 18 mL de H<sub>2</sub>O, 11.25 mL de Acrilamida 40%-bisacrilamida 2%, 13.5 mL de TBE 5X (Tris-borato 0.45 M, 0.01 M de EDTA), 800  $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10% y 5  $\mu$ L de TEMED].

Después del tiempo de corrida, se fijó el gel durante 10 min con una solución de ácido Acético al 10%, se secó en un horno a 55°C. El gel se puso en contacto con una placa para autorradiografía X-OMAT (Kodak) por 48 horas dentro de un contenedor oscuro y guardado a -70°C. Posteriormente, la placa se reveló y fijó para hacer la lectura de la secuencia obtenida.

#### **IV.18.2 Fragmentos de PCR con marcaje fluorescente**

Los fragmentos de ADN obtenido por PCR a partir de dos clonas seleccionadas con la sonda que presentó homología con secuencias de otras GSTs descritas, fueron secuenciadas por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM 310 GENETIC ANALIZER utilizando el paquete de secuenciación Rhodamine Terminator Ampli TAQ DNA (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones de los proveedores. Se mezclaron 500 ng del ADN molde con el reactivo "premix" del paquete, con 10 pm de oligonucleótidos iniciadores aforando con agua desionizada a un volumen total de 20  $\mu$ L (inicialmente se usaron los  $\lambda$ gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso y posteriormente iniciadores que reconocían secuencias internas del fragmento, GST2b-4 5'CGAAGTTTGAGCCAACGTG3' y GST-1R 5'ATTGCTGACAGACACGGCATG3'). Se corrió una reacción de PCR en un termociclador Perkin Elmer 2400 con el siguiente programa: 1 ciclo de 1 min a 96°C, 25 ciclos de 10 seg a 96°C, 5 seg a 50°C y 4 min a 60°C. El producto se pasó a través de una columna Centri-Sep mediante centrifugación a 4000 X g durante 2 min y se secó usando vacío para finalmente resuspenderse con el reactivo "Terminator Ready Reaction" suministrado en el paquete de secuenciación.

### IV.18.3 Plásmidos con marcaje radioactivo

Para confirmar que realmente se ligó el inserto completo dentro del vector de expresión se utilizó el método de Sanger para realizar la secuencia con un paquete T7 Sequenase Versión 2.0 de Amersham Co.

Se colocaron 2.5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cuatro trifosfatos de dideoxiribonucleósidos (A, C, G, T) (ddNTPs) en tubos eppendorf y se colocaron en hielo hasta su uso. Una mezcla de 5.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{L}$  de NSA 10X (Tris HCl 400 mM pH 7.5 y  $\text{MgCl}_2$  200 Mm) y 2  $\mu\text{L}$  de HCl 1N fue preparada y se le denominó solución de alineación, enseguida se diluyó el reactivo "Labeling Mix" en agua a una relación 1:4, la enzima Sequenase se diluyó 1:8 en el amortiguador de dilución incluido en el paquete. Se preparó una mezcla denominada "maestra" que contenía 1  $\mu\text{L}$  de DTT (Ditiotreitol), 2  $\mu\text{L}$  de "Labeling Mix" diluida, 2  $\mu\text{L}$  de Sequenase diluida y 0.5  $\mu\text{L}$  de  $\alpha\text{S}^{35}$  (dATP 500-1200 Ci/mmol de Amersham), la cual se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Por otro lado se mezclaron 3 pM del iniciador a usar en 1  $\mu\text{L}$ , 0.5  $\mu\text{L}$  de NaOH 1N y 300 ng del ADN molde a secuenciar, contenidos en 2.5  $\mu\text{L}$ , para tener 4  $\mu\text{L}$  en total. Esta mezcla se incubó a 37°C 10 min, entonces, se agregaron 7  $\mu\text{L}$  de la solución de alineación preparada previamente y se incubaron 5 min más a la misma temperatura.

Después se agregaron 5.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla "maestra" y se incubó 5 min a temperatura ambiente, inmediatamente después se colocaron 3.5  $\mu\text{L}$  de esta reacción a cada uno de los tubos que contenían a cada uno de los ddNTPs y se incubaron a 45°C por 5 min, transcurridos lo cuales, se agregaron 4  $\mu\text{L}$  de la solución de paro incluida en el paquete.

Las reacciones obtenidas se corrieron en un gel de acrilamida-urea, se expuso a una autorradiografía, se revelaron y fijaron en las condiciones mencionadas anteriormente.

#### **IV.19 Deducción de la secuencia de aminoácidos.**

Después de conocer la secuencia del fragmento completo que codifica para la GST de *T. solium* se identificó su marco de lectura correcto y se realizó la deducción de su secuencia de aminoácidos.

Se determinó el patrón de restricción del fragmento completo de todas las clonas obtenidas, utilizando las enzimas de restricción Eco RI, Kpn, Bam HI, Sal I, Sac I, Xba I, Pst, Hind III, Xho I y Nco I (Gibco). Aproximadamente 100 ng de cada fragmento se mezclaron con 10  $\mu$ L del amortiguador 10 X recomendado por los proveedores para cada enzima, 1U de cada enzima en un volumen final de 100  $\mu$ L y se incubaron a 37°C por una hora. En un gel de agarosa al 2% se corrieron los productos de la restricción para observar la presencia o ausencia en el fragmento de los sitios de restricción específicos para cada enzima, esto con la finalidad de establecer que sitios podían ser usados para la inserción del fragmento en el vector de expresión.

#### **IV.20 Expresión de Glutación S-transferasa recombinante de *T. solium*.**

*Escherichia coli* de la cepa JM105 transformadas con el plásmido pTrc99A que contenía el inserto que codifica para la GST de *T. solium* fueron crecidas en 5 mL de medio LB-ampicilina durante toda la noche, este cultivo fue agregado a 500 mL de LB-ampicilina e incubado a 37°C con agitación a 200 rpm en un baño de movimiento orbital (Tissue culture rotator, Lab-Line).

Se monitoreó la densidad óptica del cultivo a 600 nm y cuando alcanzó un valor de 0.4 se agregó IPTG (isopropil tio- $\beta$ -D-galactosidasa) a una concentración final de 2mM. A las 8 horas de la inducción se cosechó la pastilla bacteriana mediante centrifugación a 5000 X g.

Las bacterias fueron lisadas utilizando una prensa Francesa, centrifugadas a 16000 X g y el sobrenadante pasó a través de la columna de afinidad (GSH-Sefarosa) para purificar la GST recombinante de *T. solium* (GSTrTs). Como



controles se hicieron cultivos de manera similar pero con el vector vacío o sin vector.

#### **IV.21 Ensayos de Southern blot.**

A 30  $\mu\text{g}$  de ADNg de *T. solium* se le agregaron 2 U de cada una de las enzimas Bam HI, Eco RI, Hind III, Kpn, Pst y XhoI, 4  $\mu\text{L}$  del amortiguador correspondiente, ajustando a un volumen final de 40  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada y estéril, se incubó la reacción 2 horas a 37°C, después de los cuales 1  $\mu\text{L}$  se utilizó para verificar por electroforesis que la digestión haya sido completa, de ser así el resto de la muestra fue corrida en un gel de agarosa al 1% y fotografiado con una regla fluorescente al lado para la posterior ubicación de los pesos moleculares.

Después del corrimiento electroforético el gel se depuró mediante una solución de HCl 0.25 M con agitación suave durante 15 min, después se transfirió a otro recipiente con NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M y se mantuvo ahí con agitación suave durante una hora, cambiando dos veces la solución. Se neutralizó con una solución de Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 1.5 M, agitando suavemente durante una hora y haciendo tres cambios de la solución.

Dentro de un recipiente de tamaño adecuado se colocó la base de acrílico sobre la que se corrió el gel, de tal manera que quedara un espacio entre el fondo del recipiente y la superficie de la base, para poder contener la solución de transferencia (SSC 10 X). Sobre la parte superior de la base se colocó un papel filtro Whatman de 3 mm humedecido con la solución SSC 10 X, de un largo tal, que cubriera toda la base y bajara por ambos lados hasta el fondo del recipiente. Sobre la base de acrílico cubierta por el papel filtro se colocó el gel, encima de este, se colocó la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel y previamente humedecida con SSC 2 X, sobre ella se colocó papel filtro y una torre de papel absorbente secos y recortados al tamaño de la membrana de nitrocelulosa, finalmente sobre del papel absorbente se colocó un cristal y sobre de él un peso aproximado de 500 g distribuidos homogéneamente.

Se colocó dentro del recipiente solución de transferencia, hasta un nivel tal, que no tocara la base sobre la que se colocó el gel, para que la solución subiera por capilaridad a través del papel filtro que colgaba por debajo de la base. La transferencia duró 24 horas y una vez concluida se retiraron el peso, los papeles absorbentes y el papel filtro, se marcaron las posiciones de los pozos del gel sobre la nitrocelulosa y la membrana se lavó con SSC 5X durante 5 min a temperatura ambiente. Se secó la membrana y como se detalló anteriormente el ADN fue fijado a la membrana mediante luz ultravioleta, se prehibridaron a 45°C durante 4 horas, se añadió la sonda marcada radioactivamente y se incubó durante toda la noche.

Después de la hibridación, la membrana se secó y fue expuesta sobre una película de autorradiografía X-O-MAT (Kodak) por 72 horas dentro de un contenedor oscuro con placa intensificadora a -70°C., las placas fueron reveladas y fijadas.

#### **IV.22 Ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis *Taenia crassiceps* –ratón.**

Se utilizaron ratones BALB/cAnN hembras de 4 a 6 semanas de edad en grupos de 7 para cada condición experimental, fueron mantenidos a libre acceso de alimento y agua en cajas individuales por grupo, sin ningún otro tratamiento especial durante los experimentos.

El esquema de inmunización implicó siempre dos aplicaciones de enzima como antígeno, con dos semanas de diferencia entre la aplicación de la primera y la segunda, por vía subcutánea. Las dosis de antígeno empleado fueron 0.5, 1, 5 o 10 por ratón, ambas inmunizaciones fueron acompañadas de adyuvante. Los adyuvantes empleados fueron Hidróxido de Aluminio (1 µg por cada 30µg de proteína), Saponina (10 µg/ratón) o adyuvante completo de Freund (1 µL por cada µg de proteína)

El reto se realizó fue 4 semanas después de la segunda inmunización, inyectando intraperitonealmente 10 metacéstodos de *Taenia crassiceps* de un

tamaño no mayor a 3 mm y que no presentaran gemaciones. Los metacéstodos fueron obtenidos del peritoneo de ratones infectados y sacrificados el mismo día de su utilización. En algunos experimentos el sacrificio se efectuó 4 semanas después del reto, y se les denominó protocolos cortos. En otros experimentos el sacrificio se efectuó 8 semanas después del reto y se les denominó protocolos largos.

Inmediatamente después del sacrificio, se obtuvieron y se contaron todos los parásitos presentes en el peritoneo de cada ratón. Para cada grupo se estableció la media y la desviación estándar. En la Cuadro 4 se resumen los dos protocolos usados para evaluar la capacidad protectora de las proteínas utilizadas como antígenos. El sangrado se realizó para obtener el suero y estimar la inmunoglobulinas producidas por los ratones en contra del antígeno utilizado.

**CUADRO 4.**

**Protocolos de ensayos de protección en el modelo de cisticercosis *Taenia crassiceps*-ratón utilizando Glutatión S-transferasa nativa y recombinante de *Taenia solium* como antígeno**

Semana	Protocolo Corto	Protocolo Largo
0	Sangrado y 1 <sup>ra</sup> inmunización	Sangrado y 1 <sup>ra</sup> inmunización
2	2 <sup>da</sup> inmunización	2 <sup>da</sup> inmunización
3	Sangrado	Sangrado
6	Reto	Reto
7	Sangrado	Sangrado
10	Sangrado y sacrificio	Sangrado
14		Sangrado y sacrificio

En todos los experimentos se incluyeron grupos testigos, los ratones testigo se inocularon con PBS. Este grupo sirvió para calcular el porcentaje de protección que confirió el antígeno evaluado, de acuerdo al siguiente criterio.

$$\% \text{ de protección} = \frac{\# \text{ parásitos en el grupo testigo} - \# \text{ parásitos en el grupo experimental}}{\# \text{ parásitos en el grupo testigo}} \times 100$$

En otro grupo testigo se utilizó una recombinante de la proteína de roptría de *Toxoplasma gondii* (ROP) como inmunizante.

Para establecer diferencias estadísticas entre los distintos grupos y sus respectivos grupos testigos, se utilizó la prueba de t-student. Si la muestra no se comportó con una distribución normal se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis

#### **IV.23 Tipificación de inmunoglobulinas por el método de ELISA.**

Durante los ensayos de protección cada uno de los ratones fue sangrado en los momentos en que se señala en la Cuadro 4, con los sueros de cada ratón de cada uno de los grupos se hizo una mezcla y se determinó la presencia de anticuerpos contra el antígeno que se usó para inmunizar a ese grupo en particular, tomando como valor basal los obtenidos con los sueros preinmunes (semana 0). Se utilizó la técnica de ELISA para determinar IgG totales, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgE.

Se utilizaron placas para ELISA (Fiat Bottom EIA/RIA Costar Corporation), a los cuales se les agregó 1 µg del antígeno en amortiguador de carbonatos (Carbonato de Sodio 0.1 M) y se incubó a 4°C toda la noche. Se lavaron 5 veces con 200 µL de una solución de PBS-Tween 20 al 0.05% (solución de lavado) y se bloquearon con 100 µL de Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween 20 al 0.05% durante 30 min a 37°C, posteriormente se lavaron 5 veces con la solución de lavado.

Se agregaron por duplicado 100 µL de una dilución 1:100 de los sueros a evaluar y se incubaron durante 2 horas a 37°C y se lavaron de la misma manera.

Se añadieron 100 µL diluidos 1:1000 de cualquiera de los siguientes anticuerpos conjugados a la enzima peroxidasa, hechos en cabra y provistos por

Boehring Mannheim Biochemicals: anti IgG (H+L) de ratón, anti IgG<sub>1</sub> de ratón, anti IgG<sub>2a</sub> de ratón y anti IgE de ratón, se incubaron 1 hora a 37°C y se lavaron como anteriormente se dijo. Se adicionaron 100 µL de la solución de substrato para peroxidasa (2.43 mL de Acido Cítrico 0.1M, 2.57 mL de Fosfato de Sodio 0.2M, 4 mg de Ortofenilendiamina, 150 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y 5 mL de H<sub>2</sub>O) y se incubó durante 10 min, la reacción se paro con 50 H<sub>2</sub>O de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M para leer la densidad óptica a una longitud de onda de 495 nm en un lector para placas de ELISA (Microplate Reader Model 550. Biorad)

## V. RESULTADOS

### V.1 Actividad de Glutación S-transferasa en el metacéstodo de *T. solium*.

El extracto crudo del metacéstodo de *Taenia solium* (ECMTs) presentó una actividad específica sobre el sustrato CDNB de  $0.11 \mu\text{g min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ . Por otro lado, al pasar el ECMTs por la columna de afinidad de GSH-Sefarosa, la fracción unida específicamente y eluida con GSH 5 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.-0 presentó una actividad específica sobre el mismo sustrato de  $2.8 \mu\text{g min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  lo cual confirma que a partir de la fase de metacéstodo de este parásito se puede recuperar una fracción con actividad de GST (fGSTTs) enriquecida 25 veces respecto al ECMTs, evidenciándose con esto que el metacéstodo de *T. solium* posee una actividad de Glutación S-transferasa.

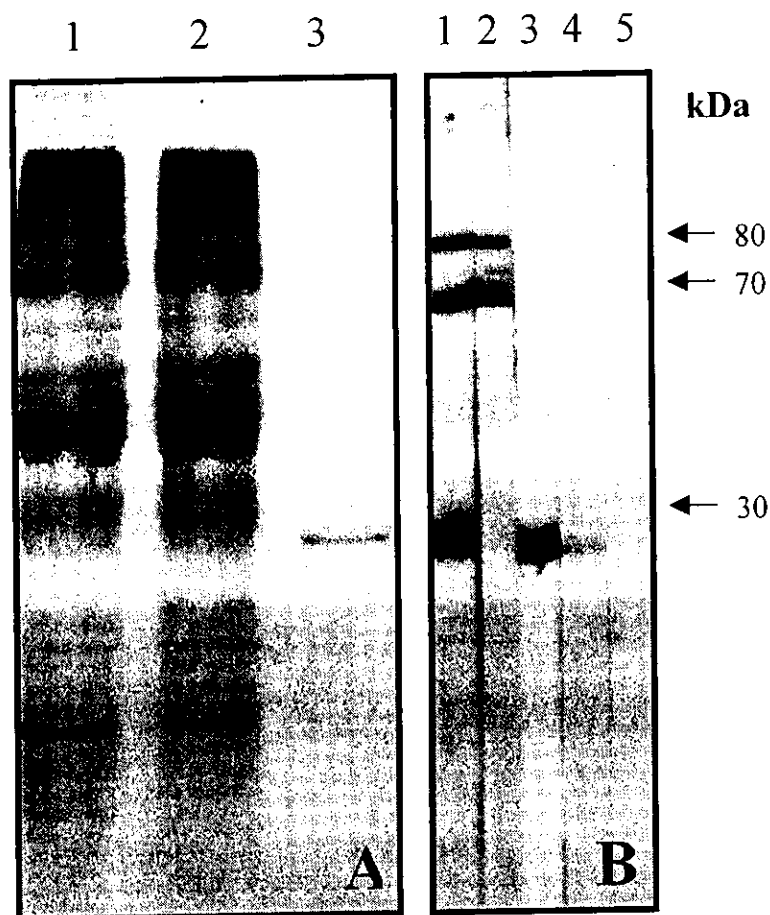
Considerando la concentración total de proteínas del extracto crudo del metacéstodo de *T. solium* (ECMTs) y la concentración de proteína en la fGSTTs se calculó que aproximadamente el 3% de la proteína del ECMTs fue fGSTTs, por cada 10 mg de proteína total de ECMTs se recuperaron 300  $\mu\text{g}$  de fGSTTs.

### V.2 Peso molecular del monómero y de la forma dimérica de GST nativa de *T. solium*.

Tanto el ECMTs como la fGSTTs eluida de la columna de afinidad de GSH-Sefarosa fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12.5% en condiciones reductoras y el gel teñido con azul de Coomassie, la Figura 3A muestra que el ECMTs está compuesto de más de 30 polipéptidos de diferente peso molecular (Fig 3A, línea 1) mientras que la fGSTTs está constituida aparentemente por una sola banda de aproximadamente 26 kDa (Fig 3A, línea 3).

Utilizando los anticuerpos anti-fGSTTs producidos en conejo, se realizó un ensayo de inmuno-electrotransferencia, en la Figura 3B se observó que estos

anticuerpos policlonales reconocieron 3 bandas principales, de 26, 70 y 80 kDa aproximadamente en el ECMTs antes de pasarlo a través de la columna GSH-Sefarosa (Fig 3B, línea 1), cuando se enfrentaron estos mismos anticuerpos con la fracción del ECMTs que no se pegó a la columna de afinidad, solo se observaron las bandas de aproximadamente 70 y 80 kDa (Fig 3B, línea 2) y cuando se utilizó la fracción del ECMTs que se unió a la columna específicamente y que se eluyó con 5 mM de GSH y Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (fGSTTs), los anticuerpos reconocieron una banda prominente de aproximadamente 26 kDa (Fig 3B, línea 3).



**Figura 3.** Purificación de la fracción de GST de metacéstodo de *Taenia solium*. (fGSTTs) (A) SDS-PAGE teñido con azul de Commassie: (1) Extracto crudo de metacéstodo de *T. solium* (ECMTs), (2) ECMTs no ligado a la columna GSH-Sefarosa y (3) fracción eluida de la columna GSH-Sefarosa con GSH (fGSTTs). (B) inmunoelectrotransferencia (1-3 igual que en A) (4 y 5 ECMTs). Membranas 1 y 3 fueron incubadas con anticuerpos anti fGSTTs, la membrana 4 con anticuerpos específicos contra GSTTs y la membrana 5 con IgG de conejo sin inmunizar.

Por la presencia de bandas muy prominentes en las inmuno-electrotransferencias y los antecedentes reportados en la literatura, se pensó en la posibilidad de que la fGSTTs estuviera compuesta por más de una forma de la enzima. Para comprobar lo anterior, la fGSTTs fue sometida a corrimientos electroforéticos más largos, encontrándose al menos otra banda perfectamente visible al teñir los geles con azul de Commassie y plata. En la Figura 4B se observan dos bandas claramente identificables mediante la tinción de azul de Commassie, perteneciendo una, a un peso molecular (PM) aproximado de 26 kDa y la otra de 28 kDa. Cuando la tinción fue con plata, además de las dos bandas mencionadas, se aprecia una tercera de aproximadamente 24 kDa en concentraciones que apenas la hacen visible (Fig 4A).

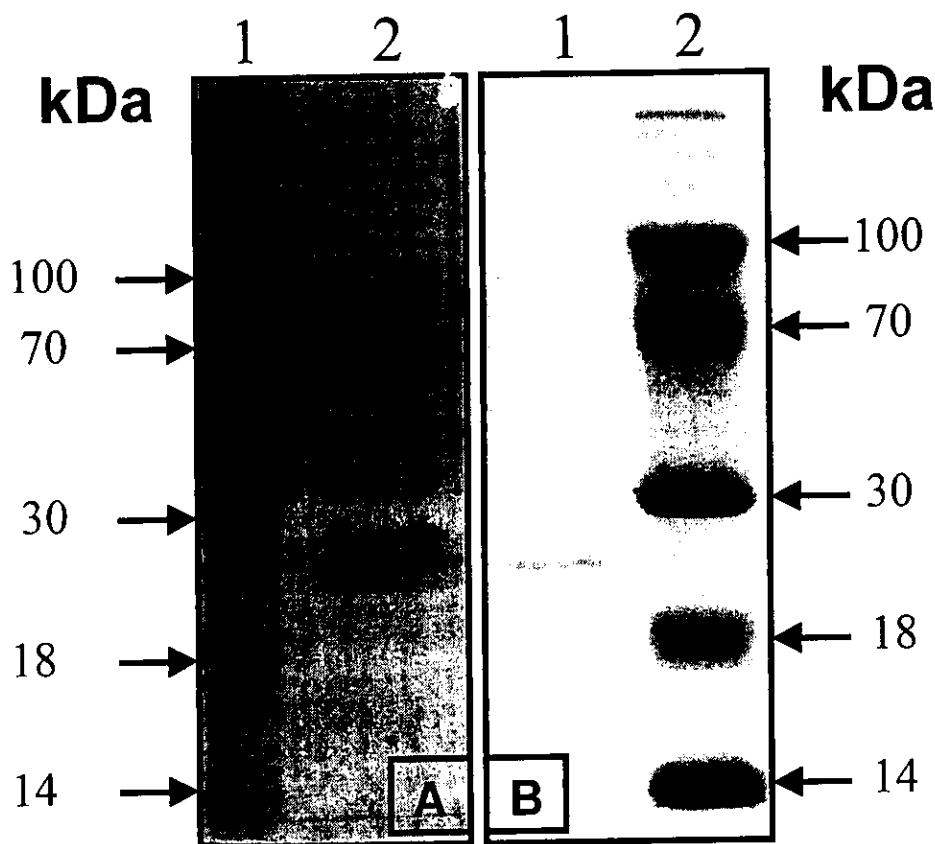
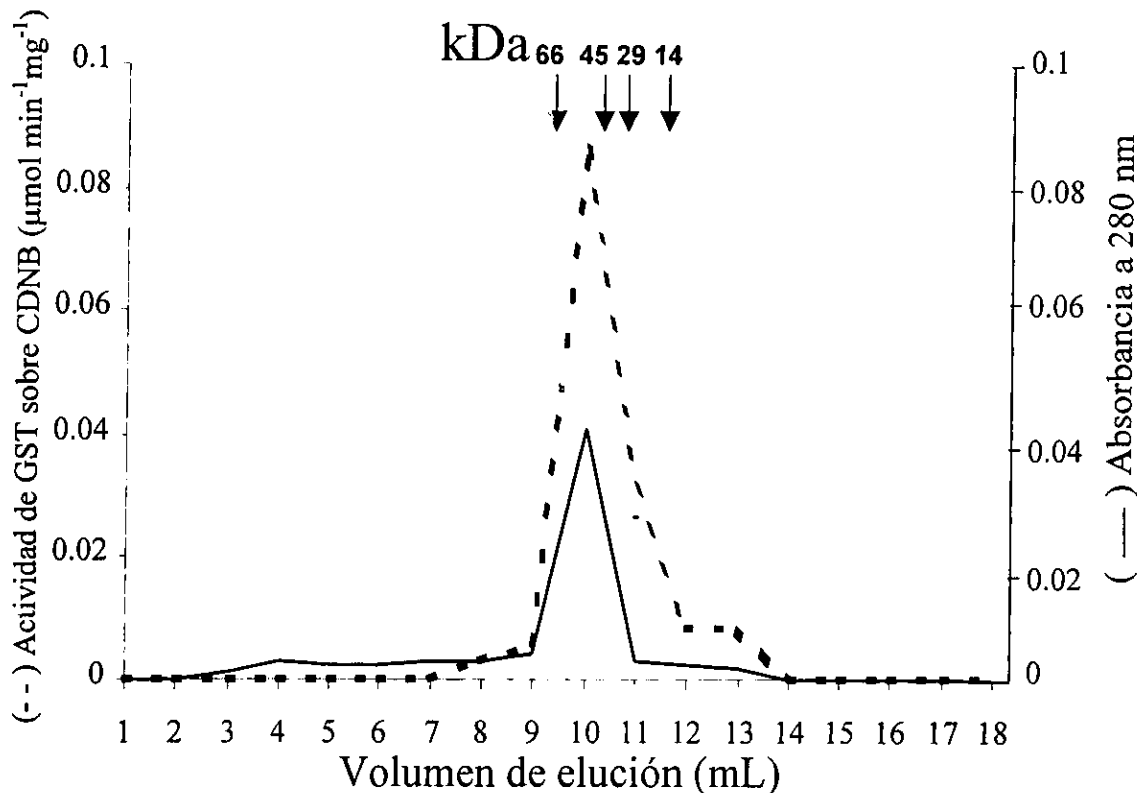


Figura 4. A) Tinción de plata de proteínas. Pesos moleculares (PM) (1) y fGSTTs (2)  
 B) Tinción con azul de Commassie de fGSTT, (1) y PM (2)



La fracción con actividad de GST de *T. solium* (fGSTTs) se sometió a filtración en gel (Superdex 75 HR), a las diferentes fracciones obtenidas se les determinó la actividad específica sobre el substrato CDNB y se les monitoreó la absorbancia a 280 nm como una medida de la presencia de proteína (Gráfica 1). En la gráfica se observa un solo pico, el cual coincide en la fracción con mayor cantidad de proteína y actividad específica, lo que sugiere que la actividad enzimática de GST de la fGSTTs tiene un peso molecular aproximada de 47 kDa y que corresponde a la forma nativa activa de la enzima, es decir, a un dímero.

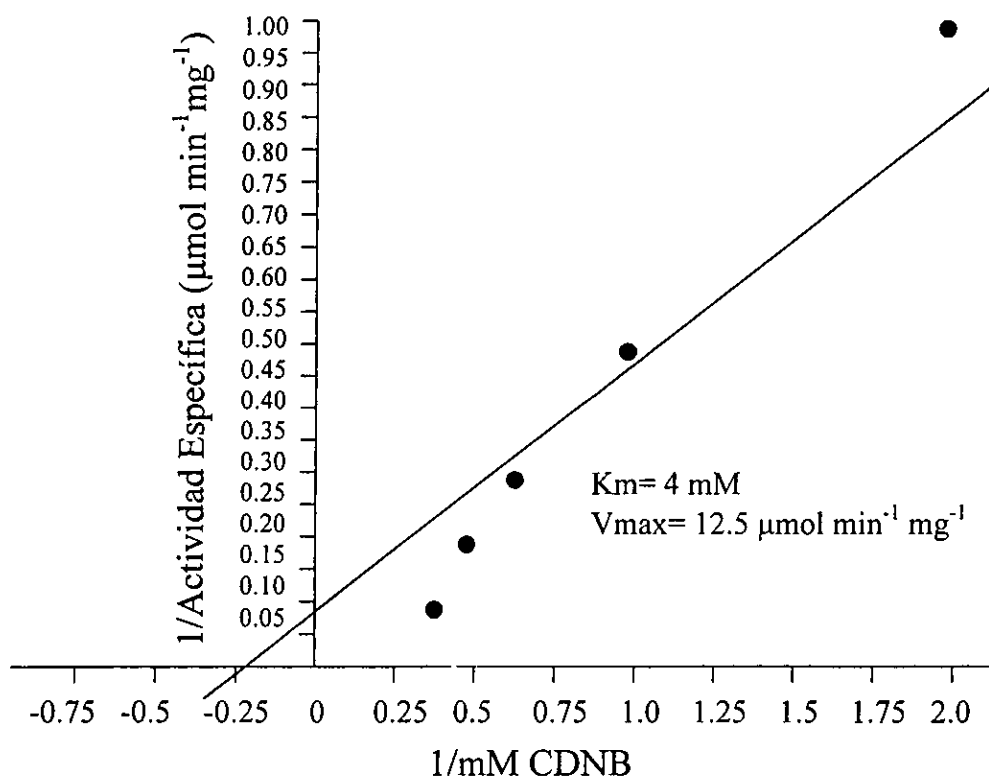


**Gráfica 1.** Cromatografía por filtración en gel (Superdex 75 HR) de la fGSTTs, la curva en línea continua representa la absorbancia medida a 280 nm y la línea discontinua representa la actividad específica sobre el substrato CDNB determinada como se describió en Metodología. Los números y flechas sobre el perfil de elución indican la posición de los marcadores de peso molecular usados para calibrar la columna.

### V.3 Parámetros cinéticos de la GST de metacésto de *T. solium* (fGSTTs)

A la fracción con actividad de GST de cisticerco de *T. solium* (fGSTTs) se le determinó su actividad específica manteniendo constante en la reacción la concentración de GSH (1 mM) y variando la concentración de CDNB (0.5-2.5 mM).

Para determinar su  $K_m$  y su  $V_{max}$  se graficó la inversa de la concentración de CDNB contra la inversa de la actividad específica para dicho sustrato, se realizó un ajuste de la recta mediante una regresión lineal y el inverso del valor en que se interceptó el eje de la Y representó el valor de la  $V_{max}$  y el inverso del valor de la intersección de esa recta con el eje de las X determinó el valor de la  $K_m$ , los valores fueron  $12.5 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  y 4 mM respectivamente (Gráfica 2).



