

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA GLUTATIÓN
S-TRANSFERASA DE 26.5 kDa DE *Taenia solium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

MÉXICO, D.F.



JUNIO DEL 2004



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.

F. 6. 13.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ACUSTIN PLANCARTE
CRESPO

FECHA: 7 de Junio del 2004

FIRMA: Plancarte

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de abril del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) **Agustín Plancarte Crespo**, con número de cuenta 65006470 y número de expediente 32509, con la tesis titulada: "**Purificación y caracterización bioquímica de la glutatión S-transferasa de 26.5 kDa de Taenia solium**", bajo la dirección del (la) **Dr. Abraham Landa Piedra**.

Presidente:	Dra. Aline Schunemann de Aluja
Vocal:	Dr. Juan Luis Rendón Gómez
Vocal:	Dr. Guillermo Mendoza Hernández
Vocal:	Dr. José Luis Molinari Soriano
Secretario:	Dr. Abraham Landa Piedra
Suplente:	Dra. Kaethe Willms Manning
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de mayo de 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de biología molecular de parásitos, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

El comité tutorial de evaluación semestral estuvo conformado por los doctores: Abraham Landa Piedra, Juan Luis Rendón Gómez y Luis Felipe Jiménez García.

El trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto 27556-M.

Un especial agradecimiento al Dr. Juan Luis Rendón Gómez por su valiosa contribución para la realización de este trabajo.

Dedicatorias:

A mi esposa, Maria

Mis hijos Maria y Agustín

A la memoria de mis padres

INDICE GENERAL

Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1. Ciclo biológico	5
1.2. Enfermedad en el hombre	5
1.3. Cisticercosis porcina	9
1.4. Distribución geográfica	10
1.5. Inmunología de la cisticercosis	11
1.6. Tratamiento farmacológico de la neurocisticercosis	15
1.7. Praziquantel (Pzq)	15
1.8. Albendazole (Abz)	17
1.9. Vacunación contra la cisticercosis	18
1.10. Evasión inmune	20
1.11. Glutación S-trasferasas (GSTs)	24
1.12. Enzimología	30
2. Objetivos	31
3. Metas	31
4. Material y métodos	32
4.1. Reactivos químicos	32
4.2. Purificación de la enzima	32
4.2.1. Obtención de los parásitos	32
4.2.2. Obtención del extracto crudo del metacestodo (ECM)	33
4.2.3. Obtención de la fracción de GST de <i>T. solium</i> (SGSTF)	33
4.2.4. Obtención de la SGST _{26.5} y de su punto isoeléctrico (pI)	34

4.3. GST en líquido vesicular de cisticerco (LVC)	36
4.4. Determinación proteica y análisis por PAGE	36
4.5. Determinación de los pesos moleculares	36
4.6. Ensayos enzimáticos	37
4.6.1. Condiciones experimentales para los diversos sustratos	38
4.6.2. Determinación del pH óptimo	39
4.6.3. Estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH	40
4.6.4. Estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas	41
4.6.5. Determinación de las constantes catalíticas	41
4.7. Determinación de la I_{50}	43
4.7.1. Concentraciones de inhibidores	43
4.7.2. Tipo de inhibición y constantes inhibitorias (K_i)	44
4.8. Estructura oligomérica	45
4.9. Cinéticas de estado estacionario en enzimas con mas de un sustrato	46
5. Resultados	47
5.1. Purificación de la enzima	47
5.2. Determinación del pI	48
5.3. GST en líquido vesicular de cisticerco (LVC)	48
5.4. Análisis electroforético	49
5.5. Determinación de los pesos moleculares y composición de subunidades	49
5.6. Estructura oligomérica	50
5.6.1. Parámetros inhibitorios para evaluar la VF frente a la [I]	51
5.7. Especificidad de sustrato	51
5.7.1. Actividades específicas de $SGST_{26.5}$ con diversos sustratos	52
5.7.2. Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la $SGST_{26.5}$	52

5.8. Efecto de la temperatura sobre la $SGST_{26.5}$	53
5.9. Determinación de las constantes catalíticas	53
5. 10. Estudios de inhibición (I_{50} , K_i y tipo de inhibición)	54
5.11. Cinéticas de estado estacionario en enzimas con mas de un sustrato	55
6. Discusión	56
7. Conclusiones	63
8. Bibliografía	63
9. Articulo publicado	83

Resumen

Las glutatión S-transferasas (GSTs) son las principales enzimas que participan en la fase II de detoxificación en los organismos aerobios. Los cisticercos de *Taenia solium* en humanos y cerdos están expuestos a diversos productos tóxicos. El objetivo del trabajo fue purificar y caracterizar a la isoforma de GST de cisticercos de *T. solium* de 26.5 kDa (SGST_{26.5}) para obtener sus parámetros cinéticos. Esta información, permitirá explicar el funcionamiento de la enzima. La SGST_{26.5} se purificó a homogeneidad por procedimientos bioquímicos. Esta enzima tuvo un pI = 7.07 y un peso molecular nativo de 60 kDa con subunidades de 26.5 kDa. La actividad óptima de la SGST_{26.5} se desarrolló a pH de 6.5-7.2 en un rango de 10-42 °C. Presentó una actividad específica de 78, 7.1, 6.6 y 0.7 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), 1, 2-dicloro 4 nitrobenzono, hexa-2,4 dienal, trans-non-2-enal respectivamente pero no presentó actividad para hidroperóxidos ni hidroperóxidos lipídicos. La eficiencia catalítica de SGST_{26.5} para sus principales sustratos fueron $K_{\text{cat}} / K_{\text{m}} (\text{CDNB}) = 2.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{\text{cat}} / K_{\text{m}} (\text{GSH}) = 4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y su V_{max} para GSH y CDNB = 74 y 77 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectivamente. La enzima se inhibió de manera nocompetitiva por el azul de cibacrón, bromuro de sulfaleína y el trifeniltin cloruro. Estudios de inhibición simple en función de la concentración del inhibidor mostraron que la enzima tiene una estructura homodimérica. Los análisis de sistemas de estado estacionario de enzimas multireactantes indicaron que la SGST_{26.5} desarrolla un mecanismo catalítico secuencial ordenado. Esta información puede ser potencialmente útil para apoyar el desarrollo tanto de estrategias inmunológicas como farmacológicas con la finalidad de controlar a esta parasitosis.

Abstract

Glutathione S-transferases are major phase II detoxification enzymes. *Taenia solium*, a parasite of humans and pigs is exposed to toxic products. The aim of this work was to purify and characterize a *T. solium* glutathione S-transferase isoform of 26.5 kDa (SGST_{26.5}) in order to obtain its kinetic parameters. This information, is useful to understand how the enzyme works. Homogeneous SGST_{26.5} was obtained by a simple purification procedure. SGST_{26.5} showed a pI of = 7.07, and a native molecular weight of 60 kDa with 26.5 kDa subunits. The optimum activity for SGST_{26.5} was found at pH 6.5-7.0 in the range 10-42°C. SGST_{26.5} had a specific enzyme activity of 78, 7.1, 6.6, and 0.7 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ with CDNB, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, 2,4-hexadienal and *trans*-2-nonenal as substrates, respectively. It also had a $K_{\text{cat}} / K_{\text{m}} (\text{CDNB}) = 2.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{\text{cat}} / K_{\text{m}} (\text{GSH}) = 4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and V_{max} for GSH and CDNB = 74 and 77 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ respectively. SGST_{26.5} was inhibited in a noncompetitive form by cibacron blue, bromosulfophthalein and triphenyltin chloride. Inhibition studies as a function of inhibitor concentration show that the enzyme is a homodimer. Steady-state kinetics of multireactant enzymes analysis show that it follows an ordered sequential mechanism. This information can be potentially useful to support the development of both the pharmacological and immunological strategies in order to control *T. solium*.

INTRODUCCIÓN

Ciclo biológico

El cestodo *Taenia solium* es un helminto plano, segmentado y parásito obligado. Durante su vida presenta tres formas o estadios morfológicamente diferentes muy dependientes de su hábitat (1) (Fig. 1). El huevo de *T. solium* cuyo metabolismo es mínimo y prácticamente no sufre cambios morfológicos, puede permanecer en esta forma por meses, inclusive a bajas temperaturas (2). Esta forma es infectiva por vía oral, tanto para el hombre como para el cerdo, y ocasionalmente para el perro. Una vez en el aparato digestivo de sus hospederos, el huevo de *T. solium* es descascarado por los jugos gástricos en el intestino, el embrión se activa y se libera de su membrana. Mediante movimientos ameboides y utilizando sus ganchos, la oncosfera liberada penetra la mucosa intestinal pudiendo alcanzar tanto el torrente sanguíneo como los vasos linfáticos; de esta forma puede distribuirse en cualquier tejido y probablemente por su crecimiento se desarrolla en tejidos intersticiales, donde continúa su desarrollo al estadio de metacestodo (cisticerco) (3). Los cisticercos ocasionan la enfermedad denominada cisticercosis que, dependiendo de su ubicación, número de parásitos, etc, pueden causar diversos problemas de salud e inclusive la muerte (4). Los cisticercos comúnmente miden de 5 a 10 mm de diámetro pero en las cavidades naturales del sistema nervioso central (SNC) del hombre pueden alcanzar varios centímetros (5). En el humano, la cisticercosis dentro de la que se incluye la neurocisticercosis (cisticercos en el SNC), es una aberración biológica por tener como consecuencia el bloquearse el ciclo biológico normal de *T. solium*. En contraste, la cisticercosis en el cerdo le permite al parásito continuar al