**Gráfica 2. Determinación de la  $V_{max}$  y  $K_m$  de la fGSTTs sobre el sustrato CDNB a una concentración constante de 1 mM de GSH como cosustrato y con las condiciones generales de reacción especificadas en Metodología.**

#### V.4 Actividad de la fGSTTs sobre distintos sustratos y sensibilidad a inhibidores.

En el cuadro 5 se muestra que la fGSTTs presentó actividad evidente con 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno considerado el sustrato universal de las GSTs, Acido Etacrínico, Hexa-2,4-dienal, *trans*-Non-2-enal, Hidroperóxido de Cumeno. Además presento actividad débil sobre 1,2-Dicloro-4-nitrobenceno y Bromosulfaleina, por otro lado no presento actividad detectable sobre Peróxido de Hidrógeno, ni sobre 1,2-Epoxy-3-(*p*-nitrofenoxi) propano.

Estos resultados ponen en evidencia que *T. solium* en su fase de cisticerco posee capacidad enzimática, debida a Glutación S-transferasa, capaz de actuar sobre sustancias tóxicas para el parásito como los carbonilos citotóxicos (Hexa-2,4-dienal y *trans*-Non-2-enal) e hidroperóxidos lipídicos (Hidroperóxido de Cumeno) . El hecho de que solo presentó actividad sobre Hidroperóxido de Cumeno, pero no sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permite postular que posee capacidad de peroxidasa independiente de Selenio y no de peroxidasa dependiente de Selenio.

CUADRO 5

Determinación de la actividad específica de fGSTTs sobre diferentes sustratos

Substrato	Actividad específica ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )
<b>1-Cloro-2,4-dinitrobenceno</b>	<b>2.8</b>
<b>1,2-Dicloro-4-nitrobenceno</b>	<b>0.005</b>
<b>Bromosulfaleina</b>	<b>0.004</b>
<b>Acido Etacrínico</b>	<b>0.470</b>
<b>1,2-Epoxy-3-(<i>p</i>-nitrofenoxi) propano</b>	<b>No detectada</b>
<b>Hexa-2,4-dienal</b>	<b>0.134</b>
<b><i>trans</i>-Non-2-enal</b>	<b>0.085</b>
<b>Hidroperóxido de Cumeno</b>	<b>0.220</b>
<b>Hidroperóxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	<b>No detectada</b>

Los ensayos de inhibición revelan que los tres inhibidores tienen efecto sobre la actividad enzimática de GST observada en la fGSTTs. En el cuadro 6 se puede observar que la inhibición por Cloruro de Trifeniltin y por Azul de Cibacrón es tres veces mayor que la causada por Bromosulfaleina. Los datos de actividad específica sobre los substratos evaluados, así como los datos de inhibición obtenidos al ser comparados con los valores reportados para las familias de GSTs de mamíferos para estos mismos substratos (Mannervik y cols., 1985), revelan una estrecha similitud de la actividad de GST de la fGSTTs con la clase  $\mu$  de GSTs de mamíferos.

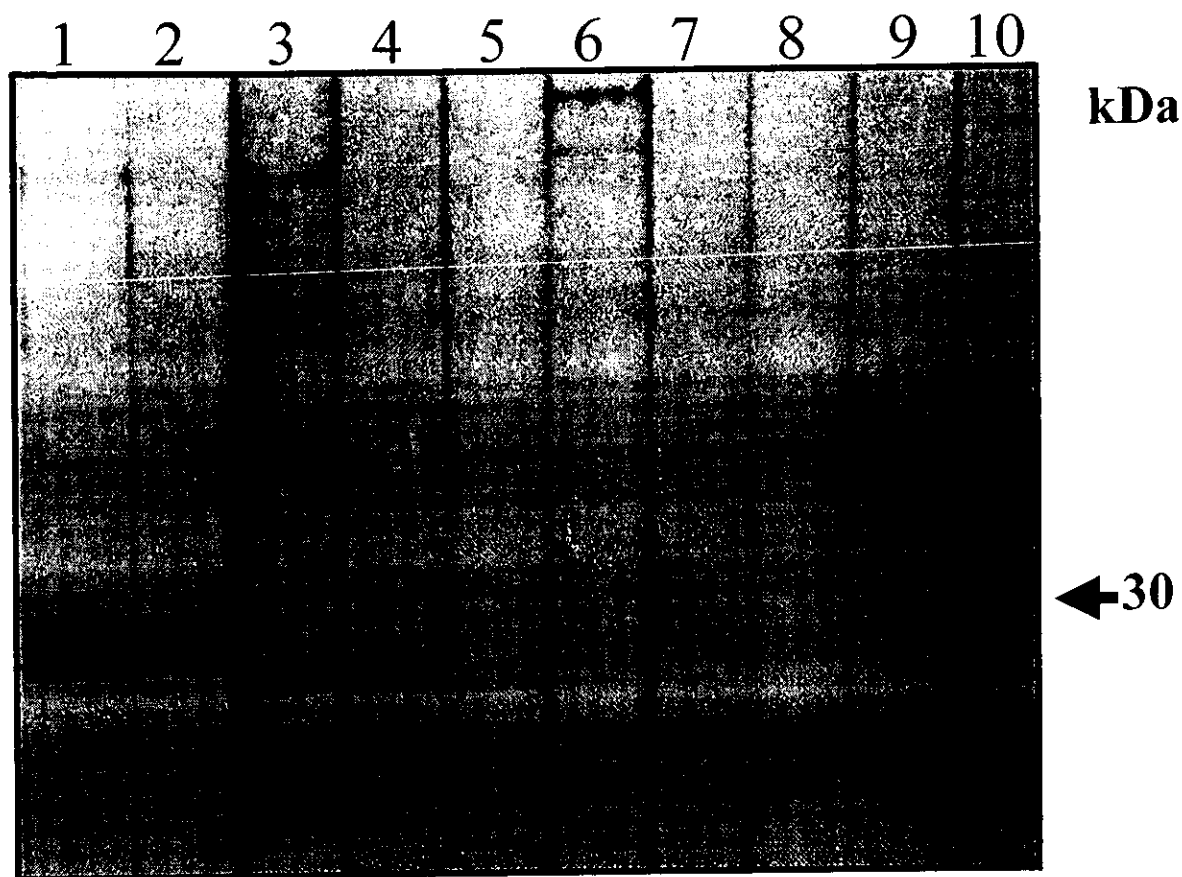
#### CUADRO 6

**Determinación de la concentración capaz de inhibir el 50 % de la actividad ( $I_{50}$ ) de la fGSTTs sobre CDNB por diferentes sustancias inhibitorias.**

Inhibidor	$I_{50}$ $\mu$ M
Cloruro de Trifeniltin	0.50
Azul de Cibacrón	0.45
Bromosulfaleina	1.41

#### V.5 Comparación inmunológica de la GST de *T. solium* con GSTs de otras especies.

Mediante inmunoelectrotransferencia se determinó la reactividad específica de los anticuerpos anti fGSTTs con GSTs de otros parásitos y de hígado de especies animales involucradas en el ciclo de vida del parásito o usadas como modelo experimental. Se observó reactividad cruzada con las GSTs purificadas a partir del adulto de *Taenia saginata*, adulto de *Taenia taeniaeformis*, adulto de *Taenia solium* y el metacéstodo de la cepa ORF de *Taenia crassiceps*. Los anticuerpos no reconocieron a GSTs purificadas a partir del gusano adulto de *Schistosoma mansoni*, ni de GSTs provenientes de hígado de cerdo, conejo y ratón. Cuando se usó suero normal de conejo como fuente de anticuerpos no se observó ninguna banda en la inmunoelectrotransferencia (fig. 5).



**Figura 5.** Identificación de GSTs de diferentes especies. Inmunoelectrotransferencia de GSTs purificadas de (1 y 10) metacéstodo de *T. solium*; (2) adulto de *T. solium*; (3) adulto de *T. saginata*; (4) adulto de *T. taeniaeformis*; (5) metacéstodo de *T. crassiceps*; (6) adulto de *S. mansoni*; (7) hígado de cerdo; (8) hígado de conejo y (9) hígado de ratón. Del carril 1 al 9 se incubó con anticuerpos anti fGSTTs y el 10 fue incubado con suero normal de conejo.

## V.6 Inmunolocalización de la enzima en la larva de *T. solium*.

La localización inmunohistoquímica usando los anticuerpos anti GSTTs se muestran en la figura 6, la GST fue localizada en el tegumento, a través del parenquima y en el citoplasma de citones protonefridiales y tegumentarios. El patrón de la marca inmunofluorescente muestra un claro gradiente que se incrementa desde los citones protonefridiales hasta la superficie y se presenta fuertemente concentrado en el tegumento (Fig 6A). En un corte de cisticerco, al

cual se le incubó con IgGs de suero normal de conejo como primer anticuerpo, no se encontró tinción fluorescente (Fig 6B)

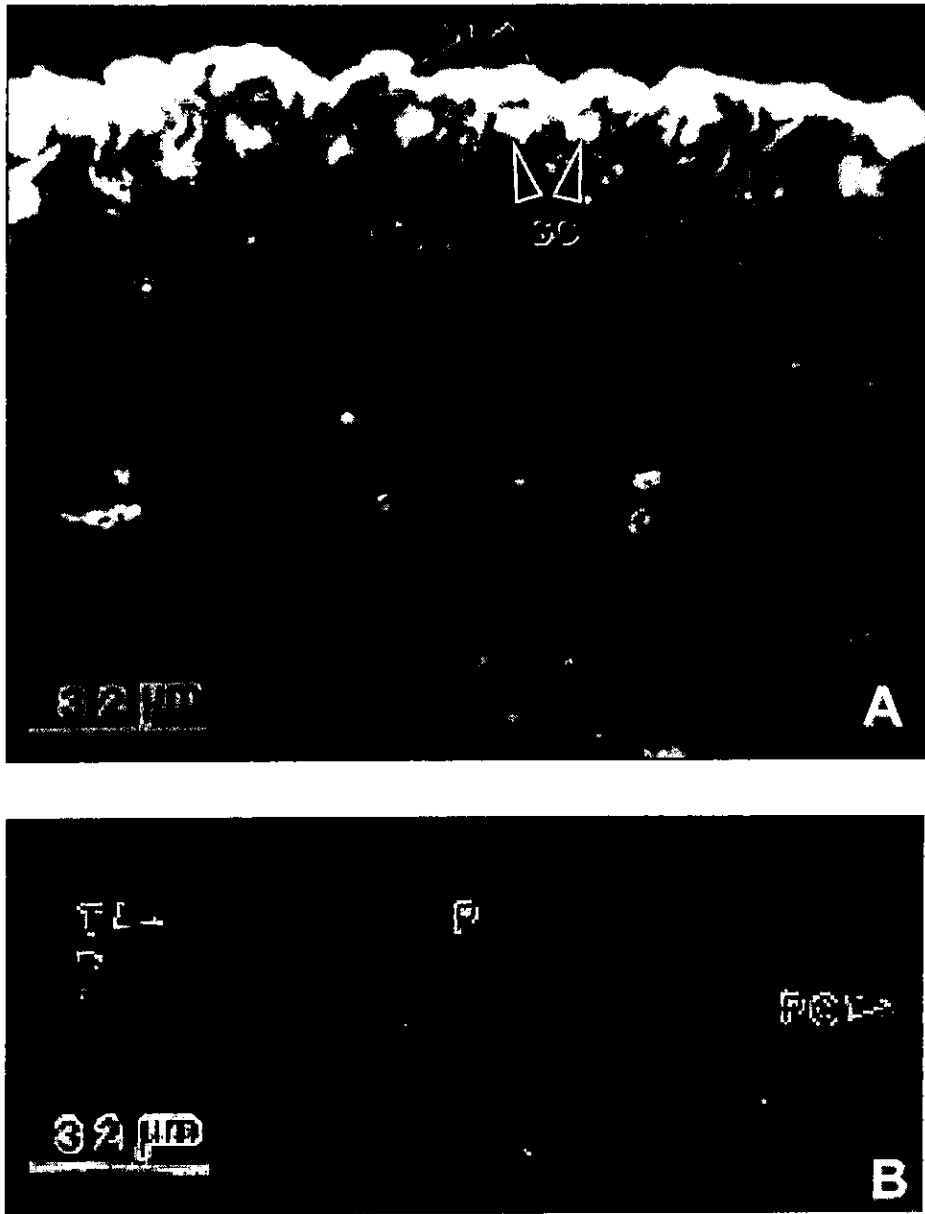


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta en un corte del metacéstodo de *Taenia solium* para la localización de GST. Cortes del parásito fueron incubadas (A) con anticuerpos específicos anti GSTTs y (B) IgGs de conejo normal. Las flechas y letras señalan (P) parenquima, (T) tegumento, (PC) citones protonefridiales y (SC) citones subtegumentales.

## V.7 Secuencia amino terminal de la GST nativa de *T. solium*

De manera inicial se realizó una secuencia amino terminal de la principal banda (26 kDa) que se observó en el corrimiento de la fGSTTs, encontrándose que se trataba de una secuencia con homología con GSTs de la clase  $\mu$  de mamíferos y con la GST del céstodo *E. multilocularis*. Posteriormente se secuenció la parte amino terminal de la banda que contenía una proteína de aproximadamente 28 kDa y también se pudo confirmar que la secuencia presenta homología con GSTs de la clase  $\mu$  de GSTs de mamíferos (Mannervik y cols. 1985, Liebau y cols. 1996).

Se puede observar en la figura 7 que ambas secuencias de GSTs de *T. solium* están relacionadas con la clase  $\mu$  de GSTs de mamíferos y con la GST de un céstodo como *E. multilocularis*, sin embargo también existen diferencias marcadas que establecen claramente que en el metacéstodo de *T. solium* existen al menos dos isoformas de GST con distinta secuencia amino terminal.

### ALFA

Rata 1-1	S G K P V L H Y F N A R G R M E C I R W L L A A A
Rata 1-2	P G K P V L H Y F N G R G R M E P I
Rata 2.2	P G K P V L H Y F D G R G R M E P I

### MU

Humano $\mu$	P M I L G Y W D I R G L A H A I R L L L E Y T
Rata 4-4	P M T L G Y W D I R G L A H A I R L F L E Y T D T
Ratón MIII	P M I L G Y W N V R G L T H P I R M L L Q Y T
Bovino	P M I L G Y W D I R G L A H A I S L L L

<i>E. multilocularis</i>	P M I L G Y W D I R G L A H A I R L L L E Y T
<i>T. solium</i>	P M I L G Y W D I R G L A H A I R L L L E Y T

### PI

Humano $\pi$	P P Y T V V Y F P V R G R C A A L R M L L A D
Rata 7-7	P P Y T I V Y F L V
Ratón MII	P P Y T I V Y F P V V D G C E A M

**Figura 7.** Comparación de la secuencia amino terminal obtenida para las GSTs de 26 y 28 kDa de *T. solium* con la secuencia amino terminal de la GST del céstodo *E. multilocularis* y otras GSTs de las clases ALFA, MU y PI de mamíferos. Los aminoácidos con negritas son idénticos en todas las secuencias alineadas de la clase MU, los aminoácidos subrayados son idénticos entre las secuencias de las GSTs de los dos céstodos alineados.

## V.8 Obtención por PCR, de fragmentos del gen que codifica para la GST de *T. solium* y secuenciación.

A partir de la secuencia amino terminal obtenida del la GST de 26 kDa de *T. solium* y de la región del sitio activo, que es muy conservada en todas las GSTs hasta ahora reportadas, se diseñaron oligonucleótidos que sirvieron como iniciadores en una reacción de PCR denominados NH<sub>2</sub>TGST y GST-26-3' respectivamente. Para esta reacción se usó como molde ADNc de metacéstodo del parásito, el fragmento obtenido fue de aproximadamente 250 pb, dicha banda, su secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se puede apreciar en la figura 8.

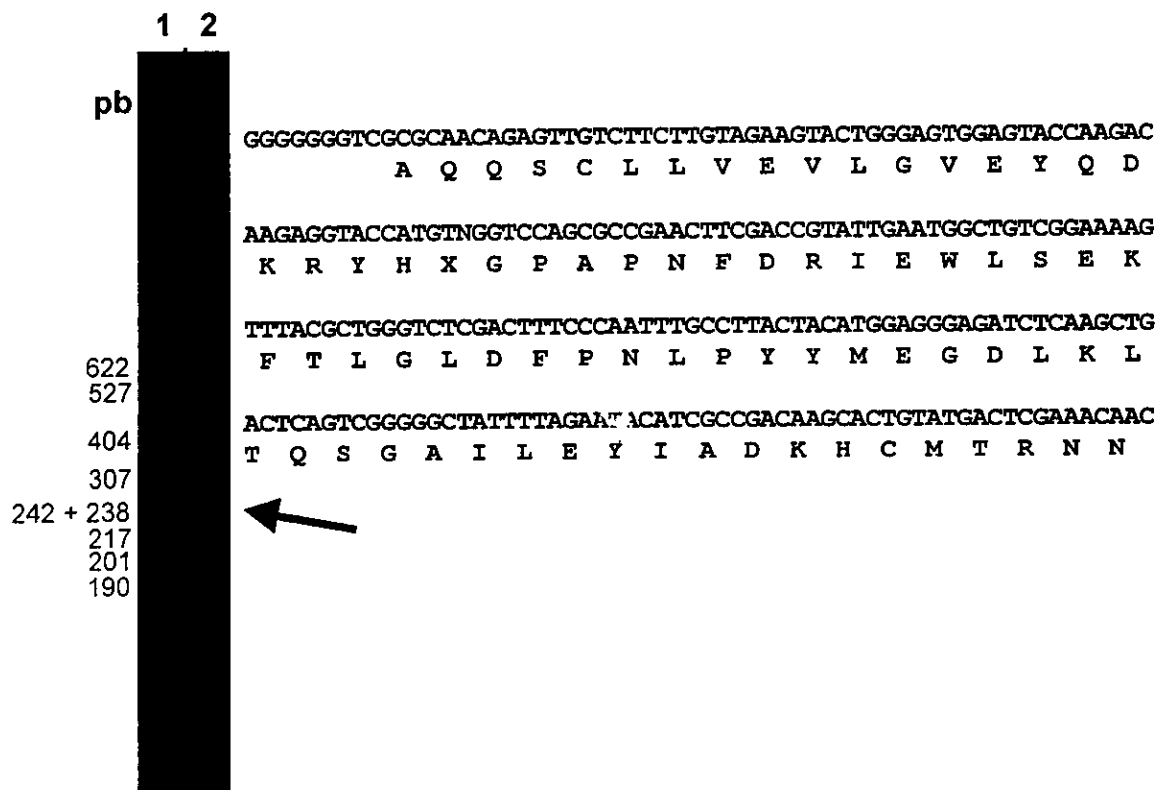


Figura 8. Producto de PCR obtenido usando como iniciadores los oligonucleótidos NH<sub>2</sub>TGST GST-26-3' y como molde cADN de metacéstodo de *T. solium*. (1) Pesos moleculares, (2) Producto y a la derecha la secuencia nucleotídica y de aminoácidos del producto.



En la Figura 9 se presenta la alineación de la secuencia del fragmento con la secuencia reportadas para isoformas de GSTs de clase  $\mu$  de otros parásitos helmintos, se observa que tiene alta homología con ellas, principalmente con el céstodo *E. granulosus*, por lo que, este fragmento resultó un candidato viable para ser usado como molde para generar una sonda radioactiva específica y tamizar la biblioteca de ADNc de *T. solium* para aislar clones de fagos con la secuencia completa que codifique para la enzima.

```

SJAP26      MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEIYEKYE EHL YER-----DEGDKWRNKKFELGLEFPNL
SMAN26      MAPKFGYWKVKGLVQPTRLLLEHLEETYEERAYDR-----NEIDAWSNDKFKLGLLEFPNL
1FAHEP      MPAKLG YWKIRGLQQPVRLLEIYEG-EKYEEQIYER-----DDGEKWFSSKKFELGLDLPNL
47FAHE     MPAKLG-YKLRGLAQPVRLLFLEYLGE EYE EHL YGR-----DDREKWMSEKFNMGDLPNL
7FAHEP     MPAKLG-YWIRGLQQPVRLFLEYLGE EYE EHL YGR-----DDREKWFSGDKFNMGDLPNL
51FAHE     MPAKLG YWKIRGLQQPVRLLEIYEG EYE EHL YGR-----DDREKWFSGDKFNMGDLPNL
1MUF AH    MPAKLG YWKIRGLQQPVRLLEIYEG EYE EHL YGR-----DDREKWFSGDKFNMGDLPNL
2MUF AH    -----WKLRGLAQPVRLLFLEYLGE EYE EHL YGR-----DDREKWMSEKFNMGDLPNL
3MUF AH    -----KIRGLQQPVRLFLEYLGE EYE EHL YGR-----NDREKWLGDKFNMGDLPNL
EMULTI     MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLLKYLEVEYDDKRYKIGSAPTFDRSAWLSEKFSGLGLDFPNL
TSOLIUM     TLAYWDIRGLAQQSCLLVEVLGVEYQDKRYHXGPAFNFDRIEWLSEKFTLGLDFPNL

SJAP26      PYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDF
SMAN26      PYYIDGDFKLTQSMAIIRYIADKHNMGACPKERAEISMLEGAVLDIRMGVLR IAYNKEY
1FAHEP      PYYIDDKCKLTQSLALIRYIADKHGMIGSTPEERARVSMIEGAAVDLRQGLSRI SYDPKF
47FAHE     PYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMIGSTPEERARISMIEGAAMD LRI GFGRVCYNPKF
7FAHEP     PYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMIGSTPEERARISMIEGAAMD LRI GFGRVCYNPKF
51FAHE     PYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMIGSTPEERARISMIEGAAMD LRMGFVRVCYNPKF
1MUF AH    PYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMIGSTPEERARISMIEGAAMD LRI GFGRVCYNPKF
2MUF AH    PYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMIGSTPEERARISMIEGAAMD LRI GFGRVCYNPKF
3MUF AH    PYYIDDKCKLTQSVAIMRYIADKHGMIGSTPEERARISMIEGAAMD LRI GFGRVCYNPKF
EMULTI     PYYIDGDFKLTQSGAILEYIADKHGMIPDCKKRRAVLHMLQCEVVDLRMAFTRTCYSPDF
TSOLIUM     PYYMEGDLKLTQSGAILEYIADKH

SJAP26      ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDGHVTHPDMFLYDALDVVLYMDPMLDAFPK
SMAN26      ETLKVDFLNKLPGRLKMFEDRLSNKTYLNGNCVTHPDMFLYDALDVVLYMDSQCLNEFPK
1FAHEP      EQLKEGYLKDLPPTMKMWSDFLGKNPYLRGTSVSHVDFMVYEALDAIRYLEPHCLDHFNP
47FAHE     EEVK EYVKELPKTLKMWSDFLGDRHYLTGSSVSHVDFMFLYETLDSIRYLAPHCLDEFPK
7FAHEP     EELKGDYLGKLPPTLTKMWSDFLGDRQYLTGSSVSVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLEDFPK
51FAHE     EEVKGDYLGKLPPTLTKMWSDFLGDRHYLTGSPVSHVDFMVYEALDCIRYLAPQCLEDFPK
1MUF AH    EEVK EYVKELPKTLKMWSDFLGDRHYLTGSSVSHVDFMFLYETLDSIRYLAPHCLDEFPK
2MUF AH    EELKGDYLGKLPPTLTKMWSDFLGDRQYLTGSSVSHVDFMFLYETLDSIRYLAPQCLEDFPK
3MUF AH    EELKGDYLGKLPPTLTKMWSDFLGDRQYLTGSSVSHVDFMFLYETLDSIRYLAPQCLEDFPK
EMULTI     EKLPGLFETLAQKLPNFEAYLGEKEWLTGDKINYPDFSLCELLNQLMKFEPTCLEKYPR

```

Figura 9. Alineamiento múltiple del fragmento obtenido por PCR a partir de cADN de *Taenia solium* usando como los iniciadores NH<sub>2</sub>TGST y GST-26-3', con secuencias de GSTs de otros helmintos (*Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* varias isoformas y *Echinococcus multilocularis*). Las regiones subrayadas corresponden a las regiones de reconocimiento de los iniciadores.

## V.9 Aislamiento de clonas de una biblioteca de ADNc de metacéstodo de *T. solium*

Como se detalló en Metodología, se generó una sonda radioactiva a partir de usar como molde el fragmento de GST obtenido por PCR utilizando hexanucleótidos con secuencias al azar ("Random primers"). Con ella se tamizó una biblioteca de  $\lambda$ gt10 con fragmentos de ADNc de todos los tamaños y denominada "total", en el tamizaje primario se observaron 3 marcas radioactivas, las cuales se aislaron y a partir de ellas se realizó un tamizaje secundario obteniéndose una gran cantidad de marcas positivas que coincidían con placas líticas individuales. Para consolidar el aislamiento de clonas positivas se realizó un tamizaje terciario donde se obtuvieron clonas aisladas que provenían de las tres clonas del tamizaje primario, denominadas T2MA, T2MB, T2MC en total se aislaron 9 todas provenientes de estas clonas iniciales, tres de cada una (Figura 10).

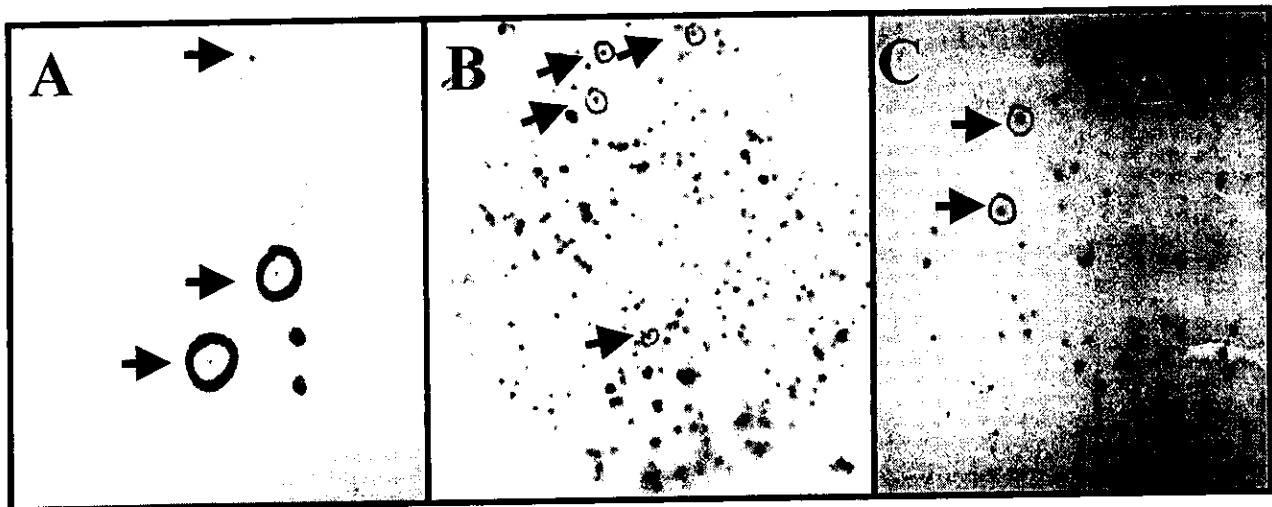


Figura 10. Tamizaje primario (A), secundario (B) y terciario (c) de la biblioteca de cADN en fagos  $\lambda$ gt10 que contenía insertos de todos tamaños, tamizada con una sonda radioactiva obtenida a partir de un fragmento de ADN de *T. solium* con homología con la secuencia de GSTs de diferentes especies. Las flechas señalan clonas positivas seleccionadas.

## V.10 Restricción de clonas de ADNc

De las clonas aisladas de la Biblioteca de DNAc, todas resultaron idénticas en tamaño, y al amplificar por PCR el inserto que utilizando oligonucleótidos del vector y oligonucleótidos específicos, se produjeron fragmentos de los tamaños esperados de acuerdo al par de iniciadores usados.

En la Figura 11A se puede apreciar que al amplificar con los iniciadores que reconocen regiones del vector que flanquean al inserto como son los denominados  $\lambda$ gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso, se obtiene un fragmento de aproximadamente 780 pb, al usar los iniciadores  $\lambda$ gt10 adelante y el iniciador interno GST-1R se obtuvo un fragmento de aproximadamente 550 pb y al usar  $\lambda$ gt10 adelante y el iniciador interno GST26-4 se obtuvo un fragmento de aproximadamente 280 pb.

Esto sugería fuertemente que las clonas aisladas podían estar completas y que efectivamente podía tratarse de la secuencia que codifica para una GST de *T. solium*.

Para buscar posibles clonas diferentes en cuanto a su patrón de restricción y con la finalidad de verificar los sitios más convenientes para poder insertar los fragmentos al vector de expresión, se realizaron cortes con enzimas de restricción a todos los fragmentos de las clonas seleccionadas, los fragmentos fueron amplificados usando los iniciadores  $\lambda$ gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso, todas las clonas mostraron el mismo patrón de restricción. En la Figura 11B se aprecia el patrón de restricción de la clona GST T2MA como representativa ya que como se mencionó, todas resultaron iguales al usar las enzimas Eco RI, Kpn, Bam HI, Sal I, Sac I, Xba I, Pst, Hind III, y Xho I, se puede apreciar que solo las enzimas, Eco RI, Kpn y Pst cortaron a los fragmentos, el resto no logró cortarlas por lo que se seleccionaron los sitios Bam HI y Nco I, esta última se selecciono por ser un sitio presente en el vector y aunque no aparece en la figura, se comprobó que no cortaba al fragmento.