siguiente estadio de desarrollo (6). El hombre, al comer carne de cerdo parasitada con cisticercos y parcialmente cruda desarrollará la forma adulta del parásito o la tenia. La teniasis existe exclusivamente en el intestino del hombre. Cada cisticerco es una vesícula que alberga al escólex armado; por efecto de los jugos gástricos el escólex evagina de la vesícula y con su doble corona de ganchos y cuatro ventosas se adhiere a la mucosa intestinal (7). Posteriormente el escólex crece en segmentos o proglótidos, a partir del cuello llegando a alcanzar varios metros de longitud. En los últimos proglótidos grávidos existen cientos de nuevas formas infectivas (huevos) del parásito. El individuo teniásico libera al día, junto con el excremento, uno o varios segmentos de *T. solium* contaminando el medio ambiente, particularmente si defeca al aire libre al ras del suelo. Los huevos de *T. solium* pueden llegar a los alimentos y/o bebidas y ser ingeridos de esta forma por sus huéspedes, cerrando de esta manera el ciclo biológico de este cestodo.

Enfermedad en el hombre

La historia natural de la cisticercosis no está comprendida totalmente hasta nuestros días, pero gracias a los estudios imagenológicos es posible observar la evolución del parásito en el sistema nervioso central del huésped. La larva que se encuentra en el cerebro mide de uno a dos centímetros de diámetro; se halla dentro de un líquido transparente, rodeado por una membrana fina, translúcida y blanquecina, a esta primera fase evolutiva se le llama fase vesicular (8). Después de varios meses, o años, el parásito empieza a presentar cambios degenerativos: el líquido vesicular se torna de aspecto coloidal gelatinoso, la pared se engrosa, rodeada de un infiltrado inflamatorio

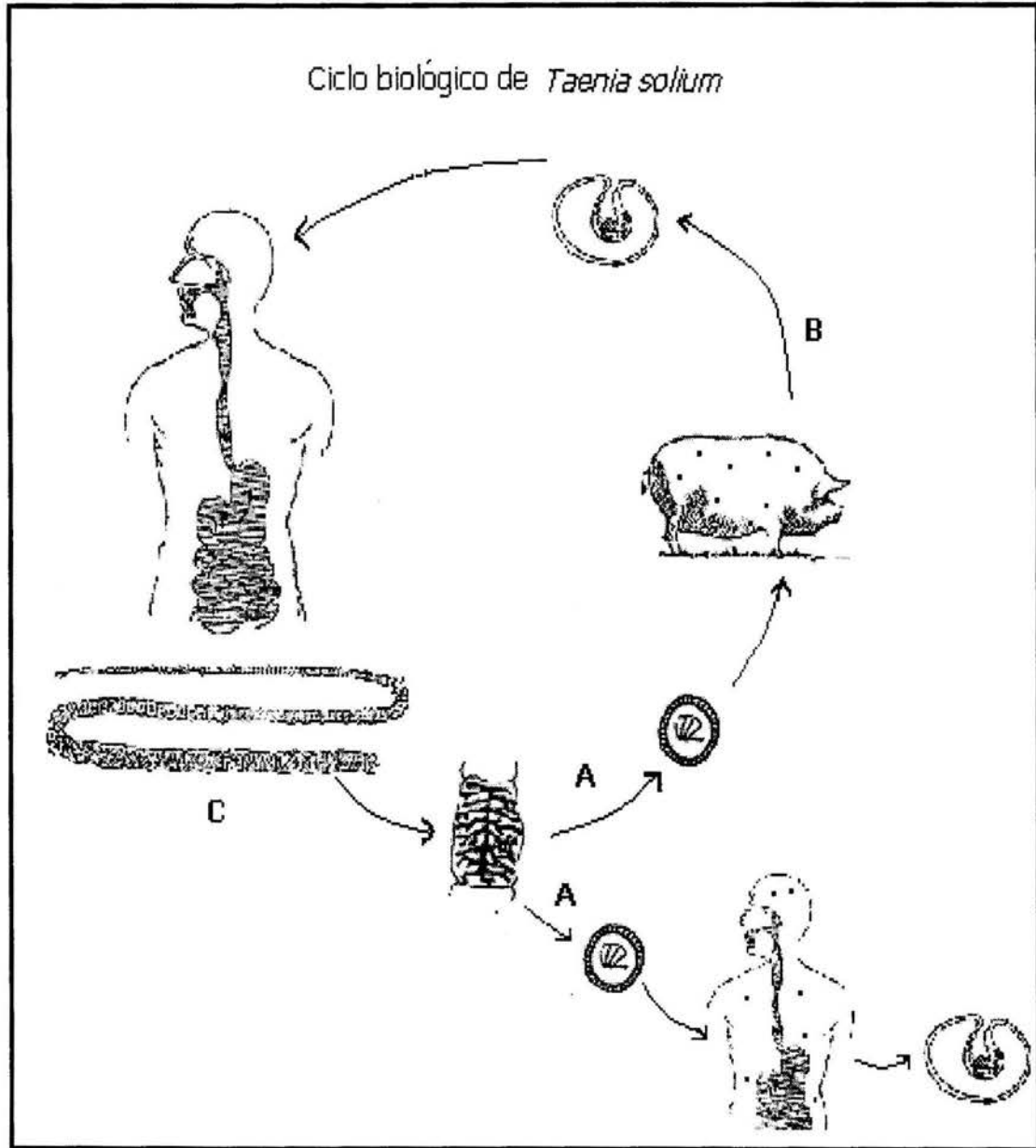


Fig. 1. Ciclo biológico de *Taenia solium*. A) Estadio de huevo, infeccioso para ambos hospederos. B) Cisticerco infeccioso solamente para el humano. C) Fase adulta, productora de los huevos del cestodo.

compuesto principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos; esta fase se denomina vesicular-coloidal. Posteriormente, el quiste se reduce de tamaño, siendo progresivamente remplazado por tejido granulomatoso, lo que corresponde al estado granular-nodular. Diversos autores han sugerido que en estas últimas dos etapas se desencadena la sintomatología del paciente, debido a una mayor presencia de la respuesta inflamatoria. Finalmente, el parásito muerto es reabsorbido, sin dejar rastro, o calcificado en forma permanente. (9, 10).

Las manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis (NC) son inespecíficas, ya que cualquier problema de salud del sistema nervioso central, puede presentar los mismos síntomas. Los síntomas clínicos de la cisticercosis extracerebral, cuando se presentan, están de acuerdo al tejido afectado. Un diagnóstico acertado para establecer los casos de cisticercosis se basa en estudios clínicos, imagenológicos, inmunológicos y epidemiológicos. (11).

La cisticercosis puede presentarse en la mayoría de los tejidos de nuestro cuerpo (12); la cisticercosis diseminada es aquella que afecta a los músculos, tejido subcutáneo y conectivo, es poco frecuente (1%) y presenta una baja carga parasitaria (13). La forma muscular es diagnosticada prácticamente en forma fortuita, a excepción de la forma diseminada, se sabe que puede ocasionar dolor, atrofia muscular y debilidad (17). La pulmonar puede presentar problemas de diagnóstico diferencial para los neumólogos (14). La localización subcutánea se caracteriza por presentar nódulos cutáneos y es la más común y mejor diagnosticada de las del tipo diseminado (13).

La cisticercosis ocular también es poco frecuente (0.1%) (15). Los cisticercos pueden ubicarse tanto en las estructuras anexas al ojo como en sus cavidades.

La cisticercosis extraocular puede confundirse con tumores de crecimiento lento e inflamación local. La cisticercosis intraocular ocasiona un daño mayor que la anterior, por afectar directamente tanto la capacidad visual como la pérdida anatómica de las estructuras del ojo debido a la intensidad de la respuesta inflamatoria (15).

La NC, en los casos con sintomatología, como se mencionó anteriormente, desarrolla una variedad de cuadros clínicos comunes a diversas patologías del SNC e inclusive puede cambiar durante la evolución de la enfermedad (16). Los signos clínicos se deben principalmente a efectos de compresión, irritación y destrucción de los tejidos por los parásitos y la respuesta inflamatoria. La NC parenquimatosa esta asociada principalmente con síntomas como crisis convulsivas y dolores de cabeza. Las crisis convulsivas pueden ser en una sola ocasión o recurrentes, así como focales o generalizadas. Los dolores de cabeza pueden ser principalmente del tipo migraña, tensión continua y menos frecuentes los de gran intensidad, presagiando estos últimos, un cuadro de hipertensión intracraneal. Es poco común observar los cuadros de déficit neurológicos focales y una variedad de manifestaciones psiquiátricas y de demencia. Los pacientes que sufren de NC extra parenquimatosa –cisticercos presentes en los ventrículos y / o en las subaracnoides– (17), presentan síntomas relacionados a la hipertensión intracraneal y demencia. Comúnmente desarrollan papiloedema, dificultad para el aprendizaje, somnolencia y pérdida de la conciencia. Por otro lado, los parásitos presentes en los ventrículos pueden inclusive desarrollar una gran cantidad de membranas (cisticercos racemosos), que se llegan a fusionar con los tejidos del hospedero produciendo una respuesta inflamatoria de tal magnitud que frecuentemente termina con la