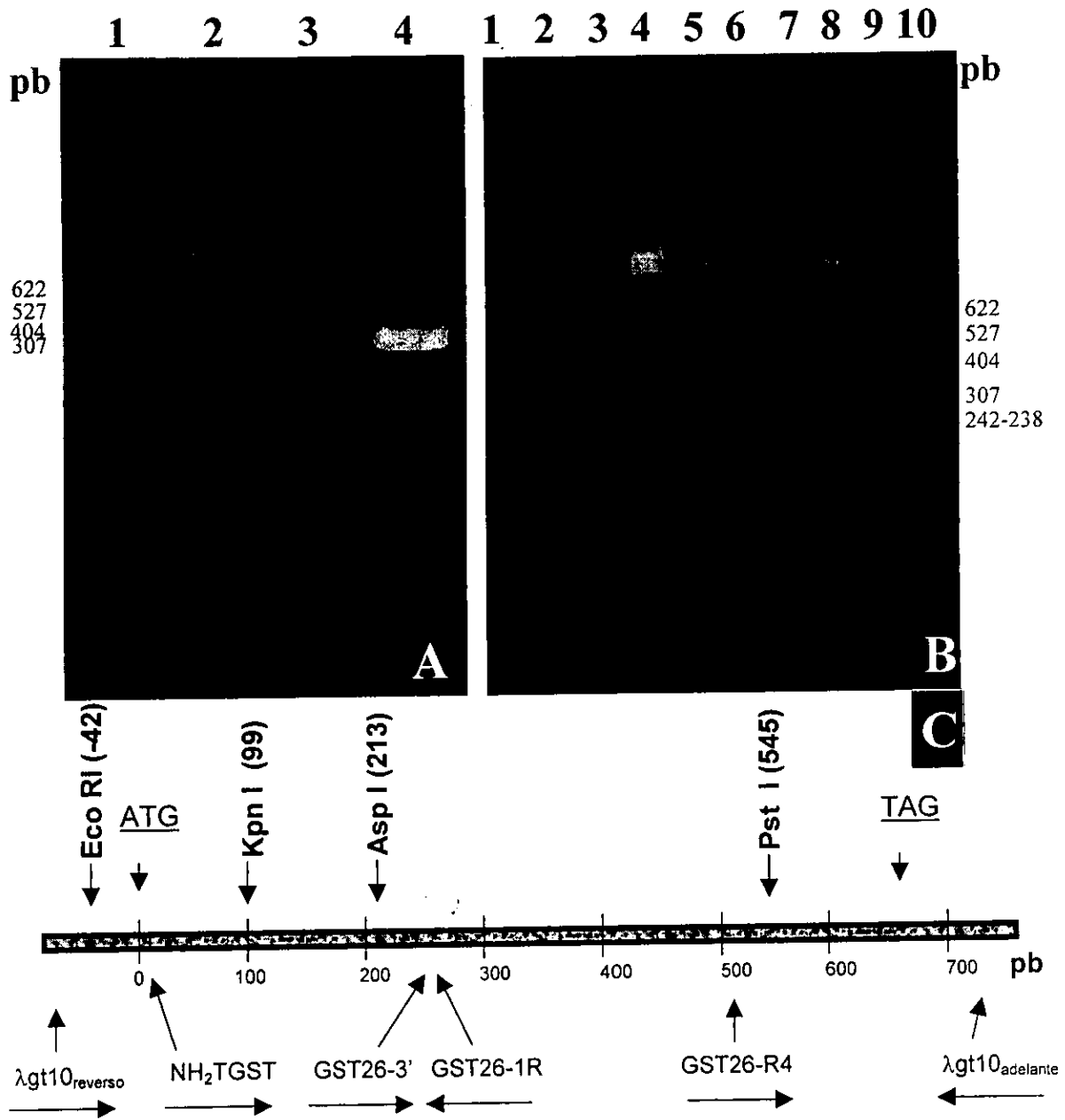


Figura 11. A) Marcadores de peso molecular (1), productos de PCR de la Clona GST T2MA amplificados con los iniciadores:  $\lambda$ gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso (2),  $\lambda$ gt10 adelante y GST26-1R (3),  $\lambda$ gt10 adelante y GST26-R4 (4). B) Producto de PCR de la Clona GST T2MA amplificados con los iniciadores:  $\lambda$ gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso y digeridos con las enzimas de restricción: Eco RI (1), Kpn I (2), Bam HI (3), Sal I (4), Sac I (5), Xba I (6), Pst I (7), Hind III (8), y Xho I (9), marcadores de peso molecular (10). C) Mapa de restricción, en negritas se muestran los sitios de restricción de corte único, subrayado el codón de inicio y de término, los iniciadores se señalan con una flecha que indica su sentido de extensión.

## V.11 Secuenciación de la clona seleccionadas y alineamiento múltiple con GSTs de helmintos y cerdo

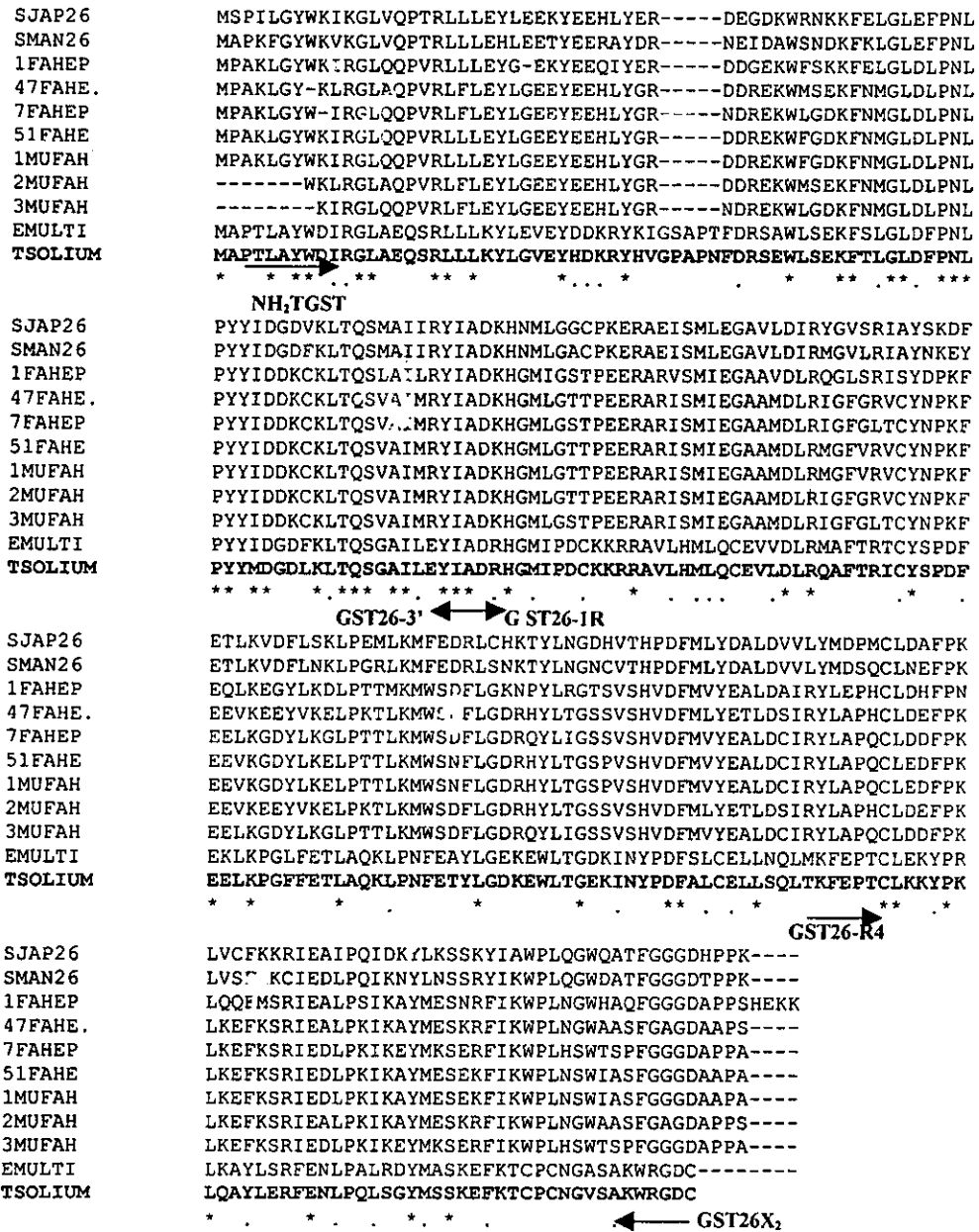


Figura 12. Secuencia del producto de PCR de la clona GST T2MA amplificado con los iniciadores  $\lambda$ gt10 adelante y reverso, alineada con secuencias de isoformas de GST de *S. japonicum*, *S. mansoni*, *F. hepatica* y *E. multilocularis*. Los asteriscos señalan identidades y los puntos homología, las flechas señalan el sentido de los iniciadores utilizados para la secuenciación.

Se escogieron dos clonas para determinar su secuencia de nucleótidos (GST T2MA y GST2MB). En ambas su análisis muestra una región de 657 pares de bases codificando para una proteína de 25.5 kDa con 219 aminoácidos.

Estos datos coinciden con el tamaño de una de las bandas de la fracción con actividad de GST del parásito, cuyo peso se había estimado de 26 kDa, además la secuencia de la región amino terminal obtenida directamente de la proteína coincide plenamente con la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica del fragmento de las clonas aisladas. Estas evidencias y el alineamiento permitieron afirmar que se habían aislado clonas de ADNc insertas en el fago  $\lambda$ gt10 que codifican para una GST de *T. solium*. La secuencia completa del fragmento se observa en la Figura 12. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos indica una homología del 86.7% con la GST de clase  $\mu$  del céstodo *Echinococcus multilocularis*, asimismo presenta una alta homología en la región amino terminal con otras GSTs de clase  $\mu$ , lo que sugiere una relación con esta clase (Figura 12). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos anteriormente respecto a la clasificación enzimática hecha para la fracción con actividad de GST extraída del parásito.

```

PIGDE      -MADLTELMKN-----EVFMFASYATIVLSKMMFMS-----TAT-----AFY
PIGAL      MAGKPLHYFNRRMECIRWLLAAAGVEFEKFIKTPEDLDKLTNDG-----SLLFQ
PIGPI      --PPYTTITYFPVFCRCEAMRMLLADQDQSWKEEVVMTETWPPLKPS-----CLFR
TSOLIUM    MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLKYLGV EYHDKRYHVGPAPNFDRSEWLSKFTLGLDFP
                                     *

PIGDE      RLTRK-----VFA*P IDC---SSFGK-GENAKKYLRTD---ERVERVRAHLNDLEN-
PIGAL      QVPMVEIDGMKLVQTPAILNYIATKYNLYGKDAKERALIDMYTEGVADLGMILLPLCP
PIGPI      QLPKFQDGLTLYQSNAILRHLGRSFGLYGKDQKEAALVDMVNDGVEDLRCKYATLIYT-
TSOLIUM    NLPYYMDGDLKLTQSGAILEYIADRHGMIPDCKKRRRAVLHMLQCEVLDLRQAFTRICYSP

PIGDE      -IVPFLGIGLLYSLSG---PDLSTAILH---FRLFVGARIYHT-----IAYLTPLPQ
PIGAL      PNEKDARVASIKEKSTNRYLPAFEKVLKS--HGQDYLVGNKLSRADIQLVELLYVEELD
PIGPI      -NYEAGKEKYVKELPE--HLKPFETLLSQNGGQAFVVGSIQSFADYNLLDLRIHQVLN
TSOLIUM    -DFEELKPGFFETLAQ--KLPNFETYLGD----KEWLTGEKINYPDFALCELLSQTKEF

PIGDE      PNRGLAF-----FLGYG*LSMAYRLKLS-R-----LYL-----
PIGAL      PSLLANFPLLKALKTRVSNLPTVKKFLQPGSQRKPPMDAKKIRRSQEYFPD
PIGPI      PSCLDAFPLLSAYVARLSARPKIKAFILASPEHVNRPNGN ----GKN----
TSOLIUM    PTCLKKYPKLAQYLERFENLPQLSGYMSSKEFKTCPCNGVSAKWRGDC
                                     * * *

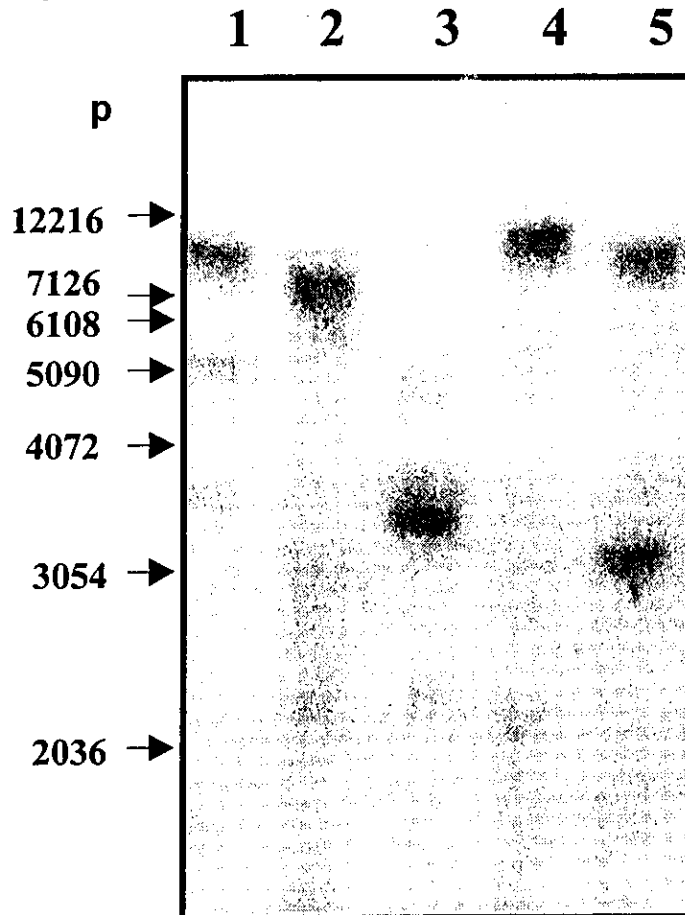
```

**Figura 12.** Secuencia completa del producto de PCR de la Clona T2MA amplificados con los iniciadores  $\lambda$  gt10 adelante y  $\lambda$ gt10 reverso y alineada con secuencias de GSTs de cerdo. Los asteriscos señalan identidades y los puntos homologías.

Existe baja homología entre la GST de *Taenia solium* y las GSTs hasta ahora descritas para el cerdo, las clases de GSTs descritas para cerdo son alfa, pi y delta y se pueden observar en la Figura 12. Este hallazgo permite confirmar que la secuencia de GST clonada pertenece al parásito y no al cerdo.

## V.12 Southern blot

Para establecer el número de copias del gen que codifica para esta forma de GST aislada de *T. solium*, se utilizó ADN genómico de cisticerco, el cual se sometió, en reacciones separadas, a la acción de 3 enzimas de restricción que cortan el fragmento ( Eco RI, Pst y Kpn) y de 2 que no lo cortan (Hind III, Bam HI ).



**Figura 13.** Ensayo Southern blot utilizando ADN genómico de cisticerco de *T. solium* cortado con: (1) Eco RI, (2) Hind III, (3) Pst, (4) Bam HI y (5) Kpn, se utilizó una sonda radioactiva generada a partir de la secuencia completa del ADNc que codifica para la GST de *T. solium*.

Los productos de las digestiones se corrieron en un gel de agarosa y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se hibridó con una sonda marcada radioactivamente y específica para el fragmento clonado de GST de *T. solium*.

La presencia del bajo número de bandas generadas por cada una de las enzimas empleadas que se observan en la figura 13, permiten sugerir que el gen que codifica para esta forma de GST de *T. solium* es de copia única en el genoma del parásito.

### **V.13 Clonación en el vector de expresión pTRC99A.**

Una vez establecido que el fragmento de las clonas seleccionadas eran iguales desde el punto de vista de su patrón de restricción de productos de PCR generados con diferentes pares de oligonucleótidos específicos y después de encontrar la misma secuencia para las clona GST T2MA y GST T2MB se decidió utilizar solo una para insertarla en el vector de expresión, la seleccionada fue la clona GST T2MA.

Corriente arriba del codón  $\alpha$  inicio del marco de lectura abierta del fragmento se generó un sitio Nco I y corriente abajo del codón de termino un sitio Bam HI, esto se realizó mediante PCR y utilizando los oligonucleótidos denominados GSTX<sub>1</sub> y GSTX<sub>2</sub> respectivamente. Una vez generados estos sitios, tanto el fragmento resultante como el vector pTrc99A de 4176 pb fueron cortados con las enzimas Bam HI y Nco I, para posteriormente ligarlos. Se recuperaron 2 clonas denominadas GST26 MC3 y GST26 MC6, las cuales al digerirlas se obtuvo al vector y un fragmento que correspondía al tamaño del inserto (Figura 14A).

Para confirmar que el fragmento completo se introdujo al vector, se realizaron PCRs con dos iniciadores que identifican regiones del vector corriente arriba (pVEC) y abajo (pVECR) del sitio de clonación del vector de expresión pTrc99A, también se usaron iniciadores específicos del fragmento insertado, los productos obtenidos fueron de los tamaños que correspondían a la secuencia conocida (Figura 14B). Estos hallazgos y la secuencia completa de la clona



permitieron establecer que el fragmento completo que codifica para una forma de GST de *T. solium* fue insertado adecuadamente dentro del vector de expresión.

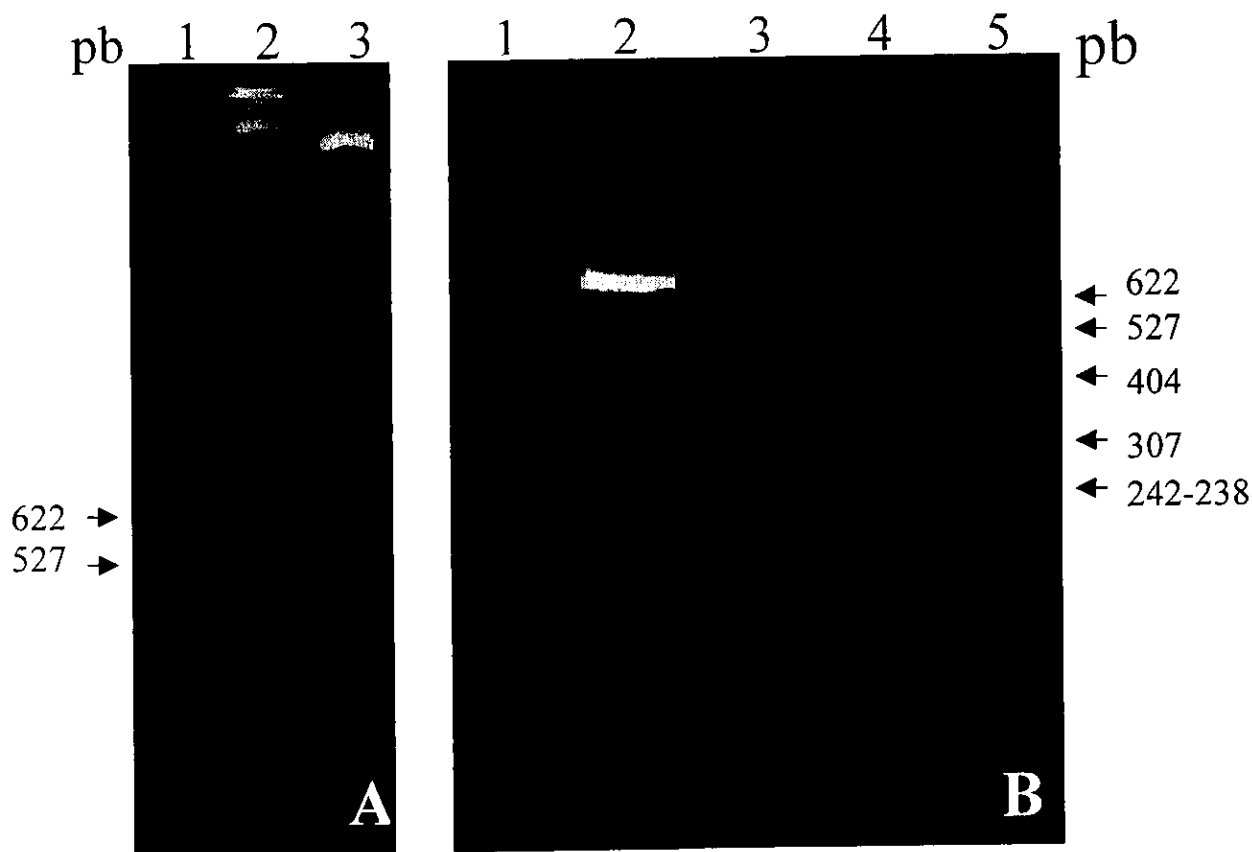


Figura 14. A) Clona GST26 MC6 (vector pTrec99A + Fragmento GST26 T2MA) sin digerir (2) y digerida con las enzimas Nco/Bam HI (3). Marcadores de peso molecular (1). B) PCR de la clona GST26 MC6 con los iniciadores NH<sub>2</sub>TGST y GST26-3' (1), NH<sub>2</sub>TGST y GSTX<sub>2</sub> (2), pVEC y pVECR (3), M13f y M13r como iniciadores no relacionados (4) , Marcadores de peso molecular (5).

#### V.14 Expresión y caracterización de la GST recombinante de *T. solium*.

Usando como recipiente la bacteria *Escherichia coli* JM105 se preparó un cultivo de 500 mL para la producción de proteína recombinante de la cepa

GST26 MC6 en el vector pTrc99A como se detalló en el capítulo de Metodología, obteniéndose un rendimiento de 12 mg de proteína por litro de cultivo. En la figura 16A se observa que después de la inducción se sobreexpresa una proteína de peso aproximado a 26 kDa y al pasar el lisado del cultivo a través de una columna de GSH-Sefarosa se purificó una proteína del mismo peso, lo que indica que efectivamente la GST que se clonó, corresponde a una de tamaño similar presente en la fracción aislada a partir del parásito (fGSTTs).

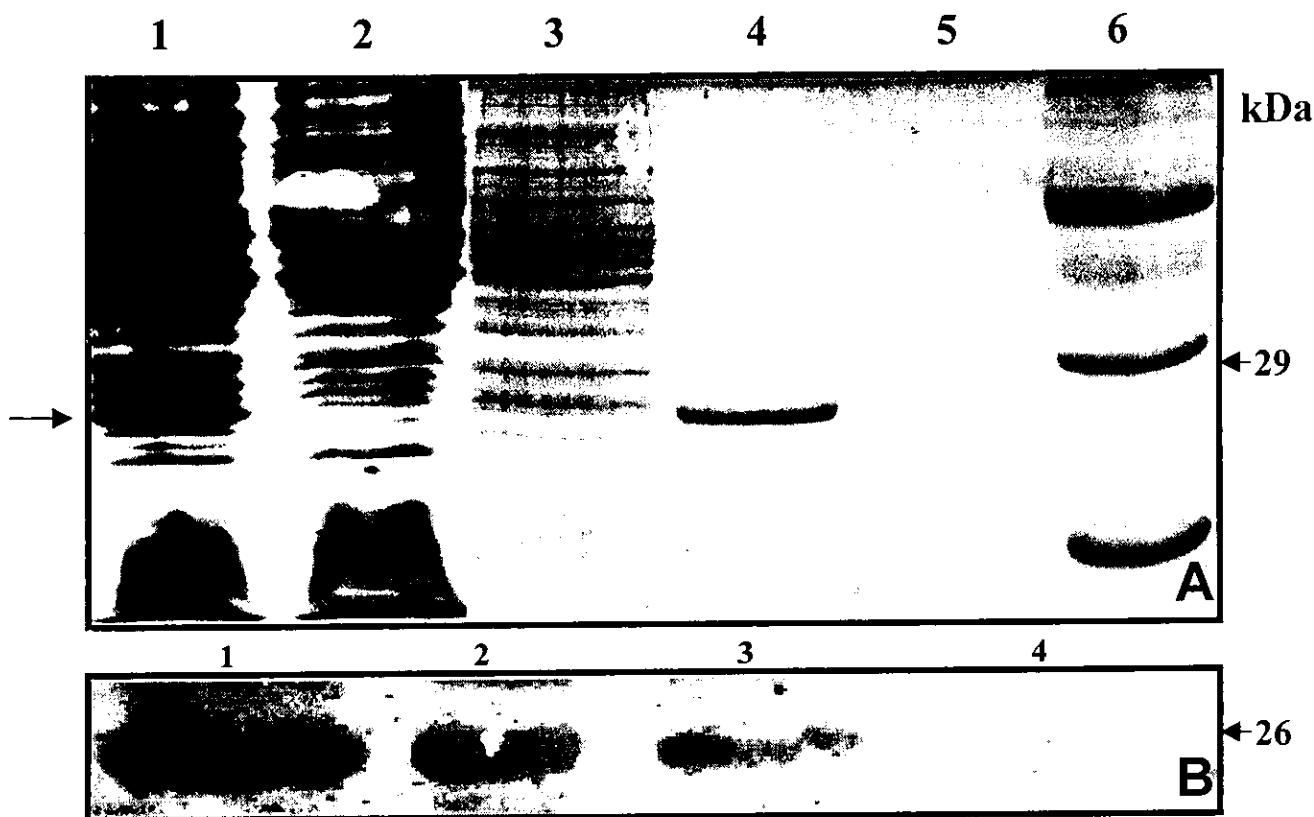


Figura 16. A) SDS-PAGE 12.5% condiciones reductoras. Extractos de *E. coli* JM105: 1 y 4) transformadas con pTrc99A-GST26 MC6 de *T. solium* e inducidas con IPTG 2 mM, 2 y 5) transformadas con oTrc99A vacío e inducida con IPTG 2 mM, 3) sin transformar, 4 y 5) Pasados por columna de GSH-Sefarosa y eluido con Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y GSH 5 mM, 6) Pesos moleculares. B) Inmunoelectrotransferencia de extractos de *E. coli* JM105 transformadas con pTrc99A-GST26 MC6 de *T. solium* e inducidas con IPTG 2 mM, incubados con anticuerpos anti fGSTTs a las 4 horas (1), 2 horas (2), 1 hora (3) y al tiempo cero (4).

Cuando se transformaron bacterias con el vector vacío o cuando no se agregó el inductor IPTG, la banda de 26 kDa no fue sobreexpresada. De un lisado de bacterias crecidas en estas condiciones y pasado a través de la columna GSTH-sefariosa no se obtuvo ninguna proteína (Figura 16A).

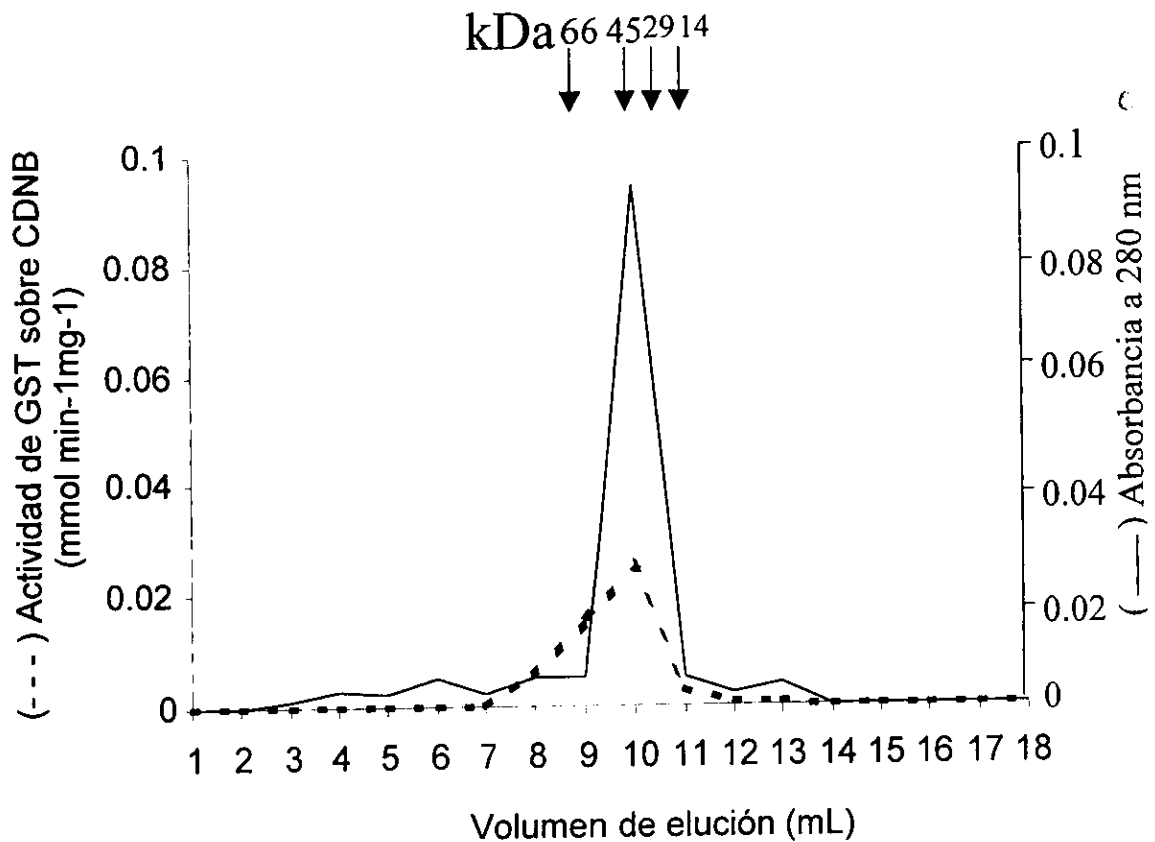
Los anticuerpos generados al inmunizar conejos con la fGSTTs reconocen a la GST recombinante, esto se aprecia claramente en una cinética de inducción de la proteína a diferentes tiempos donde a partir de 1 hora ya se observa la producción de la proteína recombinante, alcanzando su máxima expresión las 4 horas (Figura 16B).

La GST recombinante de *T. solium* (GSTrTs) se sometió a filtración en gel, a las diferentes fracciones se les determinó la actividad específica sobre el substrato CDNB y se les monitoreó la absorbancia a 280 nm como una medida de la presencia de proteína. En la Gráfica 3 se observa un solo pico que coincide con la fracción con mayor cantidad de proteína y actividad específica, lo que indica que el dímero de la GST recombinante de *T. solium* tiene un peso molecular aproximado de 47 kDa.

En el Cuadro 7 se muestra que la GSTrTs es capaz de metabolizar a: 1-Cloro-2,4-, Acido Etacrínico, Hexa-2,4-dienal, *trans*-Non-2-enal, Hidroperóxido de Cumeno, 1,2-Dicloro-4-nitrobenceno y Bromosulfaleina, por otro lado no presento actividad detectable sobre Peróxido de Hidrógeno, ni sobre 1,2-Epoxy-3-(*p*-nitrofenoxi) propano.

Estos resultados muestran que la enzima recombinante producida en *E. coli* es activa sobre los mismos substratos sobre los que es activa la fGSTTs, los valores puntuales específicos varían respecto a lo encontrado con fGSTTs, sin embargo se encuentran dentro del mismo orden de magnitud.

Los ensayos de inhibición revelan que los tres inhibidores tienen efecto negativo sobre la actividad enzimática de la GST recombinante de *T. solium*, en el Cuadro 8 se puede observar que la inhibición por Cloruro de Trifeniltin y por Azul de Cibacrón es aproximadamente 6 veces mayor que la causada por Bromosulfaleina.



**Gráfica 3.** Cromatografía por filtración en gel de la proteína GST recombinante de *T. solium* (GSTRTs), la curva en línea continua representa la absorbancia medida a 280 nm y la línea discontinua representa la actividad específica sobre el sustrato CDNB determinada como se describió en Metodología. Los números y flechas sobre el perfil de elución indican la posición de los marcadores de peso molecular usados para calibrar la columna.

Los datos de actividad específica sobre los sustratos evaluados, así como los datos de inhibición obtenidos al ser comparados con los valores reportados para las familias de GSTs de mamíferos para estos mismos sustratos (Mannervik y cols. 1985), revelan similitud de la actividad de GST recombinante con la clase  $\mu$  de GSTs de mamíferos.