vida del paciente (5). Comúnmente, la mayoría de los pacientes presentan uno, o pocos parásitos en el sistema nervioso central, sin embargo existe un pequeño grupo dentro del espectro de esta enfermedad, que es infectado con un número considerable de parásitos y como consecuencia desarrolla una sintomatología particular. (17). Del Bruto y col establecen una clasificación, con base en, diferentes síndromes que agrupan a estos casos (18). Así se tiene al síndrome encefalítico cisticercoso, éste se debe a la presencia de múltiples cisticercos en el parénquima cerebral, es considerado por algunos autores como la fase invasora al cerebro por los embriones, ya que en muchos pacientes se informa de la aparición de los signos clínicos con poca anterioridad al diagnóstico. La severidad de los síntomas esta relacionada con el número de parásitos, que frecuentemente son varias decenas, pudiendo desencadenar reacciones inflamatorias con desenlaces fatales. También se ha observado, una mayor susceptibilidad a este síndrome en pacientes jóvenes del sexo femenino. Debido a la hipertensión intracraneal, frecuente en este tipo de padecimiento, es común encontrar atrofia óptica por papiloedema, parálisis del tercero y sexto nervio craneal, hipereflexia profunda del tendón y el síndrome de Babinski, así como crisis convulsivas y fuertes dolores de cabeza. Otro síndrome comprendido en la clasificación, es el multi-infectado no encefalítico cisticercoso, su principal característica es presentar una mínima respuesta inflamatoria, no obstante la infección masiva que sufre el cerebro. En este síndrome no se ha encontrado una predominancia por el sexo o la edad. Sus manifestaciones clínicas son ligeras, crisis convulsivas y súbitas anormalidades neurofisiológicas, no existe o es muy superficial la hipertensión cerebral. Una elevada correlación existe en pacientes con este síndrome y la

presencia de la fase adulta del parásito (19). El último síndrome de la clasificación, es el denominado cisticercosis diseminada, se caracteriza por la presencia de los cisticercos en el mismo paciente en el músculo, tejido subcutáneo, ojos, corazón y cerebro. Afortunadamente, son escasos los casos de este tipo que se han reportado, siendo ubicados principalmente en la India y China. Dos características principales están asociadas claramente con este síndrome: el existir al mismo tiempo los cisticercos vivos y la ausencia de una respuesta inflamatoria contra ellos, sin embargo se desconocen las causas que originan estas dos condiciones. Las principales manifestaciones clínicas son: pseudohipertrofia muscular con dolor muscular, crisis convulsivas, demencia. La pseudohipertrofia muscular en ocasiones es acompañada con un cuadro febril y una irritación cutánea. No obstante, la infestación masiva en el cerebro, no existen déficit neurológicos focales y la hipertensión cerebral es rara.

Cisticercosis porcina

El cerdo es el hospedero intermediario de *T. solium*; su condición natural y su uso en zonas rurales como animales dedicados a la limpieza del medio ambiente, son aspectos básicos que contribuyen a la continuidad del ciclo biológico de este parásito (20). El cerdo adquiere la cisticercosis por ingestión de los huevos de *T. solium* y al igual que en el humano, los parásitos pueden encontrarse en cualquiera de sus tejidos. Sin embargo hay diferencias parasitarias, como su preferencia en su ubicación y tamaño, entre ambos hospederos. La localización de los cisticercos en el cerdo es preferentemente muscular, así como, frecuente la forma masiva; además, los cerdos

aparentemente no desarrollan sintomatología alguna (21), excepto, en casos aislados, donde se ha observado hipersensibilidad en el hocico, parálisis de la lengua y convulsiones epileptiformes; pero la vida útil del cerdo suele ser demasiado corta como para que puedan observarse manifestaciones neurológicas. El tamaño de los cisticercos del cerdo es relativamente homogéneo (5 - 10 mm de diámetro) y nunca evolucionan a cisticercos del tipo racemoso (22).

La cisticercosis porcina ha sido estudiada desde diversos enfoques, proporcionando información que no se podría obtener de los pacientes con cisticercosis. Las publicaciones referentes a la histopatología de la cisticercosis porcina, permitieron clasificar la evolución de la destrucción del parásito en forma natural, desde el cisticerco sin daño hasta su calcificación (22). Infecciones experimentales en el cerdo mostraron que se requiere de tan solo 10 huevos de *T. solium* para lograr el establecimiento de 2 cisticercos viables (23). De los mismos estudios se establece que la respuesta inmunológica es de corta duración, desapareciendo de la circulación los anticuerpos específicos contra el parásito poco tiempo después de eliminar a los cisticercos en forma natural y/o por quimioterapia. Además, se sabe que la inmunidad concomitante para *T. solium* es poco efectiva o duradera al lograrse en algunos cerdos reinfecciones con cierta facilidad (24).

Distribución geográfica

El complejo cisticercosis-teniasis causado por *T. solium* es una zoonosis con una distribución que abarca principalmente a países en vías de desarrollo (25). En estos sitios las condiciones de salud pública e inspección veterinaria son

limitadas, permitiendo el establecimiento endémico de esta parasitosis. Se ha informado de la presencia de la neurocisticercosis en Latinoamérica (26), con una incidencia de hasta el 3.6% en México (27), del 3.15% en Brasil y del 1.3 – 11.3 en Ecuador (28). En Europa central y del Este, existió algunas décadas atrás (29, 30), no así, en el Lejano Oriente (13); y en países como Madagascar, Camerún, Congo del Este y Sudáfrica donde hay una incidencia del 1-3 % (31). Las creencias religiosas, los hábitos alimenticios de comer carne de cerdo semicruda así como una deficiente infraestructura sanitaria, contribuyen en estos países africanos a padecer esta zoonosis en forma endémica.

También se han observado diversos casos de este problema de salud en comunidades musulmanas y judías donde está prohibido consumir carne de puerco (32). Además de un resurgimiento en el número de casos de neurocisticercosis en países desarrollados debido principalmente a la inmigración. Tan solo en los Estados Unidos se han diagnosticado 1000 nuevos casos de neurocisticercosis cada año (33). La Organización Mundial de la Salud estimó que a mediados de 1990 existían aproximadamente 50 millones de personas en el mundo afectadas por neurocisticercosis, de las cuales 50,000 morirán a consecuencia de la neurocisticercosis (34).

Inmunología de la cisticercosis

Dentro de los temas de investigación desarrollados con *T. solium*, el del diagnóstico inmunológico de la cisticercosis ha sido el más documentado. La agresividad de esta enfermedad aunada a la sintomatología ha sido la razón fundamental del gran número de publicaciones desde principios del siglo 20. (35, 36) Así, Moses en Brasil, por primera vez, estandarizó la técnica de

fijación de complemento en búsqueda de anticuerpos específicos con muestras de pacientes con neurocisticercosis (Moses). Posteriormente, en México el Dr. Nieto la utilizó en 5,000 pacientes psiquiátricos y obtuvo un 0.6% de positividad, usando la misma técnica (37). La hemaglutinación pasiva e inmunofluorescencia tuvieron una limitada aportación en este terreno, sin lugar a dudas por su pobre sensibilidad y sofisticado sistema de evaluación respectivamente (38, 39). Dentro de las técnicas de precipitación la inmunoelectroforesis (IEF) brindó por varios años un servicio básico y aplicado aceptable, no obstante su baja sensibilidad y largo proceso (40). Hallazgos como el antígeno B, identificado por IEF como el más inmunodominante frente al suero de pacientes con cisticercosis, resultó ser años después, la paramiosina de *T. solium* (41). Con la IEF se inició la caracterización de la respuesta inmune humoral de los paciente con cisticercosis y también se abrió el camino en los estudios seroepidemiológicos en *T. solium* (42). El advenimiento de las técnicas inmunoenzimáticas permitió superar el problema de la baja sensibilidad de la IEF (43). Posteriormente, el interés por tener antígenos específicos de *T. solium* condujo a purificar componentes glicoproteicos del parásito por cromatografía de afinidad (43). La fracción enriquecida en glicoproteinas, denominada LL-GP resultó estar formada de 7 diferentes antígenos de diversos pesos moleculares. Al emplear estos antígenos en la técnica de inmunoelectrotransferencia, se obtuvo una sensibilidad del 94% y especificidad del 100% (44).

La respuesta inmune humoral de los pacientes con cisticercosis esta caracterizada por responder principalmente con anticuerpos de la clase IgG. Esta inmunoglobulina dominante se puede encontrar en suero, líquido

cefalorraquídeo y saliva. Esta observación está relacionada muy probablemente con el carácter crónico de la enfermedad. Se ha observado también, que la intensidad de la respuesta está relacionada con la carga parasitaria, así, la sensibilidad del 94% que se obtiene con la fracción LL-GP es en los casos donde existe más de un cisticerco, contrastando con un 28% en aquellos con un solo quiste (45). Similarmente, no existen anticuerpos o se encuentran en muy baja concentración en los pacientes con quistes calcificados. Por otro lado, aunque la mayoría de los pacientes con cisticercosis responden al antígeno GP42-39, de la fracción LL-GP, ó al antígeno B de un extracto crudo de cisticercos, se ha demostrado también, que pueden responder a otras decenas de antígenos diferentes, presentes en estas fracciones parasitarias, indicando que la respuesta inmune es heterogénea (46).