Usando la misma metodología con la que se determinó la  $K_m$  y la  $V_{max}$  de la fGSTTs se encontró que la GST recombinante presentó un valor de 11.1  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  para la  $V_{max}$  y un valor de 3.3 mM para la  $K_m$

### CUADRO 7

Actividad específica de GST recombinante de *T.solium* sobre diferentes sustratos

Substrato	Actividad específica ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )
1-Cloro-2,4-dinitrobenceno	2.16
1,2-Dicloro-4-nitrobenceno	0.493
Bromosulfaleina	0.088
Acido Etacrínico	0.609
1,2-Epoxy-3-(p-nitrofenoxi) propano	No detectada
Hexa-2,4-dienal	0.324
trans-Non-2-enal	0.187
Hidroperóxido de Cumeno	1.22
Hidroperóxido de Hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	No detectada

### CUADRO 8

Determinación de la  $I_{50}$  de diferentes sustancias inhibitorias sobre la actividad de GST recombinante de *T. solium* sobre el sustrato CDNB.

Inhibidor	$I_{50}$ $\mu\text{M}$
Cloruro de Trifeniltín	0.68
Azul de Cibacrón	0.71
Bromosulfaleina	6.32

#### V.15 Ensayos de protección en el modelo *T. crassiceps* –ratón.

Inicialmente se realizaron ensayos de protección para determinar la influencia de tres distintos adyuvantes (Adyuvante de Freund, Hidróxido de Aluminio y Saponina) sobre los eventuales niveles de protección que podría conferir la enzima GST de *T. solium*. De igual manera se realizaron ensayos preliminares que permitieran establecer las concentraciones más adecuadas de

antígeno, los ensayos en esta etapa se realizaron con el protocolo corto (sacrificio a los 30 días postreto) especificados en la metodología, la vía de inmunización siempre fue la subcutánea y el antígeno empleado en esta etapa fue la fGSTTs.

En el Cuadro 9 podemos observar que cuando usamos adyuvante de Freund (1  $\mu$ L por cada  $\mu$ g de proteína) y 10  $\mu$ g de ECMTs (Extracto crudo de metacéstodo de *T. solium*) se logró un nivel de protección del 78.6% muy similar al 74.2 % logrado al usar el mismo adyuvante y la misma cantidad de antígeno fGSTTs, al disminuir la concentración de fGSTTs a 1  $\mu$ g se redujo el nivel de protección al 54.1%, podemos decir que cuando usamos adyuvante de Freund y fGSTTs el nivel de protección es directamente proporcional a la dosis de antígeno empleada.

Cuando la Saponina fue empleada como adyuvante (10  $\mu$ g/ratón) se observó que el ECMTs a la dosis de 10  $\mu$ g fue más eficiente como antígeno protector en comparación a los otros dos adyuvantes evaluados, logrando un 81.9 % de reducción de la carga parasitaria, sin embargo al usar fGSTTs como antígeno la mayor capacidad protectora se observó a dosis de 1  $\mu$ g (62.5%) en relación con el uso de 10  $\mu$ g (62.5%), los datos sugieren que, en este caso la relación concentración de antígeno/protección usando estas dos dosis es inversamente proporcional, tal como se aprecia en el Cuadro 9.

Al utilizar Hidróxido de Aluminio como adyuvante (1  $\mu$ g por cada 30 $\mu$ g de proteína), se lograron niveles de protección inversamente proporcionales a la cantidad de antígeno empleado, cuando se empleó la fGSTTs como antígeno, 37.5% al usar 1  $\mu$ g y 35.2% al usar 10  $\mu$ g. En el Cuadro 9 se puede apreciar también, que los niveles de reducción de la carga parasitaria, al utilizar este adyuvante y el ECMTs, fue la de menor magnitud comparada con el uso de los otros dos adyuvantes evaluados en este trabajo, tan solo del 52.1%.

Estos resultados dieron una primera evidencia de que la fracción con actividad de GST de *T. solium* es lo suficientemente importante en el metabolismo de detoxificación del parásito y que si se usa como antígeno, es posible que se induzca una respuesta inmune protectora en el modelo de cisticercosis intraperitoneal causada por *T. crassiceps* en ratón.

### CUADRO 9

Ensayo de protección contra la cisticercosis en ratón causada por *Taenia crassiceps* con protocolo corto (sacrificio 30 días post-reto). Cada grupo se formó con 7 ratones BALB/cAnN hembras de 4 a 6 semanas de edad. (DE) desviación estándar. \*Diferencia significativa respecto al grupo testigo (P<0.05)

Adyuvante	Antígeno	Dosis de Antígeno µg/ratón	X del número de cisticercos ± DE	% de reducción de parásitos
Saponina	PBS	----	127±30	----
	ECMTs	10	23±21	81.9*
	fGSTTs	10	77±47	39.9
	fGSTTs	1	48±39	62.5*
Ady. de Freund	PBS	----	137±65	----
	ECMTs	10	29±28	78.6*
	fGSTTs	10	35±48	74.2*
	fGSTTs	1	63±40	54.1*
Al(OH) <sub>3</sub>	PBS	---	105±50	----
	ECMTs	10	50±44	52.1
	fGSTTs	10	68±45	35.2
	fGSTTs	1	34±29	67.5*

El adyuvante de Freund no puede ser empleado como adyuvante en una vacuna de aplicación generalizada, debido a las lesiones que puede ocasionar, en cambio Al(OH)<sub>3</sub> y Saponina no causan daño alguno a las dosis adecuadas. En base a los niveles de protección alcanzados en los ensayos preliminares, cualquiera de las dos sustancias podría ser usada como adyuvante en los siguientes ensayos. Con la finalidad de probar diferentes dosis de la proteína en experimentos de diferente duración se seleccionó solo a Saponina como adyuvante a utilizar. Considerando entonces que la Saponina (10 µg/ratón) presentó mejor nivel de protección a 1 µg que a 10 µg de antígeno, se decidió

ensayar con una dosis por arriba y otra por abajo de 1  $\mu\text{g}$ , es decir 0.5  $\mu\text{g}$  y 5  $\mu\text{g}$  de antígeno.

Por otro lado, se utilizaron las dos proteínas que fueron factibles separar por electroforesis y electroelución a partir de la fracción con actividad de GST, es decir las bandas correspondientes a 26 kDa y 28 kDa, ambas con secuencia amino terminal correspondiente a GSTs, estas fueron utilizadas a una dosis de 5  $\mu\text{g}$ , debido a que esta fue la dosis que finalmente resultó con mayor eficacia cuando se ensayaron previamente las diferentes dosis de fGSTTs (Cuadro 10).

También se utilizó como antígeno la GST recombinante de *T. solium* (GSTrTs) a una dosis de 5  $\mu\text{g}$ . En el Cuadro 10 se muestra un compilado de todos los experimentos realizados con el protocolo corto (sacrificio 30 días postreto), ahí se incluyen el promedio de parásitos encontrados en el total de ratones usados en cada condición experimental, es decir cuando la (n) es 21 significa que el experimento se repitió 3 veces con lotes de 7 ratones, cuando la (n) es 14 los datos son el producto de dos experimentos y cuando (n) es 7 el experimento solo se realizó una vez.

Al obtener el promedio final de todos los experimentos en que se usaron 10  $\mu\text{g}$  la fGSTTs, se observó un valor de protección mayor (54%) que el obtenido en los experimentos preliminares (39.9%), sin embargo, se puede observar que los mejores niveles de protección se obtienen al utilizar 5  $\mu\text{g}$  de antígeno como dosis (90%) (Cuadros 10 y 11). Al usar 0.5  $\mu\text{g}$  se lograron niveles significativos de protección, pues se confiere un 58% de reducción en el número de parásitos presentes en el peritoneo de los ratones infectados.

Resalta también el hecho de que la GSTrTs no fue capaz de conferir una protección estadísticamente significativa, pues solo confiere el 25% de disminución de la carga parasitaria en los ratones,

Se observó en un solo un ensayo, que las GSTs de 26 y 28 kDa por separado no logran los niveles de protección que la fracción completa de la que fueron aisladas, ya que solo protegen el 46 y el 74 % respectivamente, sin embargo para el caso de la de 28 kDa el nivel de protección es estadísticamente



significativo y no se considera un porcentaje muy bajo respecto al 90% logrado con la fracción completa.

#### CUADRO 10

**Ensayo de protección contra la cisticercosis en ratón causada por *Taenia crassiceps* con protocolo corto (sacrificio 30 días postreto), usando 10 µg de Saponina por ratón como adyuvante. (n) Número total de ratones que recibieron el mismo tratamiento, cada grupo se formó con 7 ratones BALB/cAnN hembras de 4 a 6 semanas de edad. (DE) desviación estándar. \*Diferencia significativa respecto al grupo testigo (P<0.05)**

Antígeno	Dosis de antígeno µg/ratón	(n)	X del número de cisticercos ± DE	% de reducción de parásitos
PBS	----	21	121±35	----
ECMTs	10	21	24±27	80*
fGSTTs	0.5	14	51±31	58*
fGSTTs	1	21	60±35	50*
fGSTTs	5	14	12±29	90*
fGSTTs	10	14	56±47	54*
GST26Ts	5	7	65±39	46
GST28Ts	5	7	32±27	74*
GSTrTs	5	14	90±38	25

Con la finalidad de valorar, si la protección alcanzada a los 30 días postreto (protocolo corto) se conserva por más tiempo, se ensayaron dosis de 1 y 5 µg de fGSTTs y de GSTrTs, 5 µg de GST26Ts y GST28Ts y 10 µg de la proteína recombinante ROP (proteína de ropría de *T. gondii*) como control de una proteína no relacionada en un protocolo llamado largo, cuyo único cambio respecto al corto fue que el sacrificio se llevó a cabo 60 días después del reto. Se observa en el Cuadro 11 que el número de cisticercos recuperados del peritoneo de los ratones infectados que no recibieron ningún antígeno se eleva aproximadamente 6 veces más con respecto al mismo control en el experimento corto. Los porcentajes de disminución de parásitos cuando se usaron 1 y 5 µg de

fGSTTs fueron 84 y 85% respectivamente, lo cual permite decir que este antígeno es capaz de proteger a los ratones contra la cisticercosis por *T. crassiceps* 3 meses después de la última inmunización.

La GSTrTs al igual que en los experimentos cortos, no es capaz de proteger contra la cisticercosis murina en el modelo empleado en el modelo largo, pues como se observa en el Cuadro 11 solo se alcanzaron niveles de protección del 20 y el 9% al usar 5 y 1 µg de GSTrTs como antígeno, respectivamente

#### CUADRO 11

**Ensayo de protección contra la cisticercosis en ratón causada por *Taenia crassiceps* con protocolo largo (sacrificio 60 días postreto), usando 10 µg de Saponina por ratón como adyuvante. (n) Número total de ratones que recibieron el mismo tratamiento, cada grupo se formó con 7 ratones BALB/cAnN hembras de 4 a 6 semanas de edad. (DE) desviación estándar. \*Diferencia significativa respecto al grupo testigo (P<0.05)**

Antígeno	Dosis de antígeno µg/ratón	(n)	X del número de cisticercos ± DE	% de reducción de parásitos
PBS	----	14	721±178	----
fGSTTs	1	14	112±354	84*
fGSTTs	5	14	109±231	85*
GSTrTs	1	7	656±237	9
GSTrTs	5	7	578±92	20
GST26Ts	5	7	522±85	28
GST28Ts	5	7	405±93	44*
ROP	5	14	696±217	3

La proteínas GST26Ts mantuvo baja su capacidad protectora respecto al experimento corto, ya que solo protegió el 28%, respecto a la GST28Ts se pudo observar que su nivel de protección disminuyó del 74% alcanzado en el protocolo corto (Cuadro 10) al 44 % en el protocolo largo (Cuadro 11).

La proteína de ropría de *T. gondii* no favoreció la disminución en el número cisticercos intraperitoneales de *T. crassiceps* presentes en los ratones infectados, pues tan solo protegió un 3%.

## **V.16 Respuesta inmune humoral de los ratones en los ensayos de protección.**

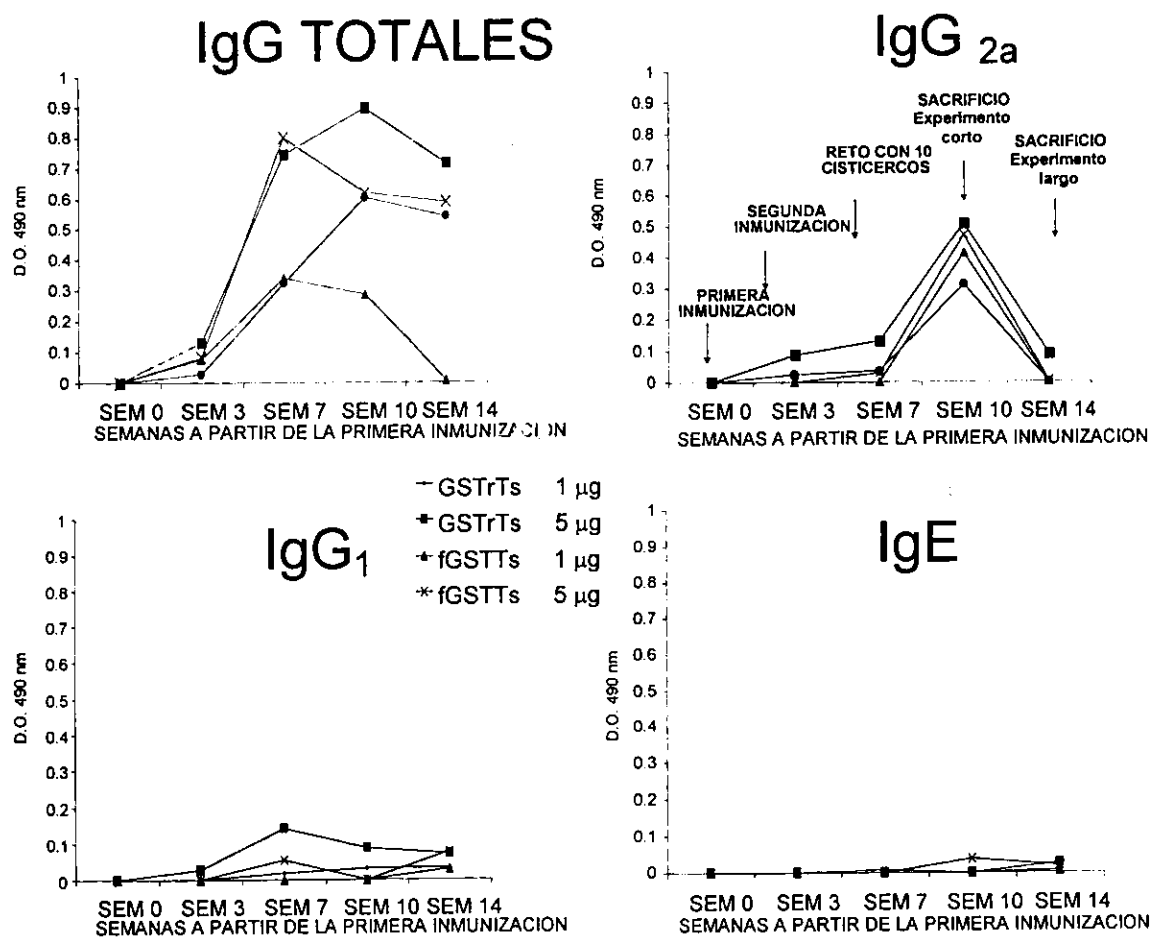
En los experimentos iniciales en los cuales se valoró la capacidad protectora de la fGSTTs, variando el adyuvante y las concentraciones de proteína, se evaluó la presencia de inmunoglobulinas clases G y E y de las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub> utilizando la técnica de ELISA.

Al contrario que en los controles, en los que no se evidenció respuesta inmune contra la fGSTTs, cuando se usó fGSTTs más adyuvante de Freund o alumbre se encontró presencia de IgGs totales y las subclase IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub> contra la fGSTTs pero no se detectó IgE. Las IgGs totales y las subclases evaluadas se incrementaron a partir de la segunda inmunización alcanzando su máximo al sacrificio, la relación entre estas inmunoglobulinas no correlacionaron con un perfil en particular de respuesta inmune cooperadora, es decir no hubo un claro perfil TH1 o TH2. La concentración de proteína utilizado como antígeno (1 y 10 µg) influyó en la cantidad de inmunoglobulinas presentes, a mayor antígeno mayor cantidad de anticuerpos.

Dado que la Saporina fue el adyuvante de elección y que las mejores dosis, tanto en los experimentos cortos como en los largos, fueron 5 y 1 µg para la fGSTTs y estas mismas cantidades se emplearon para la GSTrTs se evaluó el tipo de respuesta inmune que generan los ratones inmunizados con estas proteínas a dichas dosis, para tal fin se realizaron ensayos de ELISA para valorar indirectamente la presencia de inmunoglobulinas de clase IgG, IgE y las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub> con especificidad contra el antígeno respectivo.

En la Gráfica 4 se observa que la tendencia en el comportamiento con ambos antígenos y ambas dosis es muy similar, es evidente que se producen anticuerpos de la clase IgG pero no IgE y que la subclase IgG<sub>1</sub> es de menor

cuantía que la subclase IgG<sub>2a</sub> a lo largo del experimento, sobre todo a la semana 10 que corresponde a los 30 días post-reto.



**Gráfica 4. Determinación por ELISA de la presencia de inmunoglobulinas específicas contra fGSTTs y GSTrTs de las clases IgG, IgE y de las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub>.**

Cuando los experimentos se llevan hasta la semana 14 (experimento largo) la producción de anticuerpos IgG totales aun es evidente, excepto cuando la dosis fue de 1 μg de fGSTTs, sin embargo la producción de IgG<sub>2a</sub> se ve abatida en ese momento e IgG<sub>1</sub> se mantiene a niveles basales. Estos resultados sugieren que el tipo de respuesta inmune que se presenta es compatible con el tipo TH1 y que el máximo de respuesta de tipo humoral se da a la semana 10.

## VI DISCUSION

En el extracto crudo de cisticerco de *Taenia solium* se encontró actividad de GST al utilizar CDNB como sustrato en presencia de Glutación reducido, tal y como se ha descrito para otros helmintos y para una gran variedad de organismos eucariontes (Vibanco-Pérez y Landa, 1998; Brophy y Pritchard, 1994). Al pasar extracto crudo del cisticerco de *T. solium* por una columna de Sefarosa con GSH acoplado, la actividad de GST utilizando CDNB como segundo sustrato, se concentró aproximadamente 25 veces. Valor que es bajo en relación con lo encontrado en *Heligmosomoides polygyrus* en que dicha actividad se concentró 70 veces (Brophy y cols. 1994) y similar a lo encontrado en *Schistosoma mansoni* y *Echinococcus granulosus*, donde la actividad se logró concentrar 20 veces (O'leary y Tracy, 1988; Fernández y Hormaeche, 1994).

La fracción proteica con actividad de GST de *T. solium* representa el 3% del total de las proteínas del extracto a partir del cual se purificó. Este último valor esta dentro del intervalo reportado para otras especies de parásitos helmintos, tal es el caso de *Schistosoma mansoni*, para el cual se reporta que entre el 2 y el 4% del total de sus proteínas citosólicas pertenece a GSTs (O'leary y Tracy, 1988). También está de acuerdo con lo reportado para las proteínas de hígado de mamíferos, de las cuales el 3% esta constituido por las diferentes GSTs presentes en las células de este órgano (Mannervik y Danielson, 1988) y es mayor a lo reportado para el céstodo *Echinococcus granulosus*, para el cual se reportó que la GST representa el 0.33% en peso de la proteína citosólica total (Fernández y Hormaeche, 1994).

El corrimiento electroforético para determinar el peso molecular del monómero de GST de *T. solium*, dióla impresión de que una sola banda de aproximadamente 26 kDa formaba a la fracción con actividad enzimática. Sin embargo, al realizar electroforesis largas, en las que se dejaba salir todo el colorante del amortiguador de corrimiento, se pudo comprobar que al menos otra banda de aproximadamente 28 kDa estaba presente. Este hallazgo no resultó sorprendente, ya que en la literatura existe un sinnúmero de ejemplos que ilustran

la presencia de diferentes formas de GST en un mismo organismo, tanto para mamíferos como para parásitos. Además, los pesos moleculares de las GSTs de helmintos y sus formas purificadas por afinidad a GSH, reportadas a la fecha, están en el intervalo de 23 a 28.5 kDa por lo que ambas bandas detectadas en la fracción con actividad de GST de *T. solium* se ubican en este grupo. (Brophy, Southan y Barret, 1989; Rojas y cols., 1997; O'leary y Tracy, 1988; O'leary y cols., 1992; Rossjohn y cols., 1997; Vibanco-Perez y Landa 1998).

Los anticuerpos policlonales generados contra esta fracción con actividad de GST (fGSTTs) y los adsorbidos contra la aparente única banda de 26 kDa reconocieron ambas bandas, esto es congruente, pues los conejos fueron inmunizados con la fracción que contenía ambas bandas hasta ahora identificadas. La absorción de los anticuerpos se realizó suponiendo que la banda solo contenía una entidad proteica, ya que cuando se realizó la adsorción, esta se hizo sobre membranas con transferencias de corrimientos electroforéticos cortos, es decir, ambas bandas estaban presentes. Además, es común que se presente reconocimiento inmunológico cruzado entre isoformas de GSTs de la misma especie (O'leary y cols., 1992).

El significado funcional de la expresión de estas dos formas de GSTs en *T. solium* y otros parásitos no está claro, pero presumiblemente está relacionado con el requerimiento de GSTs con diferente especificidad a sustratos (Panaccio y cols., 1992; Liebau, Wilddenburg y cols. 1996)

Por otro lado, estos anticuerpos reconocieron en el extracto crudo, dos bandas ubicadas a la altura de los marcadores de peso correspondientes a 70 y 80 kDa. Cuando el extracto crudo se pasó a través de la columna de afinidad de GSH, las bandas seguían siendo reconocidas por los anticuerpos en la fracción que no se ligaba específicamente a la columna. Por el contrario, en la fracción que se ligaba y que era eluida selectivamente, los anticuerpos no evidenciaron dichas bandas. Estas proteínas no están relacionadas con la actividad de GST, sin embargo, es posible que compartan algunos epítopes con las bandas con actividad de GST que se encontraron en la fracción.

Cuando la fracción con actividad de GST de *T. solium* (fGSTTs) se sometió a cromatografía por filtración, se observó un pico principal que poseía actividad de GST y la mayor proporción de proteína. El peso molecular calculado fue de 47 kDa, el cual es compatible con un dímero que corresponde a los pesos moleculares (26 y 28 kDa) de los monómeros observados en los geles de poliacrilamida corridos en condiciones desnaturalizantes.

Cabe señalar entonces, que cuando se trabajó con esta fracción, al menos dos proteínas estaban presentes, por lo que, las características encontradas corresponde a la suma de características de ambas y no se puede descartar la probable presencia de otras isoformas. Por ejemplo, en *Schistosoma mansoni*, se estableció la presencia de tres isoformas que se unieron a la columna de GSH y otra isoforma más que no lo hizo, al determinar las actividades individuales de cada isoforma se encontró que cada una de ellas tenía un nivel particular de actividad diferente a la fracción que las contenía a todas (O'leary y Tracy, 1988).

Todas las GSTs poseen la habilidad de conjugarse con GSH con compuestos que contienen un centro electrofílico, este grupo es muy amplio, sin embargo, el sustrato más usado para estudiar a GST es el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB), el cual, cuando se conjuga con GSH, produce S-(2,4-dinitrofenil) glutatión, este producto absorbe diferencialmente a 340 nm, haciendo relativamente sencillo la determinación de actividad (Hayes y Pulford, 1995). Por esta razón se le conoce como el sustrato universal para GSTs y su uso está generalizado para determinar características como actividad específica,  $K_m$  y  $V_{max}$ , a pesar de que, desde el punto de vista del papel biológico que la enzima juega en la célula, este sustrato no tiene importancia.

La actividad específica de GST de la fGSTTs sobre el sustrato universal para GSTs (CDNB) fue de  $2.8 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , valor que contrastó con los reportados para otras fracciones obtenidas a partir de extractos citosólicos de otros céstodos parásitos y purificadas por afinidad a GSH, resultando 7 veces mayor que la reportada para *Echinococcus granulosus* ( $0.4 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ), 3 veces menor que la presentada por *Schistocephalus solidus* que fue de  $8.7 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (Morello y cols., 1982; Brophy y cols. 1989) y 2 veces menor que la de

*Moniezia expansa* (Brophy, Southan y Barrett, 1989). La heterogeneidad observada entre céstodos es también marcada en relación con otro grupo de parásitos como los tremátodos, ya que encontramos que se han reportado actividades de  $18.9 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  para el caso de *Fasciola hepatica* (Brophy y cols., 1990b) y 23.5 para *Schistosoma mansoni* (O'leary y Tracy, 1988).

Para nemátodos existen algunos ejemplos en el mismo sentido, entre ellos el de *Dirofilaria immitis* cuya actividad específica de un purificado similar a los anteriores es de  $5.5 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (Jaffe y Lambert, 1986) y el de *Heligmosomoides polygyrus* en que se reporta una actividad específica de  $10.1 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (Brophy y cols., 1994).

La  $K_m$  y  $V_{max}$  de la fracción con actividad de GST de cisticerco de *T. solium* sobre CDNB, fueron 4 mM y  $12.5 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los reportados para fracciones citosólicas purificadas por afinidad a GSH de *Echinococcus granulosus* (1.1 mM y  $45.4 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) y de *Moniezia expansa* (1.4 mM y  $32.3 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) (Morello y cols., 1982; Brophy, Southan y Barrett, 1989). Todas las determinaciones con el sustrato universal CDNB para la fGSTTs y la comparación con los valores obtenidos reportados para otros parásitos ponen de manifiesto que la actividad enzimática purificada puede considerarse, en términos generales, del mismo orden.

De las cuatro clases de GSTs citosólicas de mamíferos ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ) solo las tres primeras son capaces de unirse a matrices con GSH y actuar sobre CDNB (Meyer y cols. 1991), este fue el caso de la fracción purificada, por ello se usaron los sustratos e inhibidores que permitieran clasificar a la fGSTTs dentro de las clases  $\alpha$ ,  $\mu$  o  $\pi$ . Al comparar la capacidad de la fGSTTs de actuar sobre Acido Etacrínico (0.470) con los intervalos de las clases  $\alpha$  y  $\mu$  (0.01-1.2 y 0.08-0.6  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente), podemos apreciar que está relacionada con ambas pero no con la clase  $\pi$  (0.9-4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Si comparamos la actividad de la fGSTTs (0.004  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) sobre Bromosulfaleina observamos que la fGSTTs esta relacionada estrechamente con el intervalo de la clase  $\mu$  (0.002-0.9  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ). Con lo que respecta al sustrato Hidroperóxido de Cumeno se



encontró que la fGSTTs tiene sobre el una actividad de  $0.220 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  que esta dentro del intervalo de actividad atribuido a la clase  $\mu$  ( $0.1\text{-}0.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) y no al de las clases  $\alpha$  ( $3\text{-}12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) o  $\pi$  ( $0.03\text{-}0.14 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) (Mannervik y cols., 1985).

Los ensayos de inhibición muestran que la  $I_{50}$  que presenta el Cloruro de Trifeniltin ( $0.5 \mu\text{M}$ ) sobre la actividad de la fGSTTs usando CDNB como sustrato, se relaciona tanto con la clase  $\alpha$  ( $0.3\text{-}30 \mu\text{M}$ ) como con la clase  $\mu$  ( $0.04\text{-}0.5 \mu\text{M}$ ) y no con la clase  $\pi$  ( $>10$ ). La  $I_{50}$  atribuida a Azul de Cibacrón sobre fGSTTs fue de  $0.45 \mu\text{M}$  mientras que los intervalos para las clases  $\mu \pi \alpha$  son  $0.05\text{-}0.7$ ,  $0.1\text{-}0.5$  y  $0.6\text{-}20 \mu\text{M}$  respectivamente, esto implica que la relación es más cercana con las clase  $\mu$  y  $\pi$  para este inhibidor. Finalmente al usar Bromosulfaleina como inhibidor se ubicó a la fGSTTs como más relacionada a la clase  $\mu$ , pues la  $I_{50}$  fue  $1.41 \mu\text{M}$  y los intervalos para las clases  $\mu \pi \alpha$  son  $0.5\text{-}10 \mu\text{M}$ ,  $20\text{-}100 \mu\text{M}$  y  $2\text{-}200 \mu\text{M}$  respectivamente (Mannervik y cols., 1985)

Todos estos datos bioquímicos señalan una mayor relación de la fGSTTs con la clase  $\mu$  que con las clases  $\alpha$  y  $\pi$  de GSTs citosólicas de mamíferos, sin embargo, también es posible apreciar que con algunos sustratos los intervalos se sobrelapan. Esto es algo que comúnmente se reporta, de tal manera que se requiere otros criterios para ubicar dentro de una clase a la enzima evaluada, la secuencia amino terminal, es una herramienta útil para hacerlo.

Debido a que esta fracción en realidad es una mezcla de al menos dos formas, lo que hicimos fue realizar una secuencia amino terminal de ambas y como se mostró en la Figura 7, tanto la banda de  $26 \text{ kDa}$  como la de  $28 \text{ kDa}$  muestran una homología mayor con la clase  $\mu$  de GSTs de mamíferos. Aunque para este caso correlacionó la caracterización bioquímica con la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal de la proteína, existen ejemplos en la literatura en que no hay concordancia, por ejemplo, en el caso de *Echinococcus multilocularis* la secuencia mostró una clara relación con la clase  $\mu$ , sin embargo bioquímicamente no se encontró relación con ninguna de las clases de GSTs de mamíferos hasta ahora reconocidas (Liebau, Müller y cols., 1996), como este

último ejemplo existen varios no solo para parásitos, sino para otras especies de organismos en las que se describe la GST y trata de clasificarse con la clasificación para GSTs de mamíferos (Snyder y Maddison, 1997), por lo que se ha sugerido la necesidad de una clasificación exclusiva para las GSTs de Helminthos o una nueva clasificación general de GSTs (Brophy y Barret, 1990b; Vibanco-Pérez y Landa, 1998).

Un sustrato que no metabolizó la fGSTTs y que si lo metabolizan las GSTs de mamíferos fue el 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi)propano, lo cual es compatible con lo reportado en el sentido que las GSTs pertenecientes a las clases  $\alpha$ ,  $\mu$  y  $\pi$  no son capaces de metabolizar adecuadamente este compuesto ( Mannervik y Danielson, 1988; Meyer y cols., 1991).