Con respecto a la respuesta inmune celular causada por *T. solium*, el estudio de las citocinas, tanto en los humanos como en los modelos de animales, están permitiendo esclarecer los mecanismos inmunes de regulación que se pueden llevar a cabo en esta parasitosis. Ostrosky y col (47) detectaron niveles elevados de interleucinas del tipo 1 y 6 (IL-1, IL-6) en pacientes con neurocisticercosis con procesos inflamatorios, sugiriendo un proceso agudo así como la participación de las células Th1. Similarmente, Restrepo y col (48) al analizar inmunohistoquímicamente los tejidos cerebrales de diversos pacientes con cisticercosis, sugieren que el tipo de respuesta inmune y su intensidad está relacionada con la localización y viabilidad de los parásitos. Además, demuestran que en la mayoría de las lesiones, la respuesta celular es predominantemente realizada por células Th1 por prevalecer la IL-12 y no

detectar a la IL-4. Contrastando la participación de las células Th1 en la neurocisticercosis, están los hallazgos relacionados con la presencia de la eotaxina e IL-5 en 14 pacientes con cisticercosis estudiados por Evans y col (49). Estas observaciones están de acuerdo con la presencia de eosinófilos en la inmunidad contra los helmintos, así como los niveles elevados de IL-5. Aunque, la presencia de estas citocinas en los pacientes no se ha esclarecido, es muy probable la participación de las células Th2, al menos al principio de la respuesta inmune.

Uno de los aspectos más sobresalientes en las infecciones por *T. solium*, es el que se establece en individuos inmunológicamente competentes. En cerdos, infectados experimentalmente, se han identificado anticuerpos específicos contra cisticercos 30 días después de la infección (23). La clase de inmunoglobulina predominante, en estos animales es, al igual que en humanos, del tipo IgG sugiriendo una enfermedad crónica. En estos mismos cerdos, se ha visto que los eosinófilos son las primeras células inflamatorias que se encuentran junto a los cisticercos viables (50). Además, se pueden observar parásitos con diversos grados de degeneración –mostrando células mononucleares, plasmáticas, multinucleadas–, hasta los granulomas crónicos característicos de procesos patológicos. Es decir, en esta parasitosis, existen ejemplos tanto de mecanismos de evasión inmune por parte del parásito, como eficientes mecanismos defensivos del huésped. Las GSTs, por ser enzimas principalmente, detoxificantes, reguladoras de la respuesta inmune y transportadoras, podrían ser consideradas como herramientas defensivas del parásito contra el sistema inmune del huésped. Brophy y Pritchard las

consideran, como miembros del principal sistema de detoxificación en los helmintos (51).

Tratamiento farmacológico de la neurocisticercosis

Antes de 1980 el tratamiento de la cisticercosis era principalmente quirúrgico y basado en corticoesteroides. El advenimiento de dos fármacos cestocidas: el Praziquantel, (una isoquinolina) y el Albendazol, (un benzimidazol), permitió sustituir en muchos casos de neurocisticercosis, el esquema quirúrgico por el farmacológico con resultados más eficientes, además de eliminar los riesgos quirúrgicos y postoperatorios.

Praziquantel (Pzq)

El Pzq es un antihelminto eficaz contra diversos tremátodos y cestodos. Dosis de 50 mg / kg / día durante dos semanas eliminan en un 60 –70% a la neurocisticercosis parenquimatosa activa en humanos; sin embargo, no es efectiva para la cisticercosis ocular (52). Por otro lado una dosis única de Pzq de 10 mg / Kg erradica la forma adulta del parásito.

El Pzq se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal. La concentración máxima en plasma se obtiene entre 1.5 y 2 h después de administrarse. Cuatro horas más tarde se eliminan por vía urinaria sus metabolitos (53). Los productos que no son metabolizados del Pzq son capaces de penetrar la barrera hemato-encefálica, y por ello es eficiente para la neurocisticercosis parenquimatosa. El Pzq penetra rápidamente en el líquido cefalorraquídeo y lentamente en el cisticerco (54).

En los humanos el Pzq experimenta una biotransformación hepática previa a su distribución a todos los tejidos. Esto último es favorecido debido a su elevada solubilidad en los lípidos. También se sabe que el fármaco se une en un 80-85% a las proteínas plasmáticas; en leche materna comparativamente con el plasma, se ha encontrado un 25% de su concentración.

Watt y col (55) estudiaron la influencia de los alimentos sobre el metabolismo del Pzq. Estos autores encontraron concentraciones elevadas del fármaco en plasma asociado a una dieta rica en carbohidratos. Una explicación podría ser la inhibición del citocromo P450 por los carbohidratos, que juega un papel importante en la hidroxilación del fármaco.