El Hidroperóxido de Cumeno fue uno de los sustratos sobre los que actuó la fGSTTs, lo que permitió establecer su capacidad para actuar como Glutación Peroxidasa independiente de Selenio, pero no como Glutación Peroxidasa dependiente de Selenio, pues no presentó actividad sobre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esto es relevante ya que un número significativo de isoenzimas de GST exhiben actividad de Glutación peroxidasa y catalizan la reducción de hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes, los sustratos que GST reduce incluye ácidos grasos, fosfolípidos e hidroperóxidos de ADN y como estos compuestos son generados por la lipoperoxidación y daño oxidativo del ADN se considera que las GSTs, así como otras enzimas dependientes de GSH ayudan a combatir el estrés oxidativo (Hayes y Pulford, 1995).

Otro grupo importante de compuestos sobre los cuales tuvo actividad la fGSTTs fueron el *trans*-non-2-enal y el Hexa-2-4-dienal (0.085 y 0.134  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente) que son carbonilos citotóxicos producto de la lipoperoxidación, varios helminthos han sido reportados con la capacidad de realizar estas actividades enzimáticas atribuidas a GSTs y se ha sugerido que esta enzima participa en la detoxificación del parásito de estos compuestos producidos por el hospedero a través del estallido respiratorio de células del sistema inmune (Brophy, Papadopoulos y cols., 1989; Brophy y cols, 1990b; Walker y cols., 1993; Vibanco-Pérez y Landa, 1998).

Hasta aquí podríamos recapitular diciendo que la fGSTTs tiene una actividad bioquímica de GST compatible con la clase  $\mu$  de la clasificación de GSTs de mamíferos, que posee actividad de Glutación Peroxidasa independiente de Selenio y que es capaz de metabolizar carbonilos citotóxicos. Además sabemos que está compuesta de al menos dos formas de GST con secuencia amino terminal individual compatible con GSTs de la clase  $\mu$  de mamíferos, una de aproximadamente 26 kDa y la otra de 28 kDa, ambas reconocidas por anticuerpos de conejo generados como respuesta a la inmunización con fGSTTs.

Al realizar una comparación inmunológica de la fracción con actividad de GST de *T. solium* con GSTs de otras especies encontramos que los anticuerpos que reconocen a la fGSTTs reconocen también a GSTs de *Taenia saginata*, *Taenia taeniaeformis* y *Taenia crassiceps*, es decir, parásitos del mismo género, por el contrario, la GST del parásito *Schistosoma mansoni* y a las GSTs de hígado de cerdo, conejo y ratón no fueron reconocidas. Esto es importante, ya que se pone de manifiesto que los hospederos y animales utilizados como modelo experimental poseen GSTs que son lo suficientemente diferentes a la de *T. solium* para que puedan generar una respuesta inmune contra la enzima del parásito. Además, confirma la factibilidad de utilizar modelos animales heterólogos para evaluar la capacidad protectora de la fGSTTs, como es el caso del modelo de cisticercosis *Taenia crassiceps*-ratón. Estas observaciones también se han hecho en otros parásitos, por ejemplo se ha reportado que anticuerpos contra una GST de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* no reaccionan contra isoenzimas de GSTs de rata y de humano, pero si tiene reacción cruzada con otras formas de GST del mismo género de parásitos (Taylor y cols., 1988). También se ha reportado que anticuerpos contra la GST de *Trichinella spiralis* presentan reacción inmune cruzada con GSTs de otras especies del género *Trichinella* y no reaccionan con GST de *Fasciola hepatica*, *Schistosoma bovis*, *Schistosoma mansoni*, *Dirofilaria immitis*, *Toxocara canis* y *Anisakis* sp (Rojas, 1997). Estos datos revisten gran importancia, pues están relacionados con la posibilidad de que un hospedero sea capaz de generar una respuesta inmune contra epítopes de la enzima del parásito y no una respuesta autoinmune contra las enzimas propias. Por otro lado si la

enzima resultase un buen inmunógeno podría ser empleada en la prevención de varias parasitosis causadas por distintas especies del mismo género.

Inmunohistoquímicamente, utilizando anticuerpos anti GSTTs (anticuerpos adsorbidos y eluidos de las bandas de 26 y 28 kDa) la GST de *T. solium* se localizó concentrada principalmente en el tegumento del cisticerco, presente a través del parenquima y en el citoplasma de células de los citones protonefridiales y tegumentarios, la impresión que da esta localización es de formación de un gradiente de adentro hacia fuera del parásito, es decir, de menos a más desde los citones protonefridiales hasta la superficie tegumentaria. En *Echinococcus granulosus* la GST a sido detectada en el parenquima sin ninguna asociación con alguna estructura en particular (Fernández y Hormaeche, 1994). En *S. mansoni* se ha asociado su presencia a tegumento y células protonefridiales y del parénquima subtegumental (Taylor y cols., 1988) y se ha confirmado que la enzima es exportada al exterior del parásito (Liu y cols., 1996), incluso se ha reportado la presencia de GST de *S. japonicum* en suero de individuos infectados (Davern y cols., 1990). Para *Fasciola hepatica* la GST ha sido localizada en el parenquima y en la superficie de la lamela intestinal del adulto y se ha descrito una GST de secreción (Wijffels y cols., 1992; Creany y cols., 1995; Cervi y cols., 1999). De igual forma, en el nemátodo *Onchocerca volvulus*, una forma de GST es excretada del gusano (Liebau y cols., 1994). Con estas evidencias y lo observado en nuestro trabajo, es posible que *Taenia solium* tenga una forma de GST de secreción.

Al parecer, es importante que la enzima se encuentre tanto dentro como fuera del parásito, como se comprobó en este y otros trabajos la enzima detoxifica al parásito de los productos que se forman después de la lipoperoxidación por lo que la necesita en el interior. Por otro lado, la presencia de la enzima en la interfase hospedero-parásito, es relevante, pues como se ha comprobado, metaboliza compuestos tóxicos de origen endógeno y exógeno, como son los productos derivados de la acción de los radicales libres de oxígeno generados por células del sistema inmune del hospedero y algunos medicamentos antiparasitarios

También es importante considerar que si bien es una ventaja para el parásito que la enzima se encuentre en la interfase hospedero-parásito para defenderlo del ataque iniciado por el sistema inmune sobre las membranas del parásito, también puede ser una desventaja, ya que puede eventualmente ser vista de manera más eficiente por el sistema inmune del hospedero y generarse una mejor respuesta contra ella. Esto llevó a la idea de que pueda ser un buen antígeno protector.

Una vez determinada la presencia de la enzima en *T. solium* y conociendo la importancia que para el parásito representa desde el punto de vista de detoxificación, el siguiente paso fue tratar de obtenerla de una manera que no involucrara al parásito directamente. La alternativa obvia fue clonar los genes que codifican para dicha enzima, recordando que por lo menos dos isoformas de la enzima están presentes en este parásito y expresarlas en un sistema bacteriano. Sin embargo, a la fecha solo ha sido posible, con las estrategias usada, clonar, expresar y caracterizar una de ellas.

A partir de conocer la secuencia amino terminal de las proteínas presentes en las bandas de 26 y 28 kDa de la fGSTTs se diseñaron oligonucleótidos específicos de esa región, además, se diseñó otro oligonucleótido considerando la secuencia de una región conservada en muchas GSTs de clase  $\mu$ , con estos uno de los pares de oligonucleótidos (para la proteína de 26 kDa) fue posible obtener un producto de PCR con una secuencia compatible con las de GSTs.

Este sirvió de sonda para tamizar tres bibliotecas de ADNc de *T. solium* construidas en el vector  $\lambda$ gt10 y obtener clonas que contenían insertos que codifican para una proteína completa de 657 pares de bases sin considerar el codón de paro y cuya secuencia es homóloga a GSTs. Esta secuencia se insertó en un vector de expresión y se obtuvo una proteína de 219 aminoácidos con un peso molecular calculado de 25500.Da. Al someterla a electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante, se ubicó a la altura correspondiente a un peso molecular aparente de 26 kDa, similar en tamaño a la banda de la fGSTTs que poseía la secuencia amino terminal a partir de la cual se diseñó el oligonucleótido empleado.

La proteína recombinante (rGSTTs) fue reconocida por los anticuerpos anti fGSTTs y en la columna de filtración presentó actividad de GST en la misma fracción que la fGSTTs, calculándose un peso de 47 kDa para el dímero.

Este producto se caracterizó bioquímicamente, comprobándose primeramente que la proteína recombinante obtenida en el sistema bacteriano es funcional y que es capaz de metabolizar a los mismos sustratos que la fGSTTs en el mismo orden de magnitud, lo que la ubica bioquímicamente dentro de la clase  $\mu$  con la clasificación de GSTs para mamíferos, sin embargo, se encontraron algunas diferencias, por ejemplo su actividad sobre hidropéroxido de cumeno fue 5 veces mayor que la exhibida por la fGSTTs, y su capacidad de metabolizar compuestos tipo carbonilos citotóxicos (productos secundarios de la lipoperoxidación) fue también superior, así como su habilidad para conjugar Acido Etacrínico. Esto puede deberse a que las características metabólicas de la fGSTTs son la suma de las características metabólicas de la mezcla, mientras que la actividad de la GSTTs representa solo a una entidad enzimática, o bien, que esta forma de GST tiene una mayor especificidad para metabolizar estos sustratos, lo cual la hace muy importante para el sistema de detoxificación de *T. solium*.

Respecto a su susceptibilidad a los inhibidores evaluados, se observó que al usar Bromosulfaleina su susceptibilidad fue menor con relación a fGSTTs, lo cual concuerda con su mayor capacidad relativa de usar este compuesto como sustrato (Tablas 5, 6, 7 y 8). Finalmente se pudo observar que su actividad específica sobre el sustrato universal (CDNB) no se elevó y que su Km y Vmax tampoco difirieron de lo encontrado para la fGSTTs.

Estos datos coinciden con algunos reportados en la literatura, por ejemplo la Glutación S-transferasa recombinante de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* expresada tanto en *Escherichia coli* como en *Saccharomyces cerevisiae*, considerado un antígeno protector contra la Esquistosomiasis, presentó prácticamente la misma actividad sobre CDBN que la GST obtenida directamente del parásito (120, 130, 124  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  respectivamente), respecto a Acido Etacrínico las recombinantes tuvieron un 50% más de actividad y con respecto a Hidropéroxido de Cumeno el aumento de actividad presentado por las GSTs

recombinantes fue del 20%, no presentando cambios en la susceptibilidad a los inhibidores que evaluaron. También reportan que la proteína recombinante es reconocida por los anticuerpos con especificidad contra la GST obtenida directamente del parásito (Taylor y cols., 1988).

Para *Fasciola hepatica* encontramos también que los anticuerpos producidos contra la proteína nativa GST reconocen a 4 isoformas recombinantes de la enzima y las actividades sobre los diferentes sustratos se mantienen en el mismo orden de magnitud, existiendo diferencias puntuales entre alguna de las isoformas recombinantes respecto a la nativa y donde se manifestaron cambios más marcados entre dos de las recombinantes y la nativa, fue en su sensibilidad a los inhibidores (Salvatore y cols., 1995).

Al alinear la secuencia completa del marco de lectura abierta clonado en el vector de expresión pTrc99A se pudo observar claramente una homología con GSTs de parásitos helmintos que previamente habían sido considerados de la clase  $\mu$ , con quien más homología presentó (86.7%) fue con la secuencia del también céstodo *Echinococcus multilocularis*, aunque para este parásito se reportó que sus características bioquímicas no permiten clasificarlo en una clase de GST en particular (Liebau, Müller y cols., 1996). No presentó la rGSTTs sitios potenciales de glicosilación, ni posee secuencia de péptido señal en su parte amino terminal, sus características son típicas de una proteína citosólica.

Además, al alinearse con secuencias de aminoácidos de tres GSTs de cerdos reportadas hasta la fecha, se encontró que la rGSTTs presenta una baja homología con ellas, lo cual completa las evidencias de que se aisló una secuencia de GST derivada del metacéstodo de *Taenia solium*.

Por otra parte, todos estos hallazgos confirman que la GST de *T. solium* de peso aproximado a 26 kDa nativa y recombinante representan la misma entidad proteica y que puede ser considerada una GST citosólica de la clase  $\mu$  de acuerdo a la clasificación de GSTs para mamíferos.

Con la idea de establecer el número de genes que codifican para esta enzima, se efectuó un análisis tipo Southern blot, el cual indicó que un solo gen codifica para esta rGSTTs, lo cual es compatible con lo reportado en otros casos,

como por ejemplo para *Onchocerca volvulus*, en que dos isoformas de GST se han producido en un sistema bacteriano como proteínas recombinantes y se demostró que una sola copia del gen respectivo codifica para cada una de ellas (Liebau, Wildenburg y cols., 1996).

Debido a la dificultad para realizar experimentos de protección en el modelo natural de cisticercosis por *T. solium*, es decir, utilizando cerdos y huevos viables del parásito y aprovechando la alta reactividad cruzada entre los antígenos de *T. solium* y *T. crassiceps*, todos los experimentos se realizaron en el modelo *T. crassiceps*-ratón. El primer acercamiento fue definir si la fGSTTs tenía alguna posibilidad de ser un antígeno candidato para proteger contra la cisticercosis, con esta idea se decidió primeramente evaluar un par de dosis de antígeno (1 y 10 µg) y tres adyuvantes (Al(OH)<sub>3</sub>, Adyuvante de Freund y Saponina). Está documentado que el adyuvante es uno de los factores decisivos en el tipo de respuesta inmune que se monta al usar la GST de *Schistosoma mansoni* como antígeno y por lo tanto influye preponderantemente en la efectividad o en la inutilidad de la respuesta (Comoy y cols., 1998).

Los primeros resultados encontrados indican que la fGSTTs es capaz de estimular niveles estadísticamente significativos de protección, considerando la reducción de parásitos intraperitoneales en los ratones inmunizados e infectados con respecto al número de parásitos en los grupos controles que solo fueron inyectados con el adyuvante correspondiente, esto, usando cualquiera de los tres adyuvantes. Cuando se usaron 10 µg de la fGSTTs e Al(OH)<sub>3</sub> como adyuvante por vía subcutánea, se alcanzó un 67.5% de protección, a igual dosis de antígeno pero con Adyuvante completo de Freund se alcanzó el 74% de protección y cuando 1 µg de fGSTTs y Saponina fue empleados, la respuesta protectora alcanzó el 62.5%. Estos niveles de protección han sido alcanzados en el caso de *Schistosoma matthei* donde utilizando una GST recombinante y Adyuvante de Freund por vía intramuscular se alcanzaron el 50 y 89% de protección evaluado como reducción en la carga parasitaria de adultos y de huevos en heces respectivamente (De Bont y cols., 1997). Para *Fasciola hepática* se ha reportado que al utilizar GST nativa con Adyuvante de Freund por vía subcutánea se logra



un 57% de protección (Sexton y cols., 1990). Para el nemátodo *Haemonchus contortus* se ha reportado que la enzima GST utilizada como antígeno no es capaz de conferir protección alguna (Kawalek y cols., 1984). Respecto a céstodos, el primer informe respecto a ensayos de protección utilizando la GST como antígeno es de nuestro grupo (Vibanco -Pérez y cols., 1999).

Todos estos hallazgos en diferentes modelos, apuntan a señalar que la GST de helmintos es un buen candidato para probarse como antígeno en ensayos de protección en diferentes parasitosis, ya que la enzima al parecer juega un papel muy importante en los procesos de detoxificación de los parásitos, lo cual se demostró elegantemente en un experimento en el que usando ratones transgénicos que expresaban GST de 28 kDa de *S. mansoni* encontraron que al ser infectados con la fase infectante del parásito la parasitosis era mayor comparada con ratones no transgénicos, además los ratones transgénicos presentaban niveles nulos de anticuerpos anti GST 28 de *S. mansoni* contrario a lo que pasaba en los no transgénicos, cuyos niveles de anticuerpos eran elevados, el experimento fue repetido con ratones transgénicos y no transgénicos inmunizados previamente con la enzima y los resultados fueron similares en relación a los niveles de protección y a la presencia de anticuerpos (Xu y cols., 1997).

Respecto al tipo de respuesta inmune que observamos al usar estos tres diferentes adyuvantes y fGSTTs como antígeno, encontramos que se detectó presencia de IgGs totales contra la proteína, no se encontró IgE y los niveles encontrados de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub> apuntaban a una mezcla en la respuesta inmune cooperadora, es decir, no había una clara tendencia hacia TH1 o hacia TH2. Los resultados no pueden ser muy comparables con los de la literatura, pues en algunos casos la vía de inmunización o el adyuvante empleado no es el mismo utilizado en nuestros experimentos, por ejemplo una respuesta tipo TH1 fue observada al realizar inmunización intradérmica de un plásmido con DNA que codifica por la GST de 28 kDa de *S. mansoni* (Dupre y cols., 1997), o una tipo TH2 cuando el mismo antígeno pero asociado a liposomas es usado para inmunizar ratones a través de mucosas (Ivanoff y cols., 1996).

Pensando en que eventualmente la GST de *Taenia solium* podía ser usada como antígeno en el modelo natural en cerdo, descartamos el uso de Adyuvante completo de Freund por no ser utilizable debido a las lesiones que llega a producir en los animales inyectados. La decisión de usar Saponina exclusivamente en todos los siguientes experimentos se basó en el hecho de que es una sustancia cuyo uso esta permitido en protocolos de inmunización a animales ya que no deja lesiones y por otro lado, los niveles de protección que se alcanzaron con ella parecían podían mejorarse al usar otras dosis de antígeno. Por otro lado, a pesar de que  $Al(OH)_3$  esta permitido para su uso como adyuvante en humanos y que los niveles de protección en nuestros ensayos fueron del mismo nivel que saponina, se descartó su uso ya que está reportando que dirige la respuesta inmune, de manera preferente , hacia un tipo TH2 (Smith, 1992) y como se verá más adelante era preferible que la respuesta inmune no fuera de este tipo.

En base a los resultados obtenidos, la dosis de fGSTTs de elección final usando Saponina como adyuvante fue de 5  $\mu$ g, esta misma dosis se usó cuando se ensayaron las proteínas aisladas de 26 y 28 kDa y la rGSTTs. Los niveles de protección logrados con esta dosis de fGSTTs y usando 10  $\mu$ g de Saponina por ratón como adyuvante, fueron del 90% en los experimentos cortos y del 85% en los experimentos largos. Estos valores son de los más altos logrados al utilizar GST como antígeno pues ya se señaló que el 89% es el dato más alto reportado en la literatura y se refiere a la disminución de huevos en heces de *S. mattei* usando como antígeno GST recombinar ante de *S. bovis* (De Bont y cols., 1997).

Respecto a la respuesta inmune encontrada en estos ensayos, se puede decir que la tendencia de los perfiles de inmunoglobulinas que se observan es hacia una respuesta inmune cooperadora compatible con el tipo TH1. Esto coincide plenamente con los hallazgos en que postulan que en el modelo *T. crassiceps*- ratón la presencia de alto número de parásitos coincide con una respuesta de tipo TH2, mientras que aquellos momentos de la infección en que la carga parasitaria es menor la respuesta inmune manifiesta es de tipo TH1 (Villa y Kuhn, 1996; Terrazas y cols., 1998; Terrazas y cols., 1999) pero contrasta con los resultados de otro grupo que postula que durante la infección experimental de

ratones con *T. crassiceps* la respuesta inmune sistémica es una mezcla de TH1/TH2 (Toenjes y cols., 1999).

Sorpresivamente las proteínas de 26 y 28 kDa por separadas bajaron su efectividad para proteger a los ratones de la infección. De 90% que se logra con la fGSTTs que contiene a ambas, la de 26 baja a 46%, mientras que la de 28 kDa baja a 74% en el experimento que se evaluó 30 días después del reto (corto). En el experimento que se evaluó 60 días después del reto (largo) los niveles bajan hasta 28 y 44% de protección respectivamente, comparado con el 85% exhibido por la fGSTTs. Esto lleva a pensar que es necesario la mezcla de ambas para alcanzar mejores niveles de protección. Esto ha sido considerado de igual manera por Brophy y Pritchard, quienes postulan que hay que considerar la posibilidad que en una eventual vacuna se incluyan todas las isoformas de GSTs. Ya que si no se monta una respuesta inmune contra todas, se corre el riesgo de no atacar a las más relevantes para el parásito, limitando así la protección (Brophy y Pritchard, 1992).

Pareciera que la GST de 28 kDa de *T. solium* pudiera ser la más importante desde el punto de vista de despertar una respuesta inmune protectora, ya que también la GST recombinante falló para proteger a los ratones de la infección y es la homóloga a la banda de 26 kDa purificada de la fGSTTs, es decir, la GST nativa y recombinante de 26 kDa de *T. solium* son equivalentes bioquímica y estructuralmente y son incapaces de inducir una respuesta inmune protectora al ser usadas como antígenos en el modelo *T. crassiceps*-ratón. Ejemplos de este tipo han sido reportados en la literatura y existe la hipótesis de que ciertas isoformas asumen el papel de neutralizar los anticuerpos para que estos no logren inactivar las isoformas importantes del metabolismo del parásito (Wright y cols., 1991). De ser real este sería un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, sin embargo, con los datos a la mano no podemos decir que esto suceda en nuestro modelo. El hecho de que la fGSTTs logre los niveles de protección presentados aquí, podemos postularla como un antígeno candidato a ser probado en ensayos de protección de cerdos contra la cisticercosis causada por *T. solium* a nivel de campo.

## VII CONCLUSIONES

- El extracto crudo de metacéstodo de *Taenia solium* presenta actividad de GST.
- La fracción purificada por afinidad a GSH a partir de extracto crudo de metacéstodo de *Taenia solium* presenta dos formas de GST, de 26 y 28 kDa aproximadamente.
- Se produjo la forma activa de GST recombinante de 26 kDa.
- La forma activa de las GSTs en *T. solium* es un dímero de aproximadamente 47 kDa.
- La mezcla de GSTs purificadas del extracto crudo de metacéstodo de *Taenia solium* y la GST recombinante presentan actividad de Glutación Peroxidasa independiente de Selenio y son capaces de metabolizar carbonilos citotóxicos.
- Las características bioquímicas y sus secuencias amino terminal de las formas GSTs de *Taenia* las ubican dentro de la clase  $\mu$  en la clasificación de GSTs de mamíferos.
- La GST está presente desde los canales protonefridiales hasta el tegumento del metacéstodo de *Taenia solium*, formando un gradiente hacia el exterior.
- Las GSTs de *Taenia solium* están relacionadas inmunológicamente con GSTs de especies del género *Taenia*, no así con la GST del parásito *Schistosoma mansoni*, ni con GSTs de mamíferos.
- Las GSTs de la fracción purificada por afinidad a GSH a partir de extracto crudo de metacéstodo de *Taenia solium* protege contra la cisticercosis experimental por *Taenia crassiceps* en un 90% y la respuesta inmune humoral generada es compatible con el tipo TH1.
- Las GSTs de 26 y 28 kDa de *Taenia solium*, separadas protegen 50 y 74% respectivamente.
- La GST recombinante de 26 kDa de *Taenia solium* confiere el 25% de protección contra la cisticercosis murina en el modelo empleado.
- La GST de *Taenia solium* es un antígeno candidato para ensayarse como antígeno protector la cisticercosis en cerdos.

## VIII PERSPECTIVAS

- El hallazgo de al menos dos formas de GST en *Taenia solium* sugiere la necesidad de buscar otras formas o isoformas en el parásito.
- Clonar y expresar todas las formas e isoformas de GST que existen en el parásito, lo que permitiría evaluar su capacidad individual o en mezclas para conferir protección.
- Evaluar el uso de la GST, mezclándola con otras enzimas del sistema de detoxificación de *Taenia solium* y con otros adyuvantes, con la idea de establecer las condiciones que permitan desarrollar una vacuna.
- Ensayar otros métodos de administración como por ejemplo, vacuna de ADN, la proteína completa o péptidos en vectores bacterianos o en liposomas, entre otras opciones.
- De manera inmediata evaluar su eficiencia en ensayos de campo.

## IX REFERENCIAS

- Acevedo-Hernandez A. 1982. Economic impact of porcine cysticercosis. In: Cysticercosis: Present state of Knowledge perspectives. A. Flisser, K. Willms., J.P. Laclette., C. Larraide., C. Ridaura., F. Beltrán. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 63-68.
- Aluja A. 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Cysticercosis: Present state of Knowledge perspectives. A. Flisser, K. Willms., J.P. Laclette., C. Larraide., C. Ridaura., F. Beltrán. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 53-62.
- Bojalil R., Terrazas I., Govezensky T., Sciutto E., Larraide C. 1993. Thymus related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 79:384-389
- Booth J. Boyland E. Sims P. 1961. An enzyme from rat liver catalyzing conjugation with glutathione. *Biochemical Journal*. 79: 516-524.
- 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. 66p.
- Brophy P M., Barrett J. 1990a. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 42:205-212.
- Brophy P M., Barrett J. 1990b. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology*. 100:345-349.
- Brophy P. M., Crowley P., Barrett J. 1990a. Relative distribution of glutathione transferase glyoxalase I and glyoxalase II in helminths. *International Journal for Parasitology*. 20:259-261.
- Brophy P. M., Crowley P., Barrett J. 1990b. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 39:155-162.
- Brophy P. M., Pritchard D.I. 1992. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance? *Parasitology Today* 8: 419-422

- Brophy P. M., Pritchard D.I. 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferase: An update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. *Experimental Parasitology*. 79: 89-96.
- Brophy P.M., Ben-Smith A., 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 hosts. *International Journal for Parasitology*. 25:641-645.
- Brophy P.M., Ben-Smith A., Brown A., Behnke J.M., Pritchard D.I. 1994. Glutathione S-transferases from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. *Compendium Biochemical Physiology*. 109B: 585-592.
- Brophy P.M., Papadopoulos A., Touraki M., Coles B., Körting W., Barrett J. 1989. Purification of cytosolic glutathione transferase from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): interaction with antihelminthics and products of lipid peroxidation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36:187-196.
- Brophy P.M., Southan C, Barrett J. 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expanza*. *Biochemical Journal* 262: 939-946.
- Cervi L., Rossi G., Masih D.T. 1999. Potential role for excretory-secretory forms of glutathione S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 119:627-633.
- Combes B., Stakelum G.S. 1961. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *Journal of Clinical Investigation*. 40: 981-988.
- Comoy E.E., Capron A., Thyphronitis G. 1998. Adjuvant is the major parameter influencing the isotype profiles generated during immunization with a protein antigen, the *Schistosoma mansoni* Sm28-GST. *Scandinavian Journal of Immunology*. 47: 444-452
- Cox F.E.G. 1982. *Modern Parasitology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 159p.
- 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. *Experimental Parasitology*. 81: 106-116.

- Davern K.M., Tiu W.H., Samaras N., Gearging D.P., Hall B.E., Garcia E.G., Mitchell G.H. 1990. *Schistosoma japonicum*: Monoclonal antibodies to the Mr26,000 schistosome glutathione S-transferase (Sj26) in an assay for the circulation antigen in infected individuals. *Experimental Parasitology*. 70:293-304.
- De Bont J., Vercruyse j., Grzych J.M., Meeus P.F.M., Capron A. 1997. Potential of recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental and natural *S. mattheei* infection. *Parasitology*. 115: 249-255.
- Del Brutto O.H., Sotelo, J. 1988. Neurocysticercosis: an update. In *Reviews of Infections Disease*. 6: 1075-1087.
- Dempster R. P., Robinson C. M., Harrison G.B.L. 1996. Parasite vaccine development: large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45W (B/X) from *Escherichia coli*. *Parasitology Research*. 82:291-296
- Diaz S., Candil A., Suate P., Zazueta R., Feliz M., Lozano R., Willms K. 1991. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45:522-531.
- Dirr H., Reinemer P., Huber R. 1994. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *European Journal of Biochemistry*. 220: 645-661
- Dupre L., Poulain-Godefroy O., Ban E. Ivanoff N., Mekranfar M., Schacht A.M., Capron A., Riveau G. 1997. Intradermal Immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immunology*. 19: 505-513
- Fernandez C., Hormaeche C.E. 1994. Isolation and biochemical characterisation of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *International Journal for Parasitology*. 24: 1063-1066.
- Flisser A., Gonzalez D., Shkurovich S., Madrazo I., Correa D., Rodriguez -Carvajal J., Cohen S., Rodriguez-del-Rosal E., Collado M., Fernandez B., Fernandez F., Aluja A.S. 1990. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia*



- solium* cysticercosis. 1. Radiological, Physiological and histopathological studies. Parasitology Research 76:263-269
- Flisser A., Madrazo I., Delgado H. 1997. Cisticercosis humana. Edit. Manual Moderno. México D.F. 1-176
- Freeman R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (Rudolphi 1810). Canadian Journal of Zoology. 40:969-990.
- Gallie G.J., and Sewell M.M.H. 1972. The survival of *C. bovis* in resistant calves. Veterinary Record. 91:481.
- Grzanna R. 1982. Light microscopic immunocytochemistry with fixed, unembedded tissues. In Techniques in immunocytochemistry, G.R. Bullock and P. Petrusz (Eds). Academic Press, London, U.K. 183'200
- Grzych J.M., De Bont J., Liu J., Neyrinck J.L., Fontaine J., Vercruyssen J., Capron. 1998. Relationship of impairment of Schistosoma 28-kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma bovis* 28-kilodalton GST. Infection and Immunity. 66: 1142-1148.
- Habig W.H., Jakoby W. B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. Methods in Enzymology. 77:398-405
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W. B.. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry. 22: 7130-7139.
- Hayes J.D., Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology. 30:445-600.
- Hewick R.M., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Dreyer W.J. 1981. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. Journal of Biological Chemistry. 256:7990-7997.
- Ishikawa T. 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends in Biochemical Sciences. 17: 463-468
- Ito A., Bogh H.O., Lightowers M.W., Mitchell G.F., Takami T., Kamiya M., Onitake K., Rickard. 1991. Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a

- recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44:43-52.
- Ivanoff N., Phillips N., Schacht A.M., Heydari C., Capron A., Riveau G. 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm 28 kDa glutathione S-transferase. *Vaccine*. 14:1123-1131
- Jaffe J.J., Lambert R.A. 1986. Glutathione S-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 20:199-206.
- Johnson K.S., Harrison G.B.L., Lightowers M.W., O'Hoy K.L., Cogle W.G., Dempster R.P., Lawrence S.B., Vinton J.G., Heath D.D., and Rickard M.D. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 338:585
- Johnston R.B. Jr., Kitagawa S. 1985. Molecular basis for the enhanced respiratory burst of activated macrophages. *Federation Proceedings* 44(14): 2927-2932.
- Kats N., Rocha R.S., DeSouza C.P., Pilho P.C., Bruce J.I., Coles G.C., Kinoti G.K. 1994. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 44:509-512.
- 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-resistant and susceptible strain. *International Journal for Parasitology*. 14: 173-175.
- Keilbach N., Aluja A., Sarti E. 1989. A programme to control teniosis and cysticercosis (*Taenia solium*) experiences in a Mexican village. *Acta Leidensia* 57:181-189.
- Ketterer B., Meyer D.J., Clark A.G. 1988. Soluble glutathione transferase isozymes. In: Sies H., Ketterer B. (Eds.). *Glutathione Conjugation: Its mechanism and biological significance*. Academic Press, London, U.K. 73-135
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
- Larraalde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez C., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepulveda J. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Revista Salud Pública de México*. 34: 197-210.

- Larralde C., Sciutto E., Huerta L., Terrazas I., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Lomelí C., Tapia G., Montoya R.M., Diaz M.L., Govezensky T. 1989. Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 57: 131-134.
- Liebau E., Eckelt V.H.O., Wildenburg G., Teesdale-Spittle P., Brophy P.M., Walter R.D., Henkle-Duhrsen. 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochemical Journal*. 324:659-666.
- Liebau E., Müller V., Lucius R., Walter R. D., Henkle-Dührse K. 1996. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular Biochemical Parasitology*. 77: 49-56.
- Liebau E., Wildenburg G., Brophy P.M., Walter R.D., Henkle-Duhrsen K. 1996. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 80:27-39.
- Lightowers M.W., Rolfe R., Gauci C. 1996. *Taenia saginata*: Vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Experimental Parasitology* 84: 330-338.
- Lightowers M.W. 1999. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal for Parasitology*. 29:811-817.
- Lightowers M.W., Flisser A., Gauci C.G., Heath D.D., Jensen O., Rolfe R. 2000. Vaccination against cysticercosis and Hydatid Disease (Review). *Parasitology Today*. 16 (5): 191-196.
- Liu J.L., Fontaine J., Capron A., Grzych J.M. 1996. Ultrastructural localization of Sm28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology*. 113: 377-391.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:355.

- Malagón F., 1989. Elementos del binomio taeniasis/cisticercosis. Una síntesis. En Flisser A., Malagón F. (Eds). Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. México D.F. Editorial Limusa Noriega. 3-7
- Mannervik B. 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 57:357-417.
- Mannervik B., Alin P., Guthenberg C., Jennson H., Kalim T.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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 7202-7206
- Mannervik B., Danielson V.H. 1988. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. 23(3): 283-328.
- Manoharan T.H., Gulick A.E., Puchalski R.B., Servias A.L., Fahl W.E. 1992. Structural studies on human glutathione S-transferase  $\pi$ . Substitution mutations to determine amino acids necessary for binding glutathione. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 18940-18945.
- Manoutcharian K., Rosas G., Hernandez M., Fragoso G., Aluja A., Villalobos N., Rodarte L.F., Sciutto E. 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology*. 82(2): 250-254.
- McTigue M.A., Williams D.R., Tainer J. A. 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Scistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *Journal of Molecular Biology*. 246: 21-27.
- Medina M.T., Rosas E., Rubio-Donnadieu F., Sotelo J. 1990. Neurocysticercosis as the main cause of late onset epilepsy in México. *Archives of Internal Medicine* 150:325-327.
- Meyer D.J., Coles B. Pemble S.E., Gilmore K.S., Fraser G.M., Ketterer B. 1991. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochemical Journal*. 274: 409-414.

- Miller C.M.D., Howell M.J., Boray J.C. 1994. Glutathione S-transferases as markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*. 24: 533-542.
- Molinari J.L., Meza R., Suárez B., Palacios S., Tato P. 1983. *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercosis. *Experimental Parasitology* 55:340-357.
- Molinari J.L., Rodríguez D., Tato P., Soto R., Arechavaleta F., Solano S. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Veterinary Parasitology*. 69:55-63.
- Molinari J.L., Soto R., Tato P., Rodríguez D., Retana a., Sepulveda J., Palet A. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49(4): 502-512.
- Molinari J.L., Tato P., Aguilar ., Palet A. 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 30:325-333.
- Morello A., Repetto Y., Atias A. 1980. Characterization of Glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Compendium Biochemical Physiology*. 72B:449-452.
- Nascimento E., Pereira-Tavares C. A., Pezzi-Guimaraes M., Costa J.O. 1987. Vacinacao de suinos contra cisticercose. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*. 39: 135-150
- O'leary K. A., Tracy J. W. 1988. Purification of three cytosolic Glutathione S-transferases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 262:1-12
- O'leary K. A., Tracy J. W. 1991. *Schistosoma mansoni*: Glutathione S-transferase catalyzed detoxication of dichlorvos. *Experimental Parasitology*. 72: 355-361.
- O'leary K.A., Hathaway K.M., Tracy J.W 1992. *Schistosoma mansoni*: Single-step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4. *Experimental Parasitology* 75: 47-55.

- Organización Panamericana de la Salud. 1997. Informe de una reunión de consulta de la OPS/OMS sobre el Complejo Teniasis/Cisticercosis. Washington, D.C. OPS Serie HCT/AIEPI-5E 24p.
- Paglia D.E., Valentine W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 70:158-169.
- Panaccio M., Wilson L.R., Crameri S.L., Wijffels G.L., Spithill T.W. 1992. Molecular Characterization of cDNA Sequences Encoding Glutathione S-Transferases of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*. 74:232-237.
- Pawlowski Z. 1991 Efficacy of low doses of praziquantel in teniosis. *Acta Tropica*. 48:83-88
- Pemberton K.D., Barret J. 1989. The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *International Journal for Parasitology*. 19: 875-878.
- Pemberton K.D., Barret J. 1989. The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *International Journal for Parasitology*. 19:875-878.
- Pickett C.B. 1989. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annual Review of Biochemistry*. 58: 743-764.
- Plancarte A., Flisser A., Gauci C., Lightowlers M.W. 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International Journal for Parasitology*. 29:643-647
- Porchet E., McNair A., Caron A. Kusnierz J.P., Zemzoumi K., Capron A. 1994. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase. *Parasitology*. 109: 565-572.
- Precious, W.Y., Barret J. 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today*. 5(5): 156-160
- Rickard M.D., Brumley 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. *Research Veterinary Science* 30:99

- Rickard M.D., Harrison G.B.L., Heath D.D., Lightowers M.W. 1995. *Taenia ovis* recombinant vaccine - 'quo vadit'. *Parasitology*. 110:S5-S9.
- Rojas J., Rodriguez-Osorio M., Gomez-Garcia V. 1997. Immunological characteristics and localization of the *Trichinella spiralis* glutathione S-transferase. *Journal of Parasitology*. 83:630-635.
- Rosas G., Cruz-Revilla C., Fragoso G., López-Casillas F., Pérez A., Bonilla M.C., Rosales R., Sciutto E. 1999. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology*. 84(3): 516-523.
- Rossjohn J., Feil S.C. Wilce M.C.J., Sexton J.L Spithill T.W., Parker M.W. 1997. Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase. *Journal of Molecular Biology*. 273: 857-872.
- Salinas G., Braun G., Taylor D.W. 1994. Molecular characterisation of an *Onchocerca volvulus*  $\pi$  class glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 66:1-9.
- Salvatore L., Wijffels G., Sexton J.L., Panaccio M., Mailer S., McCauley I., Spithill T. 1995. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 69:281-288.
- Sarti E. 1989. Epidemiología de la teniasis y cisticercosis. En Flisser a., Malagón F. (Eds). *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México*. Edit. Limusa Noriega. Mex. 233-242.
- Sarti E. 1997. La teniasis y cisticercosis en México. *Revista Salud Pública de México* 39: 225-231.
- Sarti E. 1998. Estrategias de Intervención para la prevención y control de la teniasis y cisticercosis en áreas rurales de México. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba. L. Lemus D., Montoya R.M., Diaz M.L., Govezensky T., Lomeli C., Tapia G., Larralde C. 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigen against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology*. 12:687-696

- Schantz P., Cruz., Sarti M., Pawlowski Z. 1993. Potential erradicability of teniosis and cysticercosis. Bulletin Panamerican Health Organization. 27:397-403
- Secretaria de Salud.1996. Boletín semanal de epidemiología 1994-1996. Dirección General de Epidemiología. México D.F.
- Sexton J.L., Milner A.R., Panaccio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thompson C., Wilson L., Spithill T.W., Mitchel G.F., Campbell N.J. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. Journal of Immunology. 145: 3905-3910.
- Smith E.M., Esch G.W., Kuhn R.E. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestode) I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. International Journal for Parasitology. 2:261
- Smith N.C. 1992. Concepts and strategies for anti-parasites immunoprophylaxis and therapy. International Journal for Parasitology 22(8): 1047-1082.
- Snyder M.J., Maddison D.R. 1997. Molecular phylogeny of Glutathione S-transferases. DNA and Cell Biology. 16(11): 1373-1384.
- Soulsby E.J.L., Lloyd S. 1982. Passive immunization in cysticercosis: characterization of the antibodies concerned. Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser A., et al. (Eds.). New York: Academic Press. 539.
- Tahir M.K., Mannervik B. 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase. Journal of Biological Chemistry. 261(3): 1048-1051.
- Taylor J.B., Vidal A., Torpier G., Meyer D.J., Roitsch C., Balloul c., Southan C., Sondermeyer P., Pemple S., Lecorq J.P.,Capron a., Ketterer B. 1988. The glutathione S-transferase activity and tissue distribution of cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. European Molecular Biology Organization Journal. 7:465-472.
- Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. 1998. Shift from an early restrictive Th1-type immune response to a late permissive Th2 response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). Journal of Parasitology. 84: 74-81.



- Terrazas L.I., Cruz M., Rodriguez- Sosa M., Bojalil R., Garcia-Tamayo F., Larralde C. 1999. Th1 cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*. 85: 135-141.
- Toenjes S.A., Spolski R.J., Mooney K.A., Kuhn R.E. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2 -type response. *Parasitology*. 118: 623-633.
- Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernandez M., Acero G., Rosas G., López-Casillas F., Garfias C.K., Vazquez R., Terrazas I., Sciutto E. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity*. 67(5): 2522-2530
- Trottein F., Godin C., Pierce R.J., Sellin B., Taylor M.G., Gorillot I., Silva M.S., Lecocq J.P., Capron A. 1992. Inter-species variation of schistosome 28kDa glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54: 63-72.
- Tsang W., Wilson M. 1995. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitology today*. 11:124-126.
- Valdez F., Hernandez M., Govezensky T., Fragoso G., Sciutto E. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of Parasitology*. 80:931-936.
- Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Merchant M.T., Landa-Piedra A. 1999. Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology*. 83(3): 448-453.
- Vibanco-Perez N., Landa-Piedra A. 1998. Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 40 (3 y 4): 73-85.
- Villa O.F., Kuhn R.E. 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2 -like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1 -associated phenomena. *Parasitology*. 11: 561-570.
- Vogelstein B., Gillespie D. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:615

- Walker J., Crowley P., Moreman A.D., Barret J. 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 61: 255-264.
- Wijffels G.L., Sexton J.L., Salvatore L., Pettitt J.M., Humphris C., Panaccio M., Spithill T.W. 1992. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*. 74:87-99.
- Wilce M.C.J., Parker M.W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1205: 1-18.
- 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*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 49: 177-180.
- Xu X., Lemaire C., Grzych J.M., Pierce R.J., Raccurt M., Mullier F., Zerimech F., Decavel J.P., Peyrol S., Liu J., Fontaine J., Lafitte S., Capron A., Cesbron J.Y. 1997. Expression of a *Schistosoma mansoni* 28-kilodalton glutathione S-transferase in the livers of transgenic mice and its effect on parasite infection. *Infection and Immunity*. 65: 3867-3874.
- Yang W., Gobert G.N., Mc. Manus D.P. 1997. Oral vaccination of mice with recombinant *Schistosoma japonicum* proteins induces specific anti parasite antibodies and damage to adult worms after a challenge infection. *International Journal for Parasitology*. 27: 843-853.
- Zenteno-Alanis G. 1982. A classification of human cysticercosis. In *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura y F. Beltrán (Eds.), Academic Press, New York. pp. 107-126.

## X ANEXOS

Durante el transcurso del trabajo se generaron las siguientes publicaciones y dos manuscritos más están siendo elaborados:

Vibanco-Perez N., Landa-Piedra A. 1998. Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 40 (3 y 4): 73-85.

Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Merchant M.T., Landa-Piedra A. 1999. Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology*. 83(3): 448-453.

# GLUTATHIONE S-TRANSFERASE IN HELMINTH PARASITES

NORBERTO VIBANCO-PÉREZ<sup>1,2</sup> & ABRAHAM LANDA-PIEDRA.<sup>1</sup>

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.<sup>1</sup> Ciudad Universitaria. México, D.F. 04510. Coordinación de Investigación Científica. Universidad Autónoma de Nayarit. Cd. de la Cultura "Amado Nervo" Tepic, Nayarit. 63190.<sup>2</sup>

NORBERTO VIBANCO-PÉREZ<sup>1,2</sup> & ABRAHAM LANDA-PIEDRA.<sup>1</sup> *Glutathione s-transferase in helminth parasites. Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 40: 73-85, 1998.

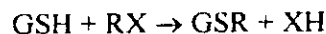
**ABSTRACT:** Glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) are a large family of multifunctional dimeric enzymes that conjugate reduced glutathione to electrophilic centers in hydrophobic organic compounds. The GST enzymatic activity has been described in the adult and larval stages of helminths. Several forms and isoforms of the enzyme have been purified and GST genes have also been isolated and expressed as recombinant proteins. The helminth GSTs participate in detoxification of lipid hydroperoxides and carbonyl cytotoxics produced by oxygen-reactive intermediates (ORI). The ORIs can come from the endogenous parasite metabolism or from the host immune system. The helminth GSTs are able to conjugate glutathione to xenobiotic compounds or to bind to anthelmintic drugs. GST is usually localized near to host-parasite interface. This enzyme has been identified as a potentially vulnerable target in immunotherapy and chemotherapy. The present review compiles current knowledge about the biochemical characteristics of the enzyme, its presence, localization, induction, structural heterogeneity, relationship with mammalian GSTs, detoxification capacity and ability to induce protection in several animal models.

NORBERTO VIBANCO-PÉREZ<sup>1,2</sup> & ABRAHAM LANDA-PIEDRA.<sup>1</sup> *Glutathione s-transferase in helminth parasites. Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 40: 73-85, 1998

**RESUMEN:** Las glutatión S-transferasas (GSTs; EC 2.5.1.18) son una superfamilia de enzimas multifuncionales díméricas que conjugan glutatión reducido a centros hidrofílicos de compuestos orgánicos hidrofóbicos. La actividad enzimática de GST ha sido descrita en adultos y larvas de helmintos. Varias formas e isoformas de la enzima han sido purificadas, se han aislado genes de GST y expresados como proteínas recombinantes. Las GSTs de helmintos participan en detoxificación de hidroperóxidos lipídicos y carbonilos citotóxicos producidos por intermediarios reactivos de oxígeno (IRO). Estos IRO pueden provenir del metabolismo endógeno del parásito o del sistema inmune del hospedero. Las GSTs de helmintos pueden conjugar glutatión a compuestos xenobióticos o unirse a drogas anti-helmínticas y son localizadas cerca de la interfase hospedero-parásito. Esta enzima ha sido identificada como un blanco potencialmente vulnerable en inmunoterapia y quimioterapia. La presente revisión compila los conocimientos actuales acerca de las características bioquímicas de la enzima, su presencia, localización, inducción, heterogeneidad estructural, parentesco con GSTs de mamíferos, capacidades de detoxificación y habilidad para conferir protección en

## I. A QUICK GLANCE AT THE ENZYME

Glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) are a large family of multifunctional enzymes that conjugate the cysteine sulfur of reduced glutathione (GSH;  $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) to electrophilic centers in hydrophobic organic compounds which can be provided by a carbon, nitrogen or sulphur atom. These conjugates become water soluble, thus facilitating their elimination from the cells.<sup>71, 21</sup> The generic reaction is shown below



This reaction is one of the early steps along the mercapturic acid pathway, in which hydrophobic xenobiotics (chemical substances that have no physiological value and may even be toxic<sup>52</sup>) are inactivated and eliminated from the organism.<sup>20</sup>

GST enzymatic activity described in 1961 by two independent groups<sup>2, 12</sup> has been intensively studied. So far, the GSTs are considered vital to the effective metabolism and detoxification of electrophilic xenobiotics in a great variety of organisms.<sup>21</sup> Moreover, these enzymes can detoxify endogenously derived toxic compounds, including the secondary products of lipid peroxidation.<sup>29</sup>

The substrates undergo three different types of reaction with GSH, namely GSH conjugation, hydroperoxide conjugation and double bond isomerism. Examples of the first type of substrate are: 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CNDB) considered the universal substrate of the GSTs, 1,2-dichloro-4-dinitrobenzene (DCNB), trans-4-phenyl-3-buten-2-one (tPBO), 4-hidroxy non-2-enal (HNE) and 1,2-epoxy-3 (p-nitrophenoxy) propane (PNP). Cumene hydroperoxide (CuOOH) and t-butyl hydroperoxide (tBuOOH) are examples of the second type, this enzymatic activity is called Se-independent GSH peroxidase. Finally,  $\Delta^5$ -androstene-3,17-dione (ADO) represents double-bond type isomerism.<sup>29</sup>

The enzyme binds with high affinity to steroids, bilirubin, heme, carcinogens, polycyclic aromatic hydrocarbons, dexamethasone and numerous organic anions.<sup>39</sup> Glutathione S-conjugates, generated from the conjugation reaction, are actively exported out from animal cells by an ATP-dependent efflux pump. This process is a critical step, not only in the elimination of xenobiotics, but also in the regulation of the function of naturally occurring, biologically active glutathione S-conjugates, such as leukotriene C<sub>4</sub>.<sup>24</sup>

An important feature of the GSTs superfamily is the existence of multiple isoenzymes. Mammalian GSTs have been catalogued under five independent classes, five classes of cytosolic enzymes denominated as  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$  and  $\theta$ , whereas the membrane-bound enzymes, microsomal GST and leukotriene C<sub>4</sub> synthetase, have arisen separately from the soluble GST.<sup>38, 43, 15, 21</sup>

Classification has also been based on substrate and inhibitor specificities, immunological criteria, amino acid sequences and chromosomal localization, although these classifications appear to suffice for mammalian enzymes, other GSTs and GST-like enzymes that have been characterized and sequenced from several non-mammalian organisms do not easily fall into the mam-

malian classes.<sup>63</sup> Evolutionary relationships of the cytosolic GST genes suggest that  $\alpha$ ,  $\mu$  and  $\pi$  class enzymes were originated from a  $\theta$  gene duplication, and the  $\mu$  class diverged from the common  $\alpha/\mu/\pi$  predecessor before an  $\alpha/\pi$  divergence,<sup>49</sup> nevertheless, parsimony and distance phylogenetic methods of amino acid sequences suggest a more complex story.<sup>63</sup>

The cytosolic GSTs are composed of two subunits, of about 23-28.5 kDa each, nevertheless, a soluble 13 kDa GST form has been described.<sup>1</sup> These subunits are dimerized by noncovalent interactions and with two active sites per dimer, which behave independently of one another. These enzymes exist as either homo and heterodimeric forms due to multiple genes and monomer hybridization. Heterodimer forms between molecules of different classes have not been identified.<sup>37, 40, 64, 71</sup>

## II. PRESENCE OF THE ENZYME IN HELMINTHS

The GST enzymatic activity has been described in adult and larval crude extracts from several helminths such as cestodes (*Dipylidium caninum*,<sup>9</sup> *Ligula intestinalis*<sup>9</sup>); trematodes (*Schistosoma intercalatum*,<sup>9</sup> *Schistosoma margrebowiei*,<sup>9</sup>) and nematodes (*Ascaris lumbricoides*,<sup>9</sup> *Toxocara canis*,<sup>9</sup> *Trichostrongylus colubriformis*,<sup>9</sup> *Nippostrongylus brasiliensis*,<sup>9</sup> *Cooperia onchopora*,<sup>9</sup> *Brugia pahangi*,<sup>26</sup> *Onchocerca gutturosa*<sup>48</sup>).

Several forms of the GST enzyme of molecular weight between 23-28.5 kDa have been purified by GSH affinity chromatography and isoforms have been identified by chromatofocusing and high performance liquid chromatography. Helminth GST genes have also been isolated and expressed as recombinant proteins. **Table I** shows a list of helminths for which several forms of GST have been purified, and the range of helminth GSTs Mr is similar to the mammalian GSTs. The data on

Table I show no correlation between Mr and taxonomic groups.

The presence of different forms and several isoforms of the enzyme in the same helminth specie is well-documented. several examples of this have been reported. In cestodes, *Moniezia expansa* presents four different GST forms of the enzyme<sup>10</sup> whereas several GST cytosolic isoenzymes have been found in *Schistocephalus solidus*.<sup>6</sup> With regard to nematodes, cytosolic and microsomal fraction GSTs have been reported for adult *Dirofilaria immitis*.<sup>26</sup> The adult *Heligmosomoides polygyrus* presents two major forms of GST and four isoforms.<sup>4</sup> In *Onchocerca volvulus*, two GST forms with distinct substrate specificities have been described and Southern blot analysis revealed the presence of only one gene copy for each form.<sup>30</sup> For *Trichinella spiralis* two GST forms and three isoforms were found<sup>53</sup> and in *Ascaris summi* at least one form of the recombinant GST encoded by a single gene has been described.<sup>53</sup>

In trematodes, GSTs of four species of schistosomes (*Schistosoma bovis*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*) are composed of two major forms of molecules of 26 and 28 kDa, and each of these forms present isoforms.<sup>67</sup> *Schistosoma mansoni* in particular, contains at least five isoforms of GSTs, three of them (Sm26GST1, Sm26GST2, Sm26GST3) account for 2-4% of the soluble male worm protein. They have the same Mr of 28500 per monomer and are immunologically cross-reactive. Sm26GST1 and Sm26GST3 are composed of homodimers and Sm26GST2 is composed of heterodimers, the fourth minor form has a Mr of 26000. The fifth isoenzyme, with an Mr of 28000, fails to bind GSH-agarose matrices, which the standard method for purification of the other GST forms.<sup>47</sup>

Five forms of the trematode *Fasciola hepatica* GST have been isolated by Brophy *et al.*,<sup>8</sup> on the other hand, Rossjohn *et al.*<sup>54</sup> and Miller *et al.*<sup>44</sup> have reported eight GST

isoforms of the same parasite, four of which have been cloned. Widffels *et al.*<sup>70</sup> purified two forms and several isoenzymes from *F. hepatica*. N-terminal amino acid sequencing analysis of the protein revealed one core sequence containing three different polymorphisms for GST.

The abundance of several forms and isoforms suggest functional heterogeneity of this enzyme in the metabolism of the parasite.

### III. LOCALIZATION OF THE ENZYME IN HELMINTHS

In *Echinococcus granulosus* the GST was detected in parenchyma, however no specific association to any particular structure was observed.<sup>18</sup> In *Taenia solium*, GST is located in the tegument, throughout the parenchyma, in the cytoplasm of protonephridial and tegumentary cytons.<sup>68</sup>

In nematodes, GST was found in the hypodermis, the wall of the seminal receptacle and spermatozoa of the *Onchocerca volvulus* worm.<sup>55</sup> Besides a form of this enzyme is released from the worm *in vitro*, this particular GST form is a glycoprotein, which possesses a hydrophobic N-terminal signal peptide that is cleaved off in the process of producing the mature enzyme. Analysis of two forms of GSTs of *O. volvulus* indicated that their substrate specificities could functionally correlate with distinct localization profiles.<sup>30</sup> Rojas *et al.*<sup>53</sup> demonstrated that anti *Trichinella spiralis* antibodies recognize  $\alpha$  and  $\beta$  stichocytes of the parasite, and that the same antibodies were able to detect circulating *T. spiralis* GSTs in infected rabbits. A form of *Ascaris summi* GST has been localized in the intestine in all worms examined to date.<sup>11</sup>

In the trematode *Fasciola hepatica* some extracellular GST is associated with the lamellae of the intestinal epithelium,<sup>70</sup> and only one out of four cDNA clones that encode isoenzymes of *F. hepatica* was localized in the parenchyma and in the intestinal lamellae of the adult. These data indicate that

expression of GST isoenzymes is tissue-specific.<sup>13</sup>

In *Schistosoma mansoni* the localization of GSTs remains controversial. Whereas, Taylor *et al.*<sup>65</sup> and Liu *et al.*<sup>36</sup> have found GST in the tegument, protonephridial cells, subtegumental parenchymal cells, esophageal epithelium, genital organs, germinal and sustentacular cells of this parasite, Porchet *et al.*<sup>51</sup> reported the presence of the enzyme only in a subpopulation of parenchymal cells at all developmental stages of the parasite. These differences could be explained due to the sensitivity of the techniques employed, the solubility of the protein, or the strain of parasite used. Liu *et al.*<sup>36</sup> have confirmed the homogeneous distribution of this enzyme and at the same time have found that the enzyme is packed in small aggregates, suggesting that the protein may be exported out of *Schistosoma mansoni*.

Evidence for the distribution of GST on different structures of the parasite, at the host-parasite interface and the possibility of GST secretion indicate that this enzyme might play an important role in the parasite metabolism to overcome endogenous as well as exogenous toxic compounds.

#### IV. REGULATION OF ENZYMATIC ACTIVITY

Few studies attempt an explanation of the mechanisms that regulate the expression of the helminth GSTs. Drugs such as phenobarbital, and  $\beta$ -naphthoflavone increase the activity of the GST in the cestode *Echinococcus granulosus*.<sup>45</sup> Cambendazole resistance has been correlated with increased cytosolic GST activity in the nematode *Haemonchus contortus*.<sup>28</sup> Brophy *et al.*<sup>4</sup> have demonstrated a significant reduction in the expression of the nematode *Heligmosomoides polygyrus* GST activity when the parasite was passaged in a strain of mice highly resistant to the infection. The host effect on GST activity was also examined by infecting mice, rats and cattle as well as sheep with either salicylanilide resistant or

salicylanilide susceptible *Fasciola hepatica* isolates.<sup>44</sup>

Results from these studies indicate that the expression of GST can be modified by the host environment and by the drug susceptibility of the parasite.

The GST gene of the trematode *Schistosoma mansoni* presents a complex regulation of the expression of the enzyme throughout the parasite life-cycle.<sup>57</sup> Two research groups have found different putative cis-acting consensus sequences in the 5' flanking region of the gene. This region has a potential site for an AP1 transcription factor, three CCAAT boxes and a TATA box.<sup>41, 74</sup>

Studies aimed to understand the mechanisms that regulate GST genes could lead to the characterization of specific activators or other regulatory elements that could eventually be used as targets for possible interference with the parasite transcription machinery.<sup>57</sup>

#### V. RELATIONSHIP WITH MAMMALIAN GSTs

There is no well established classification for helminth GSTs, and investigators have therefore included them into mammalian GST classes. This classification is based on substrate and inhibitor specificities, immunological methods and amino acid sequences. However, since helminth GSTs present different characteristics, it is not easy to classified them into five mammalian GST classes ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\sigma$ ), for example, the four forms described in *Moniezia expansa* show no clear biochemical relationship to any of the known mammalian GST classes, nevertheless, the N-terminal of the major GST form shows sequence homology with the  $\mu$  and  $\alpha$  GST classes.<sup>10</sup> The recombinant GST from *Echinococcus multilocularis* was sequenced and showed a clear relationship with the mammalian  $\mu$  class but biochemical analysis of the enzyme showed no clear relationship to any mammalian GST classes.<sup>34</sup> In contrast, the major GST form in cestode

*Schistocephalus solidus* showed greater biochemical and N-terminal sequence homologies with the mammalian  $\mu$  GST class.<sup>6</sup> Another example is found in the genus *Schistosoma*. Recombinant GST of 28 kDa from *S. mansoni* and the GST of 26 kDa from *S. japonicum* displayed a mosaic of enzymatic characteristics of mammalian  $\alpha$ ,  $\mu$  and  $\pi$ -type substrate specificities and inhibitor sensitivities. However, a multivariate analysis suggests that Sm 28GST has an overall catalytic homology with mammalian  $\mu$  class GST, whilst the enzyme properties of Sj26GST appear to constitute a hybrid of the  $\mu$  and  $\alpha$  class features.<sup>69</sup> Table I shows a list of the cestodes, trematodes and nematodes and the relationship of their GSTs with the mammalian GST classes.

Although several authors have accepted to include the helminth GSTs into one of the mammalian GST classes, we suggest that a new classification of all GSTs or, at least, one classification exclusively for helminth GSTs is needed.

## VI. ROLE IN LIPID PEROXIDATION

Parasites, like mammals and other organisms, come in contact with a variety of toxic molecules such as free radicals or oxygen reactive intermediates produced by the endogenous cellular metabolism, pharmacological agents and effector elements of the host immune response such as the respiratory burst of macrophages which cause lipid peroxidation in cell membranes thus yielding lipid hydroperoxides that can be transformed to cytotoxic carbonyls causing severe damage to several cellular structures and even death to the parasite.<sup>7, 29</sup>

In mammals, the main line of defense against such compounds is a group of oxidative enzymes and many of these oxidations are dependent on cytochrome P-450 and cytochrome b<sub>5</sub>. In parasitic plathyhelminths and nematodes, cytochrome P-450 is absent. Protection occurs at three levels, in the first, superoxide dismutase, catalase and peroxidases remove the free

radical chain reactions before the lipid peroxidation process. A second line of lipid peroxidation defense is provided by the glutathione-dependent enzymes, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases. These enzymes detoxify lipid hydroperoxides before their transformation to secondary products. The final level of protection is directed against cytotoxic carbonyls and the enzyme which inactivates these compounds is also glutathione S-transferase.<sup>7, 9</sup> Xenobiotic compounds containing reactive groups can undergo second phase conjugation without previously entering first phase metabolism.<sup>48</sup>

Table I shows that in all helminth groups tested, enzymatic activity with at least one lipid hydroperoxide and one reactive carbonyl are present. This clearly suggests that the GSTs of parasitic helminths are involved in the second line of lipid peroxidation defense.

## VII. BINDING FUNCTION OF GST

GSTs can be bound to a large range of hydrophobic ligands and thus inactivated. For example, cestode, nematode and trematode GSTs are inhibited *in vitro* by several compounds such as haematin and related, bile acids, fatty acids, cibacron blue, triphenyltin chloride and bromosulphothalein. The last 3 inhibitors are used to classify mammalian GST classes.<sup>10, 33, 68, 69</sup>

Helminth GSTs present the capacity to bind drugs and sometimes metabolize it. In nematodes, the *Ascaris summi* GSTs bind to anthelmintics such as albendazole, bithionol and hexachlorophen.<sup>33</sup> Regarding cestodes the major *Moniezia expansa* GST binds to several commercial anthelmintics but did not appear to conjugate anthelmintics with GSH.<sup>10</sup> The major *Schistocephalus solidus* GST did bind to several anthelmintics but failed to do so with praziquantel (PZQ).<sup>6</sup> The same phenomenon is observed in trematode strains of the genus *Schistosoma*, particularly *S. mansoni*.<sup>27, 69</sup> In contrast, Dichlorvos (the active form of the



antischistosomal drug metrifonate) serves as a substrate for *S. mansoni* GST isoforms.<sup>46</sup>

An interesting work with the ligand-free recombinant *Schistosoma japonicum* GST in the form of crystals and recombinant *S. japonicum* GST-PZQ crystals discovered the existence of an adjoining bind-

ing region for glutathione, xenobiotic substrates and hydrophobic ligands. PZQ binds to a specific site of the dimer, interfering with large xenobiotic and endogenous electrophilic substrates which extend into the PZQ binding region. This is not so with small substrates. Although the PZQ binds to

TABLE 1.  
Parasitic helminth glutathione S-transferases purified by affinity chromatography, relationship with mammalian GSTs and detoxification capacities.

	Monomeric Forms Mr (kDa)	Relationship with mammalian GSTs	Activity with hydroperoxides*	Activity with reactive carbonyls*
<b>CESTODES</b>				
<i>Echinococcus granulosus</i> <sup>18</sup>	24	μ	NR	NR
<i>Echinococcus multilocularis</i> <sup>34</sup>	25.5	μ	+	+
<i>Hymenolepis diminuta</i> <sup>7</sup>	24	NR	NR	NR
<i>Moniezia expansa</i> <sup>9,10</sup>	24.5	μ α	+	+
<i>Schistocephalus solidus</i> <sup>6,9</sup>	24	μ	+	+
<i>Taenia solium</i> <sup>68</sup>	26	μ	+	+
<b>TREMATODES</b>				
<i>Fasciola hepatica</i> <sup>7,8,56,70</sup>	26 26.5	μ	+	+
<i>Schistosoma bovis</i> <sup>67</sup>	26 28	NR	NR	NR
<i>Schistosoma haematobium</i> <sup>67</sup>	26 28	NR	NR	NR
<i>Schistosoma japonicum</i> <sup>66</sup>	26 28	α μ	+	+
<i>Schistosoma mansoni</i> <sup>23,69,70</sup>	26 28	α μ π	+	+
<b>NEMATODES</b>				
<i>Ascaris summi</i> <sup>31,55</sup>	24 25 26	α μ	+	+
<i>Dirofilaria immitis</i> <sup>26</sup>	28	NR	+	ND
<i>Haemonchus contortus</i> <sup>9,28,60</sup>	23 23.5 24	α	NR	+
<i>Heligmosomoide polygyrus</i> <sup>5</sup>	23 24	α	NR	NR
<i>Onchocerca volvulus</i> <sup>32,30</sup>	24	π	+	+
<i>Trichinella spiralis</i> <sup>53</sup>	28 28.5	NR	+	NR

+ = Activity present    NR = Not reported    ND = Not detected

\* = At least one lipid hydroperoxide    & = At least one reactive carbonyl

the GST molecule, it acts as a non-substrate GST inhibitor.<sup>42</sup>

These findings are interesting because drugs such as metrifonate and PZQ are used to treat several helminth infections. These studies open the possibility of describing mechanism of these drugs to inactivate the enzyme and allow research on new drugs directed specifically against important catalytic regions of the enzyme.

### VIII. HELMINTH GSTs AS ANTIGEN

A protein with the characteristics described above should be important for the detoxification metabolism and consequently for parasite survival.

That is the reason why various helminth GSTs have been employed as antigens in protection assays in several animal models, employing a wide variety of protocols. **Table II** summarizes the results from several protection assays where protection achieved a range from 0% up to 89%. This assertion is supported by the elegant experiment of Xu *et al.*<sup>72</sup> They obtained transgenic mice expressing an *S. mansoni* 28 kDa GST and observed a significantly increased worm burden in transgenic mice compared to non-transgenic mice. In contrast, the level of IgG anti Sm28GST was lower in transgenic than in non-transgenic mice. They found the same results when the experiment was repeated with mice previously immunized with Sm28GST. This argues in favour of the GST enzyme plays a central role in parasite viability.

The immune response against this enzyme has been mainly studied in the trematode *S. mansoni*. For example, sera obtained from calves vaccinated subcutaneously with the recombinant *S. bovis* 28 kDa GST and exposed to *S. matthei*,<sup>19</sup> showed high titers of specific IgG and IgA,<sup>19</sup> this is in contrast with another report by Yang *et al.*<sup>73</sup> in which a significant increase in IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgM but not of IgA results from the oral immunization of a group of mice with recombinant *S. japonicum*.<sup>73</sup>

Rats immunized intradermally with a plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa GST, exhibited IgG<sub>2a</sub> and IgG<sub>2b</sub>, in their serum. This profile is probably of a Th1-like immune response, moreover sera of these immunized animals were able to mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity *in vitro*.<sup>16</sup> But in mice vaccinated against schistosomiasis by mucosal pathway using liposome-associated *S. mansoni* 28 kDa GST promoted the production of specific antibodies of IgA in gut and IgG<sub>1</sub> plus IgG<sub>2b</sub> in sera. This profile is compatible with the Th2 immune response type.<sup>25</sup>

Taken together these findings show that the immune response against the helminth GSTs depend on the animal model and immunization protocol used. However, the importance of T cells in the mediation of immunity to many parasites has been demonstrated at length.<sup>62</sup>

### IX. CONCLUDING REMARKS

The abundance, enzymatic properties and localization of helminth GSTs suggest that this enzyme might play an important role in the establishment and permanence of the parasite in the host. The capacity of the enzyme to bind and metabolize drugs (metrifonate), the structural studies of PZQ interaction, the availability of cloned genes and preliminary studies on gene regulation gives us the opportunity to design new specific drugs against this parasites.

Protection assays have shown that using only this enzyme as antigen does not provide full protection. This is probably due to the fact that GST is not the only enzyme that participates in the parasitic defense process, we believe that it is possible to obtain higher levels of protection if the GST is used in combination with other oxidative enzymes. Furthermore, the arrival of a new generation of DNA vaccines, will greatly improve vaccination against helminth parasites.

TABLE II.  
Examples of protection assays using helminth glutathione S-transferase as antigen.

Helminth	Source of antigen	Host	Adjuvant employed	Immunization pathway	% Protection	
CESTODES						
<i>T. crassiceps</i> <sup>68</sup>	Native of <i>T. solium</i>	Mouse	Freund's	s.c.	52-72	
NEMATODES						
<i>H. contortus</i> <sup>28</sup>	Native	Guinea pig	Freund's	s.c.	None	
TREMATODES						
<i>F. hepatica</i> <sup>22</sup>	Native	Rat	Freund's	s.c.	None	
<i>F. hepatica</i> <sup>58</sup>	Native	Sheep	Freund's	s.c.	57	
<i>F. hepatica</i> <sup>59</sup>	Native	Sheep	Freund's	s.c.	44	
<i>F. gigantica</i> <sup>17</sup>	Native	Cattle	MF59	s.c.	16	
<i>S. matthei</i> <sup>14</sup>	Recombinant of <i>S. Bovis</i>	Cattle	Freund's	i.m.	50	W
					89	FE
<i>S. japonicum</i> <sup>61</sup>	Recombinant	Buffaloes	Freund's	s.c.	22.3	W
					50	FE
					40	EHC
<i>S. mansoni</i> <sup>25</sup>	Recombinant	Mice	Liposome	Oral	52	W
					53	TE
					53	FE
<i>S. mansoni</i> <sup>3</sup>	Recombinant	Para Monkeys	MDP	s.c.	74	FE
<i>S. japonicum</i> <sup>35</sup>	Recombinant	Pig	Al(OH) <sub>3</sub>	i.m.	28.5	W
					53.5	E
<i>S. bovis</i> <sup>11</sup>	Native	Cattle	Freund's	i.m.	None	W
					56-82	FE

W=Worm, FE=Fecal eggs, TE=Tissue eggs, E=Total eggs, EHC=Egg-hatching capacity  
MDP=Muramyl-dipeptide, i.m.=intramuscular, s.c.= subcutaneous

## Acknowledgements

This work was supported in part by grants M9308-3326 from CONACYT (A.L.) and IN201795 from PAPIIT-UNAM (A.L.). The authors wish to thank to Dr. Javier Sánchez García and Dr. Ruy Pérez Montfort for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

1. BLOCKI, F.A.; P.M. SCHLIEVERT & L.P. WACKETT, 1992. Rat liver protein linking chemical and immunological detoxification systems. *Nature*. **360**:269-270.
2. BOOTH, J.; E. BOYLAND & P. SIMS, 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugation with glutathione. *Biochem. J.* **79**: 516-524.
3. BOULANGER D.; A. WARTER; F. TROTEIN; F. MAUNY; P. BREMOND; F. AUDIBERT; D. COURET; S. KADRI; C. GODIN; E. SELLIN; R.J. PIERCE; J.P. LECOCQ; B. SELLIN & A. CAPRON, 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally with *Schistosoma haematobium* using a recombinant glutathione S-transferase cloned from *S. mansoni*. *Parasite Immun.* **17**: 361-369.
4. BROPHY, P.M.; A. BEN-SMITH; A. BROWN; J.M. BEHNKE & D.I. PRITCHARD, 1995. Differential expression of glutathione S-transferase (GST) by adult *Heligmosomoides polygyrus* during primary infection in fast and slow responding hosts. *Int. J. Parasitol.* **25**: 641-645.
5. BROPHY, P.M.; A. BEN-SMITH; A. BROWN; J.M. BEHNKE & D.I. PRITCHARD, 1994. Glutathione S-transferases from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. *Comp. Biochem. Physiol.* **109B**: 585-592.
6. BROPHY, P.M.; A. PAPADOPOULOS; M. TOURAKI; B. COLES; W. KÖRTING & J. BARRETT, 1989. Purification of cytosolic glutathione transferase from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): interaction with anthelmintics and products of lipid peroxidation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **36**:187-196.
7. BROPHY, P. M. & J. BARRETT, 1990. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 205-212.
8. , 1990. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**:155-162.
9. 1990. Relative distribution of glutathione transferase glyoxalase I and glyoxalase II in helminths. *Int. J. Parasitol.* **20**:259-261.
10. BROPHY, P. M.; C. SOUTHAN & J. BARRETT, 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Bioch. J.* **262**: 939-946.
11. BUSHARA, H.O.; M.E.N. BASHIR; K.H. E. MALIK; M.M. MUKHTAR; F. TROTEIN; A. CAPRON & M.G. TAYLOR, 1993. Suppression of *Schistosoma bovis* egg production in cattle by vaccination with either glutathione S-transferase or keyhole haemocyanin. *Parasite Immun.* **15**: 383-390.
12. COMBES, B., AND G.S. STAKELUM, 1961. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. *J. Clin. Invest.* **40**: 981-988.
13. CREANEY, J.; G.L. WIJFFELS; J.L. SEXTON; R.M. SANDEMAN; T. W. SPITHILL & J. C. PARSONS, 1995. *Fasciola hepatica*: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Exp. Parasitol.* **81**: 106-116.
14. DE BONT, J.; J. VERCRUYSSSE; J.M. GRZYCH; P.F.M. MEEUS & A. CAPRON, 1997. Potential of recombinant *Schistosoma bovis*-derived glutathione S-transferase to protect cattle against experimental and natural *S. mattheei* infection. *Parasitology.* **115**: 249-255.
15. DIRR, H.; P. REINEMER & R. HUBER, 1994. X ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implica-

- tions for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.* 220: 645-661.
16. DUPRE, L.; O. POULAIN-GODEFROY; E. BAN; N. IVANOFF; M. MEKRAFAR, A-M. SCHACHT; A. CAPRON & G. RIVEAU., 1997. Intra-dermal Immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase. *Parasite Immun.* 19: 505-513.
  17. ESTUNINGSIH, S.E; P.M. SMOOKER; E. WIEDOSARI; S. WIDJAJANTI; S. VALIANO; S. PARTOUTOMO & T.W. SPITHILL, 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle. *Int. J. Parasitol.* 27: 1419-14: 1419-1428.
  18. FERNÁNDEZ C. & C.E. HORMAECHE, 1994. Isolation and biochemical characterisation of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Int. J. Parasitol.* 24: 1063-1066.
  19. GRZYCH, J.M.; J. DE BONT; J. LIU; J.L. NEYRINCK; J. FONTAINE; J. VERCRUYSE & A. CAPRON, 1998. Relationship of impairment of *Schistosoma* 28-kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma bovis* 28-kilodalton GST. *Infect. Immun.* 66: 1142-1148.
  20. HABIG, W.H.; M.J. PABST & W. B. JAKOBY, 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 22: 7130-7139.
  21. HAYES, J.D. & D.J. PULFORD, 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST\* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:445-600.
  22. HOWELL, M.J.; P.G. BOARD & J.C. BORAY, 1988. Glutathione S-transferases in *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 74: 715-718.
  23. HUGHES, A.L., 1993. Rates of amino acid evolution in the 26- and 28-kDa glutathione S-transferases of *Schistosoma*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59: 43-52.
  24. ISHIKAWA, T., 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.* 17: 463-468
  25. IVANOFF, N.; N. PHILLIPS; A-M. SCHACHT; C. HEYDARI; A. CAPRON & G. RIVEAU, 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm 28 kDa glutathione S-transferase. *Vaccine.* 14:1123-1131
  26. JAFFE, J.J. & R.A. LAMBERT, 1986. Glutathione S-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:199-206.
  27. KATS, N.; R.S. ROCHA; C.P. DESOUZA; P.C. PILHO; J.I. BRUCE; G.C. COLES & G. K. KINOTI, 1994. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. *J. Trop. Med. Hyg.* 44:509-512.
  28. KAWALEK, J.C.; R.S. REW & J. HEAVNER, 1984. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*: comparative activity of a cambendazole-resistant and susceptible strain. *Int. J. Parasitol.* 14:173-175.
  29. KETTERER, B.; D.J. MEYER & A. G. CLARK, 1988. Soluble glutathione transferase isozymes, p. 73-135. In: H. Sies & B. Ketterer (eds.). *Glutathione Conjugation: Its mechanism and biological significance*. Academic Press, London, U.K.
  30. LIEBAU, E.; G. WILDENBURG; P.M.P. BROPHY; R.D. WALTER & K. HENKLE-DUHRSEN, 1996. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Mol. Biol. Parasitol.* 80:27-39.
  31. LIEBAU, E.; O.L. SCHONBERGER; R.D. WALTER; J. KIMBERLY & K. HENKLE-DUHRSEN, 1994. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 63:167-170.
  32. LIEBAU, E.; R.D. WALTER & K. HENKLE-DUHRSEN, 1994. *Onchocerca volvulus*:

- Isolation and sequence of a second glutathione S-transferase cDNA. *Exp. Parasitol.* 79:68-71.
33. LIEBAU, E.; V.H.O. ECKELT; G. WILDENBURG; P. TEESDALE-SPITTLE; P. M. BROPHY; R.D. WALTER & HENKLE-DUHRSEN, 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *Biochem J.* 324:659-666.
  34. LIEBAU, E.; V. MÜLLER; R. LUCIUS; R. D. WALTER & K. HENKLE-DÜHRSE 1996. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77: 49-56.
  35. LIU, S.X.; G.C. SONG; Y.X. XU; W. YANG & D.P. MCMANUS, 1995. Antifecundity immunity induced in pigs vaccinated with recombinant *Schistosoma japonicum* 26 kDa glutathione-S-transferase. *Parasite Immun.* 17: 335-340.
  36. LIU, J.L.; J. FONTAINE; A. CAPRON & J. M. GRZYCH, 1996. Ultrastructural localization of Sm28GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology* 113: 377-391.
  37. MANNERVIK, B., 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. in Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 57:357-417.
  38. MANNERVIK, B.; P. ALIN; C. GUTHENBERG; H. JENNSON; T.M. KALIM; M. WARHOLM & H. JORNVALL, 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: 7202-7206
  39. MANNERVIK, B. & V.H. DANIELSON, 1988. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23: 283-328.
  40. MANOHARAN, T.H.; A.E. GULICK; R. B. PUCHALSKI; A.L. SERVIAS & W.E. FAHL, 1992. Structural studies on human glutathione S-transferase  $\pi$ . Substitution mutations to determine amino acids necessary for binding glutathione. *J. Biol. Chem.* 267: 18940-18945.
  41. MCNAIR, A.L.; C. DISSOUS; O DUVAUX-MIRET & A. CAPRON, 1993. Cloning and characterisation of the gene encoding the 28kDa glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene.* 124: 245-249.
  42. MCTIGUE M.A.; D.R. WILLIAMS & J. A. TAINER, 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Scistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J. Mol. Biol.* 246: 21-27.
  43. MEYER, D.J.; B. COLES; S.E. PEMBLE; K.S.GILMORE; G.M. FRASER & B. KETTERER, 1991. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochim. J.* 274: 409-414.
  44. MILLER C.M.D.; M.J. HOWELL & J.C. BORAY, 1994. Glutathione S-transferases as markers of salicylanilide resistance in isolates of *Fasciola hepatica*. *Int. J. parasitol.* 24: 533-542.
  45. MORELLO, A.; Y. REPETTO & A. ATIAS, 1982. Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Comp. Biochem. Phys.* 72B: 449-452.
  46. O'LEARY, K. A. & J. W. TRACY, 1991. *Schistosoma mansoni*: Glutathione S-transferase catalyzed detoxication of dichlorvos. *Exp. Parasitol.* 72: 355-361.
  47. O'LEARY, K.A.; K.M. HATHAWAY & J. W. TRACY, 1992. *Schistosoma mansoni*: Single-step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4. *Exp. Parasitol.* 75: 47-55.
  48. PEMBERTON, K.D. & J. BARRET, 1989. The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda:Filarioidea). *Int. J. Parasitol.* 19:875-878.
  49. PEMBLE, S.E. & B. TAYLOR, 1992. An

- evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. *Biochem. J.* 287: 957-963.
50. PICKETT, C.B., 1989. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 743-764.
  51. PORCHET, E.; A. MCNAIR; A. CARON; J.P. KUSNIERZ; K. ZEMZOUMI & A. CAPRON, 1994. Tissue expression of the *Schistosoma mansoni* 28kDa glutathione S-transferase. *Parasitology.* 109: 565-572.
  52. PRECIOUS, W.Y. & J. BARRET, 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today.* 5(5): 156-160.
  53. ROJAS J.; M. RODRIGUEZ-OSORIO & V. GOMEZ-GARCIA, 1997. Immunological characteristics and localization of the *Trichinella spiralis* glutathione S-transferase. *J. Parasitol.* 83:630-635.
  54. ROSSJOHN, J.; S.C. FEIL; M.C.J. WILCE; J.L. SEXTON; T.W. SPITHILL & M.W. PARKER, 1997. Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase. *J. Mol. Biol.* 273: 857-872.
  55. SALINAS G.; G. BRAUN & D.W. TAYLOR, 1994. Molecular characterisation of an *Onchocerca volvulus*  $\pi$  class glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:1-9.
  56. SALVATORE, L.; G. WIJFFELS; J.L. SEXTON; M. PANACCIO; S. MAILER; I. MCCAULEY & T.W. SPITHILL, 1995. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 69:281-288.
  57. SERRA, E.; K. ZEMZOUMI; J. TROLET; A. CAPRON & C. DISSOUS, 1996. Functional analysis of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa glutathione S-transferase gene promoter: involvement of SMNF-Y transcription factor in multimeric complexes. *Mol Biochem. Parasitol.* 83: 69-80.
  58. SEXTON, J.L.; A. R. MILNER; M. PANACCIO; J. WADDINGTON; G. WIJFFELS; D. CHANDLER; C. THOMPSON; L. WILSON; T. W. SPITHILL; G. F. MITCHELL & N. J. CAMPBELL, 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immun.* 145: 3905-3910.
  59. SEXTON, J.L.; M.C.J. WILCE; T. COLIN; G. L. WIJFFELS; L. SALVATORE; S. FEIL; M.W. PARKER; T.W. SPITHILL & C.A. MORRISON, 1994. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with glutathione S-transferase. *J. Immun.* 152: 1861-1872.
  60. SHARP, P.J.; D.R.J. SMITH; W. BACH; B. M. WAGLAND & G.S. COBON, 1991. Purified glutathione S-transferase from parasites as candidate protective antigens. *Int. J. Parasitol.* 21: 839-846.
  61. SHUXIAN, L.; H. YONGKANG; S. GUANG-CHEN; L. XING-SONG; X. YUXIN & D.P. MCMANUS, 1997. Anti-fecundity immunity to *Schistosoma japonicum* induced in chinese water buffaloes (*Bos buffelus*) after vaccination with recombinant 26 kDa glutathione S-transferase (reSjc26GST). *Vet. Parasitol.* 69: 39-47.
  62. SMITH, N.C., 1992. Concepts and strategies for anti-parasite immunoprophylaxis and therapy. *Int. J. Parasitol.* 22: 1047-1082.
  63. SNYDER, M.J. & D.R. MADDISON, 1997. Molecular phylogeny of glutathione S-transferases. *DNA Cell Biol.* 16(11): 1373-1384.
  64. TAHIR, M.K. & B. MANNERVIK, 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 261(3): 1048-1051.
  65. TAYLOR, J.B.; A. VIDAL; G. TORPIER; D.J. MEYER; C. ROITSCH; JM. BALLOUL; C. SOUTHAN; P. SONDERMEYER; S. PEMBLE; JP. LECOCQ; A. CAPRON & B. KETTERER, 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribu-

- tion of a cloned M<sub>r</sub>28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **7**: 465-472.
66. TIU, W.U.; K.M. DAVERN; M.D. WRIGHT; P.G. BOARD & G.F. MITCHELL, 1988. Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immun.* **10**: 693-706
67. TROTTEIN, F.; C. GODIN; R.J. PIERCE; B. SELLIN; M.G. TAYLOR; I. GORILLOT; M.S. SILVA; JP. LECOCQ & A. CAPRON, 1992. Inter-species variation of schistosome 28kDa glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 63-72.
68. VIBANCO-PEREZ, N.; L. JIMENEZ; M.T. MERCHANT & A. LANDA, 1998. Purification and characterization of *Taenia solium* glutathione S-transferase (SGST). Submitted for publication
69. WALKER, J.; P. CROWLEY; A.D. MOREMAN & J. BARRET, 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**: 255-264
70. WIJFFELS, G.L.; J.L. SEXTON; L. SALVATORE; J.M. PETTITT; C. HUMPHRIS; M. PANACCIO & T.W. SPITHILL, 1992. Primary sequence heterogeneity and tissue expression of glutathione S-transferases of *Fasciola hepatica*. *Exp. Parasitol.* **74**: 87-99.
71. WILCE, M.C.J. & M.W. PARKER, 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Bioch. Bioph. Acta.* **1205**: 1-18.
72. XU, X.; C. LEMAIRE; J-M. GRZYCH; R.J. PIERCE; M. RACCURT; F. MULLIER; F. ZERIMECH; J-P. DECAVEL; S. PEYROL; J. LIU; J. FONTAINE; S. LAFITTE; A. CAPRON & J-Y. CESBRON, 1997. Expression of a *Schistosoma mansoni* 28-kilodalton glutathione S-transferase in the livers of transgenic mice and its effect on parasite infection. *Inf. Immun.* **65**: 3867-3874.
73. YANG, W.; G.N. GOBERT & D.P. MC MANUS, 1997. Oral vaccination of mice with recombinant *Schistosoma japonicum* proteins induces specific anti parasite antibodies and damage to adult worms after a challenge infection. *Int. J. Parasitol.* **27**: 843-853.
74. Zemzoumi, K.; C. DISSOUS; C. COCHU; J. TROLET; A. CAPRON & A. MCNAIR, 1995. *Schistosoma mansoni*: interaction of nuclear extracts with the CCAAT binding site revealed by gel shift assay.



## CHARACTERIZATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE OF *TAENIA SOLIUM*

Norberto Vibanco-Pérez, Lucía Jiménez, Marie T. Merchant, and Abraham Landa\*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, México

**ABSTRACT:** A *Taenia solium* glutathione-S-transferase fraction (SGSTF) was isolated from a metacestode crude extract by affinity chromatography on reduced glutathione (GSH)-sepharose. The purified fraction displayed a specific glutathione S-transferase (GST) activity of 2.8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  and glutathione peroxidase selenium-independent activity of 0.22  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . Enzymatic characterization of the fraction suggested that the activity was closer to the mammalian  $\mu$ -class GSTs. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, gel filtration, and enzyme activity analysis showed that the fraction was composed of a major band of  $M_r = 26$  kd and that the active enzyme was dimeric. Immunohistochemical studies using specific antibodies against the major 26-kd band of the SGSTF indicated that GST protein was present in the tegument, parenchyma, protonephridial, and tegumentary cytons of the *T. solium* metacestode. Antibodies generated against the SGSTF tested in western blot showed cross-reactivity against GSTs purified from *Taenia saginata*, *T. taeniaeformis*, and *T. crassiceps*, but did not react with GSTs from *Schistosoma mansoni*, or mice, rabbit, and pig liver tissue. Furthermore, immunization of mice with SGSTF reduced the metacestode burden up to 74.2%. Our findings argue in favor of GST having an important role in the survival of *T. solium* in its hosts.

*Taenia solium* is a cestode that causes cysticercosis and taeniosis. Cysticercosis is caused by the metacestode stage and constitutes an important zoonosis in developing countries of Latin America and Asia (Gemmel et al., 1985; Tsang and Wilson, 1995); infection levels in Mexico may be as high as 3% in the general population, as estimated by serology (Larralde et al., 1992). Neurocysticercosis, cysticerci in the central nervous system, is the most serious form of this disease in humans, because it can be a chronic degenerative illness and cause of death (Del Brutto and Sotelo, 1988). Furthermore, cysticercosis in pigs (natural host) causes important economic losses in pig husbandry (Acevedo-Hernández, 1982; Aluja, 1982). Cysticercosis in pigs and humans is caused by the ingestion of water or food contaminated by human feces containing viable tapeworm eggs. Taeniosis in humans (definitive host) is caused by the adult worm after ingestion of raw or undercooked pork infected with cysticerci. Although taeniosis is not considered a health problem, it is an important risk factor for acquiring cysticercosis in pigs and humans (Díaz-Camacho et al., 1990; Sarti et al., 1992).

The glutathione S-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) are dimeric enzymes with monomeric molecular masses from 13 to 28 kd, expressed from protozoa to vertebrates (Brophy and Pritchard, 1994). These enzymes are part of the phase II detoxification process and catalyze the conjugation of glutathione to a variety of electrophilic substrates (Precious and Barret, 1989). The interaction of GSTs with some anthelmintic agents contributes to detoxification and drug resistance (Brophy and Barret, 1990; O'Leary and Tracy, 1991; Brophy and Pritchard, 1994). GSTs induce varying degrees of protective immunity (20–72%) against schistosomiasis and fascioliasis in a number of animal models (Sexton et al., 1990; Brophy and Pritchard, 1994; Pierce and Capron, 1994; Bergquist, 1995; Ivanoff et al., 1996), an observation that has made this enzyme a candidate antigen for designing a vaccine.

*Taenia solium*, like other helminth parasites, is capable of evading the host immune response by a variety of defense mechanisms, which are likely to include the detoxification and

neutralization of exogenous toxic compounds by the enzyme GST (Brophy and Pritchard, 1994). The present study presents evidence of substantial GST activity in *T. solium* metacestodes and describes the partial biochemical and immunological characterization of this enzyme.

### MATERIALS AND METHODS

#### Biological material

*Taenia solium* metacestodes were obtained from skeletal muscle of naturally infected pigs and *Taenia crassiceps* O.T. strain, metacestodes were obtained from the peritoneal cavity of experimentally infected mice. *Taenia saginata* adult worms were obtained from naturally infected humans treated with niclosamide (Yomesan, Bayer, México, D.F., México). *Taenia taeniaeformis*, MRn strain, and *T. solium* adult worms were recovered from experimentally infected cats and hamsters, respectively. Fresh livers from mice, rabbits, and pigs were obtained from the animal breeding facilities of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and from a local slaughterhouse. Livers, metacestodes, and adult worms were washed in phosphate-buffered saline (PBS) with antibiotics (1,000 units/ml penicillin and 1,000 units/ml streptomycin) and stored at  $-70$  C until used.

#### Purification of GSTs

The GSTs were purified from mice, rabbit, and pig livers, adult worms, and metacestode extracts by reduced glutathione-sepharose (GSH-sepharose) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) affinity chromatography as recommended by the supplier. Briefly, a crude extract was prepared by homogenization of 10 g of parasites or liver tissue in 50 ml of PBS-T (0.015 M phosphates, 0.15 M NaCl, pH 7.4, and 1% Triton X-100) (Pharmacia) and centrifuged at 35,000 rpm for 15 min in a TL-100 ultracentrifuge (Beckman Inst., Palo Alto, California). Two milliliters of supernatant containing 5 mg/ml was filtered through a GSH-sepharose affinity matrix, the matrix was washed 10 times with PBS, and the bound protein was eluted with a solution of 5 mM glutathione (GSH) in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0. Fractions were collected and dialyzed against PBS and concentrated to 2 mg/ml by lyophilization. *Taenia solium* glutathione-S-transferase fraction isolated from metacestode crude extract (MCE) by GSH-sepharose affinity chromatography was designated as *T. solium* glutathione-S-transferase fraction (SGSTF).

#### Gel filtration chromatography

The SGSTF (20  $\mu\text{g}$ ) was filtered through a Superdex 75 HR 10/30 column (Pharmacia) in 0.05 M potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at a flow rate of 0.5 ml/min. GST activity for each 0.5-ml fraction was determined as described below. Ribonuclease A (12 kd), carbonic anhydrase (29 kd), ovalbumin (45 kd), and bovine serum albumin (BSA) (67 kd) were employed as molecular weight markers. All protein concentrations were

Received 24 June 1998; revised 9 November 1998; accepted 9 November 1998.

\* To whom correspondence should be addressed.

determined by Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

### Production of polyclonal and specific antibodies against SGSTF

New Zealand rabbits were immunized by subcutaneous (s.c.) injections with 100 µg of SGSTF mixed with Al(OH)<sub>3</sub> (v/v), in the muscle of the right hind leg every 2 wk for 2 mo. Rabbits were bled 14 days after each injection, and the sera were pooled and frozen. The whole anti-SGSTF antibody fraction was purified by ammonium sulfate precipitation, dialyzed extensively in PBS, and stored at -20°C (Dunbar and Schwoebel, 1990). Specific antibodies against the major 26-kd band on the SGSTF were prepared according to Ritter (1991) with some modifications. Briefly, the SGSTF was transferred to a nitrocellulose membrane and the region containing the major 26-kd band was cut and incubated with whole anti-SGSTF antibodies. Antibodies bound to nitrocellulose membranes were washed with PBS and eluted with a solution of 0.2 M glycine-HCl, pH 2.6, for 10 min. Eluted antibodies were immediately neutralized with 10× PBS and tested by western blot. This antibody fraction will be referred to as specific anti-GST26 antibodies.

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

About 100 µg of MCE and 2.5 µg of each purified GST fraction were mixed (v/v) with Laemmli 2× sample buffer (3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl, and 5% 2-β mercaptoethanol, pH 6.8) and boiled for 2 min. Samples were separated on 12.5% acrylamide gels (Laemmli, 1970), and stained with Coomassie blue R-350. Some gels were electrotransferred for 1 hr onto nitrocellulose membranes (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts) as described by Towbin et al. (1979). The transferred proteins were incubated with the anti-SGSTF antibodies, and bound antibodies were detected after incubation with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (Zymed Laboratories, San Francisco, California) diluted 1:2,000.

### Indirect immunofluorescence assays

Whole metacestodes from *T. solium* were dissected from infected pork, washed with PBS buffer, embedded in Tissue-Tek (Miles Laboratories, Indianapolis, Indiana), immediately frozen in liquid N<sub>2</sub>, and stored at -70°C. Frozen sections of metacestodes were prepared and overlaid with 100 µl of specific anti-GST26 (0.4 mg/ml) antibodies in PBS with BSA 1%, 0.05% Tween 20 overnight. Sections were rinsed 3 times with PBS and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG immunoglobulin M (IgM) (Sigma, St. Louis, Missouri) diluted 1:50 in PBS with BSA 1%, 0.05% Tween 20 for 60 min at room temperature. Finally, sections were washed 3 times in PBS, mounted in a glycerol-PBS solution (9:1), and photographed in a Nikon Optiphot epifluorescence microscope (Nikon Inc., Bayshore, New York). Normal rabbit IgG was used at the same dilution as control (Grzanna, 1982).

### Enzymatic assays

The GST activity was measured at 25°C with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) as the standard second substrate. The reaction was carried out in 1 ml of 100 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA buffer, pH 6.5, GSH, and 5 µg of SGSTF. The substrates tested were ethacrynic acid (Sigma); and 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane, bromosulphophthalein, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, hexa-2,4-dienal, *trans*-non-2-enal (Aldrich). The enzymatic activities for these substrates were measured as described in the literature (Habig et al., 1974; Habig and Jakoby, 1981; Brophy, Papadopoulos et al., 1989; Brophy et al., 1990). Selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidase activities were determined by the method of Paglia and Valentine (1967), with minor modifications. The reaction was prepared in 1 ml containing 5 µg of SGSTF in 100 mM potassium phosphate, 1 mM EDTA buffer, pH 7.7, 1 mM sodium azide, 0.15 mM reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), 0.25 U of glutathione reductase (Sigma), 5 mM GSH, and 0.5 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or cumene hydroperoxide (Sigma). The reaction was carried out at 25°C for 3 min and measured every minute at 340 nm in a Du 640 Beckman spectrophotometer.

### Inhibition assays

The inhibition of GST activity was measured as I<sub>50</sub>, which is defined as the concentration of inhibitor at which 50% of the enzyme is inhibited. The GST activity was measured as described previously using CDNB as the second substrate in the presence of varying concentrations of inhibitors and the I<sub>50</sub> was estimated graphically (Mannervik and Danielson, 1988). The inhibitors used were bromosulphophthalein, cibacron blue (Sigma), and triphenyltin chloride (Aldrich).

### Protection assays

Groups of 7 female BALB/c mice 4 to 6 wk of age were immunized twice by s.c. injection, at 15-day intervals with 1 and 10 µg of SGSTF or 10 µg of *T. solium* MCE. Freund's complete and incomplete adjuvants (10 µl/mouse) were used in the first and second immunization. Control animals were immunized with PBS, plus the corresponding adjuvant. Mice were challenged by the intraperitoneal route 30 days after the second immunization with 10 nonbudding (2- to 3-mm) *T. crassiceps* cysticerci. After 30 days the mice were humanely killed and the cysticerci were recovered from the peritoneal cavity and counted. All mice were bled from the tail vein before immunization, after the second immunization and before being killed. Antibodies in the sera of the control and immunized mice were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described by Grzych et al. (1998). Briefly, plates (Costar, Corp., Cambridge, Massachusetts) were coated with 1 µg/well of SGSTF, mice sera were diluted 1:100 and goat anti-mouse IgG-horse-radish peroxidase (Boehringer, Indianapolis, Indianapolis) diluted 1:2,000 was used as a second antibody. SigmaStat software (Jandel Corp., San Rafael, California) was used for the statistical analysis.

## RESULTS

### Glutathione S-transferase from *T. solium*

Approximately 300 µg of GSTF was obtained from 10 mg of total protein from the MCE. The MCE before the GSH-sepharose column exhibited a specific GST activity of 0.11 µmol/min/mg, whereas SGSTF eluted with 5 mM GSH was 2.8 µmol/min/mg; this fraction showed an enrichment of about 25 times the original specific GST activity. SDS-PAGE analysis (Fig. 1) showed that the MCE contained more than 30 proteins. In contrast, SGSTF exhibited only 1 band of a M<sub>r</sub> = 26 kd (Fig. 1A, lane 3). Western blot analysis using rabbit antibodies against SGSTF (Fig. 1B) indicated that antibodies recognized 3 bands with M<sub>r</sub> = 80, 70, and 26 kd on the MCE before the GSH-sepharose column, and the 80 and 70 kd bands on an MCE after filtering through the GSH-sepharose column. However, the anti-SGSTF antibodies only recognized the M<sub>r</sub> = 26 kd band on SGSTF. No bands were detected by western blot in vesicular fluid of the *T. solium* metacestode using the same antibody (data not shown). Gel filtration and determination of GST activity using CDNB as substrate suggested that the activity of SGSTF has a molecular mass of 47 kd (Fig. 2).

### Enzymatic characterization of SGSTF

Table 1 shows that SGSTF has activity with CDNB, ethacrynic acid, bromosulphophthalein, hexa-2,4-dienal, and *trans*-non-2-enal; negligible activity with 1,2-dichloro-4-nitrobenzene; and no activity with 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane. Assays to detect GST activity in the vesicular fluid were negative. Moreover, SGSTF exhibits cumene hydroperoxide activity (selenium-independent activity), but does not present activity with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (selenium-dependent activity), as has been reported for other GSTs from helminths (Mannervik and Danielson, 1988). In contrast, mammalian glutathione peroxidase exhibits activity with both substrates (Wendel, 1980). The Mi-

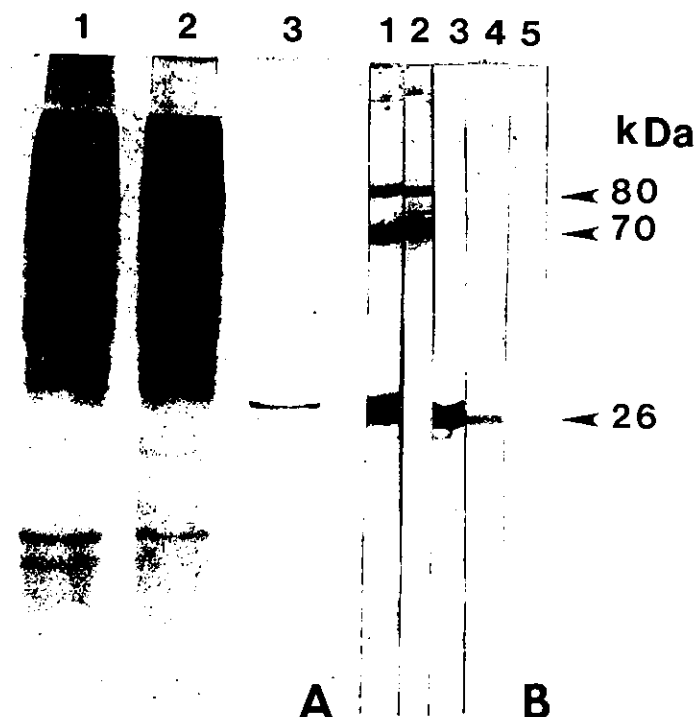


FIGURE 1. Purification of SGSTF from *Taenia solium* metacystodes. (A) Coomassie blue staining of SDS-PAGE of: (1) metacystode crude extract (MCE), (2) unbound MCE, and (3) eluted fraction from GSH-sepharose with GSH (SGSTF). (B) Western blot of fractions as in A (1-3), (4 and 5) MCE. Membranes (1-3) were incubated with anti-SGSTF antibodies, membrane (4) with specific GST26 antibodies, and membrane (5) with normal rabbit IgG.

chaelis constant ( $K_m$ ) and maximum velocity ( $V_{max}$ ) using CDNB as substrate were 4 mM and 12.5  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{mg}$ , respectively. The inhibition studies revealed that SGSTF was inhibited about 3 times more by triphenyltin chloride ( $I_{50} = 0.50 \mu\text{M}$ ) than by cibacron blue ( $I_{50} = 0.45 \mu\text{M}$ ) and bromosulphophthalein ( $I_{50} = 1.41 \mu\text{M}$ ). The  $I_{50}$  values were interpolated from graphs

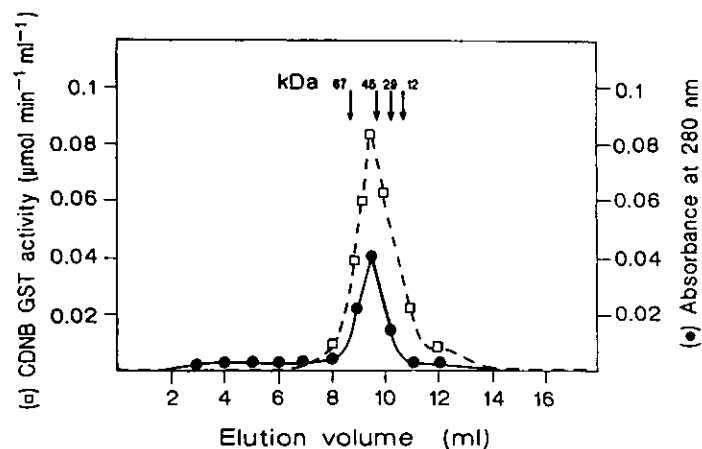


FIGURE 2. Gel filtration chromatography of GSTF. The elution profile showed a single peak, which correspond to a native  $M_r = 47$  kd. The measured GST activities in the eluted fractions and gel filtration chromatography procedure are described in the Materials and Methods. The numbers and arrows on the elution profile indicate the position of molecular weight markers used to calibrate the column.

TABLE I. Determination of specific GSH transferase activity measured with different substrates and the sensitivities to inhibitors of SGSTF.

Substrate	Enzyme activity ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)	2.8
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	0.005
Bromosulphophthalein	0.004
Ethacrynic acid	0.470
1,2-Epoxy-3-( <i>p</i> -nitrophenoxy)propane	ND*
Hexa-2,4-dienal	0.134
<i>trans</i> -Non-2-enal	0.085
Cumene hydroperoxide	0.220
Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	ND*

\* ND = not detected.

of activity remaining as a function of inhibitor concentration (Yalçin et al., 1983).

### Immunological comparison of GSTs from other species

Western blot analysis using anti-SGSTF antibodies was performed with purified GSTs from helminths and mammals. All GSTs were obtained as described in the Materials and Methods. Anti-SGSTF antibodies showed cross-reaction to the following taeniids: *T. crassiceps*, ORF strain, metacystode, *T. saginata*, *T. taeniaeformis*, and *T. solium* adult worms. The antibodies did not recognize purified GSTs from *Schistosoma mansoni* adult worms (Trematoda), and mammalian GSTs from mouse, pig, or rabbit liver. No bands appeared when normal rabbit IgG fraction was used as a control on the western blot (data not shown).

### Protection assays

Because of the difficulty in carrying out experiments in pigs and the high cross-reactivity between *T. solium* and *T. crassiceps*, we used the experimental *T. crassiceps* murine cysticercosis model to evaluate SGSTF. As summarized in Table II, all mice immunized with SGSTF presented significant reductions in parasite burdens with doses of 1 and 10  $\mu\text{g}$ . We also observed that the MCE antigens were associated with a reduced parasite burden when compared to control mice. The sera from all immunized mice had specific IgG antibodies against SGSTF, measured by ELISA. The mice treated with 10  $\mu\text{g}$  of MCE, and

TABLE II. Protection against murine *Taenia crassiceps* cysticercosis by subcutaneous immunization with SGSTF

Antigen	Antigen dose ( $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )	Number of cysticerci (n)*	% Reduction of parasites†
PBS	—	137 $\pm$ 65	—
MCE	10	29 $\pm$ 28	78.6‡
SGSTF	10	35 $\pm$ 48	74.2‡
SGSTF	1	63 $\pm$ 40	54.1‡

\* Means and standard deviations of individual parasite loads recovered after 30 days of infection with 10 cysticerci/mouse.

† % Reduction of parasites =  $100[(n \text{ control mice}) - (n \text{ immunized mice}) / (n \text{ control mice})]$ .

‡ Significant protective differences from control value ( $P < 0.05$ ).

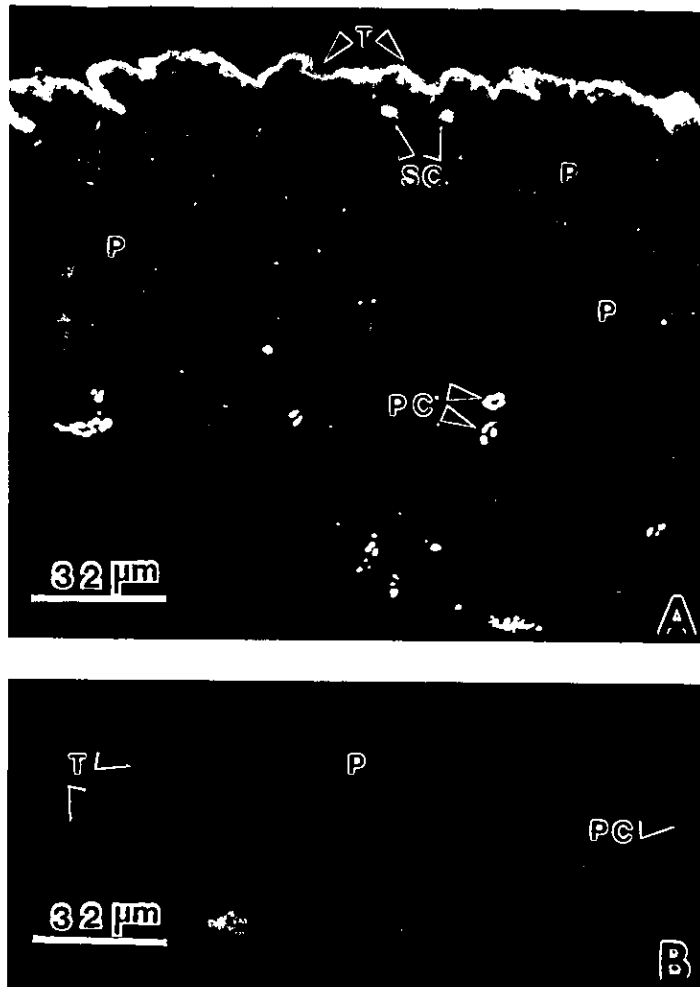


FIGURE 3. Indirect immunofluorescence of metacestode wall. Section was incubated with (A) specific anti-GST26 antibodies and (B) normal rabbit IgG. Arrows and letters point to labeled parenchyma (P), tegument (T), protonephridial (PC), and subtegumentary cytons (SC).

1 and 10  $\mu\text{g}$  of SGSTF show an absorbance of 0.04, 0.02, and 0.20, respectively, after the second immunization, with increases to 0.23, 0.41, and 0.86, respectively, before sacrifice. In contrast, control sera did not recognize any proteins in the fraction.

#### Localization of GST on *T. solium* metacestode

Immunohistochemical localization using the specific anti-GST26 antibodies is shown in Figure 3. The GST was localized in the tegument, throughout the parenchyma, and in the cytoplasm of protonephridial and tegumentary cytons. The pattern of immunofluorescent labeling shows a gradient that increases from protonephridial cytons to the surface and is highly concentrated in the tegument (Fig. 3A). No fluorescent staining was observed in control sections of metacestodes incubated with normal rabbit IgG (Fig. 3B).

#### DISCUSSION

The SGSTF eluted from a GSH-sepharose column yielded about 3% of the total protein and 95% of the total CDNB-conjugating activity from the soluble extract of *T. solium* metacestodes loaded on the column. This is in agreement with other

studies where the GSTs constitute 2–4% of cytosolic proteins in mammals and helminths (O'Leary and Tracy, 1991; Brophy and Pritchard, 1994). Filtration and activity analysis with SGSTF suggested that GST activity corresponds to a dimeric structure and SDS-PAGE showed that the monomer presents a  $M_r = 26$  kd, as do the majority of vertebrate and invertebrate GSTs, including the cestodes (Brophy, Papadopoulos et al., 1989; Brophy, Southan, and Barret, 1989; O'Leary and Tracy, 1991; Brophy and Pritchard, 1994). Western blot analysis using anti-SGSTF antibodies recognized just 1  $M_r = 26$ -kd band on the SGSTF. These results suggested that 70- and 80-kd bands recognized in *T. solium* MCE before and after filtering through GSH-sepharose are immunologically related proteins that do not bind to GSH-sepharose. In order to remove unspecific antibodies against 70- and 80-kd bands, specific antibodies against the 26-kd band that only recognized the homologous antigen in the MCE were prepared. Immunolocalization studies with specific anti-GST26 antibodies suggested that GST in *T. solium* metacestodes is synthesized in tegumentary cytons and protonephridial cells, and concentrated in the tegument, similar to what has been described in other helminths (Balloul et al., 1987; Taylor et al., 1988; Trottein et al., 1990; Creaney et al., 1995).

Enzymatic studies using the universal substrate CDNB indicated that SGSTF presented a specific activity,  $K_m$ , and  $V_{max}$  similar to the GSTs of *Echinococcus granulosus* and *Moniezia expansa* (Morello et al., 1982; Brophy, Southan, and Barret, 1989). Moreover, the activity values of SGSTF with the substrates and inhibitors tested were consistent with those reported for other GSTs from cestodes such as *Schistocephalus solidus* and *Echinococcus multilocularis* (Brophy, Papadopoulos et al., 1989; Liebau et al., 1996). SGSTF showed activity with ethacrynic acid in the range of the mammalian  $\alpha$  (0.01–1.2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) and  $\mu$  (0.08–0.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) classes and below that reported for  $\pi$ -class GSTs that present a high activity with this substrate; likewise, the activity presented with bromosulphophthalein was in the range of the mammalian  $\mu$  class (0.002–0.9  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) (Mannervik et al., 1985). SGSTF does not present activity with 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane, as it is known that GSTs in helminths do not use this substrate, in contrast to the mammalian enzyme ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  classes) (Mannervik and Danielson, 1988; Meyer et al., 1991). Also, SGSTF exhibited selenium-independent glutathione peroxidase activity (0.22  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) with cumene hydroperoxide and did not present selenium-dependent glutathione peroxidase activity with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Again, this activity is within the range of mammalian  $\mu$ -class GSTs (0.1–0.7  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) (Mannervik et al., 1985). Inhibition assays for SGSTF showed that the inhibition range of triphenyltin chloride is between the mammalian  $\alpha$  (0.3–30  $\mu\text{M}$ ) and  $\mu$  (0.04–0.5  $\mu\text{M}$ ) classes (Mannervik et al., 1985). Inhibition presented by cibacron blue and bromosulphophthalein was in the range reported for the mammalian  $\mu$  class (0.05–0.7  $\mu\text{M}$  and 0.5–10  $\mu\text{M}$ ), respectively.

The enzymatic properties of SGSTF indicated few similarities with the mammalian  $\alpha$ -class GSTs, and significant differences with the  $\pi$  class and  $\theta$  class (enzyme that is not retained by GSH-affinity matrices), indicating that GST activity found in SGSTF is more related to the mammalian  $\mu$ -class GSTs (Mannervik et al., 1985; Meyer et al., 1991). The activity shown with cumene hydroperoxide and the ability of SGSTF

to conjugate hexa-2,4-dienal and *trans*-non-2-enal (products of lipid peroxidation) suggested that it may be involved in the detoxification of lipid hydroperoxides produced by the immune response and other host metabolic routes as has been previously reported from other helminths (Brophy, Papadopoulos et al., 1989; Brophy et al., 1990; Walker et al., 1993). The properties explored here could help to design new drugs against cysticercosis and taeniosis.

In western blot assays, anti-SGSTF antibodies cross-reacted with GSTs purified by GSH-sepharose of several *Taenia* species (*T. saginata* adults, *T. taeniaeformis* adults, *T. crassiceps* metacystode, including *T. solium* adults). In contrast, these antibodies did not recognize purified GST fractions from *S. mansoni* (Trematoda) or from mammalian livers (mouse, rabbit, and pig). These results point to homology between *Taenia* spp. GSTs, results that are similar to those reported for *S. mansoni* by Taylor et al. (1988).

Western blot and GST activity analysis showed that this enzyme was not present in vesicular fluid; in contrast, the enzyme was abundant in the bladder wall, especially in the tegument. These observations and the enzymatic properties described before suggest that this enzyme is probably participating in the parasite defense process against exogenous toxic compounds.

Interestingly, the SGSTF was capable of inducing a significant reduction in the parasite load in experimental murine cysticercosis. The parasite load in mice immunized with SGSTF versus nonimmunized mice suggests that immunity to this enzyme interferes with larval parasite growth in mice. Our data are in agreement with other studies using the same murine model to evaluate other candidate antigens (Sciutto et al., 1990; Valdez et al., 1994). It would be interesting to explore if the immune response generated by this antigen interferes with the transformation from oncosphere to cysticercus in an experimental model. Although we found specific IgG antibodies against SGSTF in the sera of immunized animals, we did not explore the role that these antibodies play in protection. Again, our results are in agreement with other reports that evaluate the GST as an antigen in several models (Pierce and Capron, 1994).

The identification of the 26-kd band in both *T. solium* metacystodes and adults with anti-SGSTF antibodies suggests that this enzyme is probably expressed in all stages of the parasite. In addition, the absence of immunological cross-reactivity with mammalian GSTs, especially the pig (an intermediate host in the life cycle), as well as the effect in reducing the number of parasites in the murine model, make this enzyme an interesting target for vaccination trials against porcine cysticercosis.

The results presented here describe the first report of a GST enzyme from *Taenia* spp. and suggest that this enzyme could play an important role in the physiology and parasite defense mechanisms against toxic host molecules. Further studies are needed to understand the biological role of GST in *T. solium*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Adelaida Díaz for her excellent technical assistance. We thank Kaethe Willms for reviewing the manuscript. *Schistosoma mansoni* adult worms and *Taenia crassiceps*, ORF strain, metacystodes were a gift from William Casten at Harvard University and Edda Sciutto at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, respectively. This work was

supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT-UNAM contract IN201795) and from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (contract M9308-3326).

#### LITERATURE CITED

- ACEVEDO-HERNÁNDEZ, A. 1982. Economic impact of porcine cysticercosis. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*, A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (eds.). Academic Press, New York, p. 63-67.
- ALUIJA, A. 1982. Frequency of porcine cysticercosis in México. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*, A. Flisser, K. Willms, J. P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (eds.). Academic Press, New York, p. 47-50.
- BALLOUL, J. M., J. M. GRZYCH, R. J. PIERCE, AND A. CAPRON. 1987. A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* 138: 3448-3453.
- BERGQUIST, N. R. 1995. Controlling schistosomiasis by vaccination: A realistic option? *Parasitology Today* 11: 191-194.
- BROPHY, P. M., AND J. BARRET. 1990. Glutathione transferase in helminths. *Parasitology* 100: 345-349.
- , P. CROWLEY, AND J. BARRET. 1990. Detoxification reactions of *Fasciola hepatica* cytosolic glutathione transferases. *Molecular and Biochemical Parasitology* 39: 155-162.
- , A. PAPADOPOULOS, M. TOURAKI, B. COLES, W. KÖRTING, AND J. BARRET. 1989. Purification of cytosolic glutathione transferase from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): Interaction with anthelmintics and products of lipid peroxidation. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36: 187-196.
- , AND D. I. PRITCHARD. 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferase: An update on their potential as targets for immunotherapy. *Experimental Parasitology* 79: 89-96.
- , C. SOUTHAN, AND J. BARRET. 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochemical Journal* 262: 939-946.
- CREANEY, J., G. L. WUIFFELS, J. L. SEXTON, R. M. SANDEMAN, T. W. SPITHILL, AND J. C. PARSONS. 1995. *Fasciola hepatica*: Localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology* 81: 106-116.
- DEL BRUTTO, O. H., AND J. SOTELO. 1988. Neurocysticercosis: An update. *Reviews of Infectious Diseases* 10: 1075-1087.
- DÍAZ-CAMACHO, S., A. CANDIL-RUIZ, M. URIBE-BELTRÁN, AND K. WILLMS. 1990. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 583-586.
- DUNBAR, B. S., AND E. D. SCHWOEBEL. 1990. Guide to protein purification. Section XI. Immunological procedures. Preparation of polyclonal antibodies. *Methods in Enzymology* 182: 663-670.
- GEMMELL, M., Z. MATYAS, Z. PAWLOSKI, E. SOULSBY, C. LARRALDE, G. S. NELSON, AND B. ROSICKY. 1985. Guidelines for surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. VPH/83.49. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 207 p.
- GRZANNA, R. 1982. Light microscopic immunocytochemistry with fixed, unembedded tissues. In *Techniques in immunocytochemistry*, G. R. Bullock and P. Petrusz (eds.). Academic Press, London, U.K., p. 183-200.
- GRZYCH, J. M., J. DE BONT, J. LIU, J. L. NEYRINCK, J. FONTAINE, J. VERCRUYSE, AND A. CAPRON. 1998. Relationship of impairment of *Schistosoma* 28-kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma bovis* 28-kilodalton GST. *Infection and Immunity* 66: 1142-1148.
- HABIG, W. H., AND W. JAKOBY. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods in Enzymology* 77: 398-405.
- , M. J. PABST, AND W. B. JAKOBY. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- IVANOFF, N., N. PHILLIPS, A. M. SCHACHT, C. HEYDARI, A. CAPRON, AND G. RIVEAU. 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated Sm 28 kDa glutathione S-transferase. *Vaccine* 14: 1123-1131.

- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- LARRALDE, C., A. PADILLA, M. HERNÁNDEZ, T. GOVEZENSKY, E. SCIUTTO, G. GUTIÉRREZ, R. TAPIA-CONYER, B. SALVATIERRA, AND J. SEPÚLVEDA. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* **34**: 197–210.
- LIEBAU, E., V. MÜLLER, R. LUCIUS, R. D. WALTER, AND K. HENKLE-DÜHRSE. 1996. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **77**: 49–56.
- MANNERVIK, B., P. ALIN, C. GUTHENBERG, H. JENNSON, T. M. KALIM, M. WAPHOLM, AND H. JORNVALL. 1985. Identification of 3 classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 7202–7206.
- , AND V. H. DANIELSON. 1988. Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **23**: 283–328.
- MEYER, D. J., B. COLES, S. E. PEMBLE, K. S. GILMORE, G. M. FRASER, AND B. KETTERER. 1991. Theta, a new class of glutathione S-transferase purified from rat and man. *Biochemistry Journal* **274**: 409–414.
- MORELLO, A., Y. REPETTO, AND A. ATIAS. 1982. Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Compendium Biochemical Physiology* **72B**: 449–452.
- O'LEARY, K. A., AND J. W. TRACY. 1991. *Schistosoma mansoni*: Glutathione S-transferase catalyzed detoxification of dichlorvos. *Experimental Parasitology* **72**: 355–361.
- PAGLIA, D. E., AND W. N. VALENTINE. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **70**: 158–169.
- PIERCE, R. J., AND A. CAPRON. 1994. Development of a recombinant vaccine against schistosomiasis. In *Modern vaccinology*. F. Kurstak (ed.). Plenum Medical Book Company, New York, p. 357–380.
- PRECIOUS, W. Y., AND J. W. BARRETT. 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today* **5**: 156–160.
- RITTER, K. 1991. Affinity purification of antibodies from sera using polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes as coupling matrices for antigens presented by autoantibodies to triosephosphate isomerase. *Journal of Immunology Methods* **137**: 209–215.
- SARTI, E., P. M. SCHANTZ, A. PLANCARTE, M. WILSON, I. O. GUTIERREZ, A. S. LOPEZ, J. ROBERTS, AND A. FLISSER. 1992. Prevalence and risk factor for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**: 677–684.
- SCIUTTO, E., G. FRAGOSO, L. TRUEBA, D. LEMUS, R. M. MONTOYA, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, G. TAPIA, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* **12**: 687–696.
- SEXTON, J. L., A. R. MILNER, M. PANACCIO, J. WADDINGTON, G. WIFFELS, D. CHANDLER, C. THOMPSON, L. WILSON, T. W. SPITHILL, G. F. MITCHELL, AND N. J. CAMPBELL. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology* **145**: 3905–3910.
- TAYLOR, J. B., A. VIDAL, G. TORPIER, D. J. MEYER, C. ROITSCH, J. M. BALLOUL, C. SOUTHAN, P. SONDERMEYER, S. PEMBLE, J. P. LECOCQ, A. CAPRON, AND B. KETTERER. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *European Molecular Biology Organization Journal* **7**: 465–472.
- TOWBIN, H., T. STAEGELIN, AND J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 4350–4354.
- TROTTEIN, F., M. P. KIENY, C. VERWAERDE, G. TORPIER, R. J. PIERCE, J. M. BALLOUL, D. SCHITT, J. P. LECOCQ, AND A. CAPRON. 1990. Molecular cloning tissue distribution of a 26 kilodalton *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemistry Parasitology* **41**: 35–44.
- TSANG, W., AND M. WILSON. 1995. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitology Today* **11**: 124–126.
- VALDEZ, F., T. HERNÁNDEZ, T. GOVEZENSKY, G. FRAGOSO, AND E. SCIUTTO. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of Parasitology* **80**: 931–936.
- WALKER, J., P. CROWLEY, A. MOREMAN, AND J. BARRET. 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Biochemistry Parasitology* **61**: 255–264.
- WENDEL, A. 1980. *Enzymatic basis of detoxification*. Academic Press, New York. 333 p.
- YALÇIN, S., H. JENSON, AND B. MANNERVIK. 1983. A set of inhibitors for discrimination between the basic isozymes of glutathione transferase in rat liver. *Biochemistry and Biophysics Research Communication* **114**: 829.