Es frecuente combinar el Pzq con otros medicamentos; en este sentido es interesante mencionar que, en presencia de la cimetidina, se observó un incremento al doble de las concentraciones plasmáticas del Pzq, aumentando la efectividad del tratamiento inclusive en un solo día de dosificación (56). En contraste los antiepilépticos carbamazepina y fenitoina –que son potentes inductores de enzimas hepáticas–, redujeron considerablemente la biodisponibilidad del Pzq (57). Se ha postulado, que el Pzq actúa sobre el tegumento del parásito (58) Esta interacción induce el flujo de calcio a través del tegumento. Este incremento del calcio, permite la formación de vesículas, que conducen a la exposición de los antígenos del tegumento al sistema inmune. De esta forma, el sistema inmune es capaz de destruir al parásito(59).

Albendazole (Abz)

Es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro, utilizado contra la ascariasis intestinal, teniasis, parasitosis hepáticas y helmintos pulmonares. Su acción está relacionada con la inhibición de la síntesis del glucógeno en el intestino de helmintos y nematodos, así como la inhibición de la enzima fumarato reductasa (60). La farmacocinética del Abz en humanos indica que es metabolizado en el hígado, hidrolizándose el grupo carbamato seguido de una oxidación del sulfuro de la cadena alquílica y del anillo aromático. El principal metabolito tóxico de este fármaco es el sulfóxido. El metabolismo del Abz es mediado por diversos procesos microsomales: las flavinas contenidas en el sistema monooxigenasa producen albendazol sulfóxido activo y este último metabolito, en combinación con el citocromo P450, produce sulfona que es inactivo.

El sulfóxido es poco soluble, en este sentido, a partir de la dosis de 15 mg de Abz / k de peso solo se encuentra 0.4-2.9 mg / L de sulfóxido en el plasma. Además tiene una vida media de 8 h y sus concentraciones en el líquido vesicular parasitario son bajas con relación a las plasmáticas.

En la neurocisticercosis parenquimatosa, subaracnoidea, de médula espinal y ocular, ocho días de tratamiento con Abz permite la eliminación eficaz del 80 – 85% de los parásitos (61).

Los alimentos con elevado contenido en lípidos mejoran la absorción del Abz. En este sentido, la presencia de grasas neutras en el duodeno incrementa el flujo biliar y mejora la absorción del fármaco (62).

La combinación de Abz y dexametasona resulta en un incremento del 50% de la actividad del Abz en plasma, mejorando el tratamiento tanto antiparasitario

como antiinflamatorio (63). El uso de Pzq o Abz o bien la combinación de ambos, produce la eliminación del 95% de los cisticercos intracraneales. En caso de alguna falla terapéutica, debe ser considerado un diagnóstico diferencial. El uso de fármacos cestocidas, ha sido propuesto como un instrumento diagnóstico en pacientes con lesiones cerebrales quísticas, en quienes el diagnóstico etiológico es incierto.

Estos dos medicamentos, son actualmente los más empleados contra la neurocisticercosis. Sin embargo, en la actualidad, para ninguno de ellos se conoce con precisión su mecanismo de acción. Con respecto al praziquantel, Mc Tigue y col (64) han propuesto que la GST de 26 kDa de *S. japonica* (Sj26) podría ser el blanco del PZQ ya que logran cristalizar a la Sj26 conteniendo al PZQ, en una concentración equimolar. Además el PZQ esta situado en el sitio H de la enzima, característico para unir compuestos electrofílicos. De esta observación, proponen dos mecanismos de acción del PZQ. Uno, es que el fármaco inhibe la actividad catalítica de la GST, por interacciones estéricas de sustratos con pesos moleculares grandes, predichas por sus estudios cristalográficos. El otro mecanismo, podría ser que el PZQ bloquease el sitio de unión para un ligando tóxico, que al no ser conjugado por la enzima, se acumulase en grandes cantidades en la célula del huésped, con consecuencias de originar un fenómeno de intoxicación.

Vacunación contra la cisticercosis en cerdos

Esta medida de control parecería ser la más adecuada frente a aquellas interesadas, en mejorar las condiciones de salud pública, o educar a la población sobre el problema sanitario ocasionado por *T. solium*. Una vacuna

efectiva es práctica, siempre que reúna, en términos generales, las características de ser segura, proporcionar una protección sostenida, ser barata, y fácil de administrarse. Todas las vacunas existentes, fueron elaboradas, inicialmente en la búsqueda del antígeno protector, de tal forma se ha estado realizando diversos trabajos, para obtener una vacuna contra *T. solium*.

Diversas vacunas contra la cisticercosis se han ensayado a escala experimental en el cerdo y en animales de laboratorio. Se han empleado desde fracciones crudas hasta proteínas recombinantes de cisticercos de *T. solium* y de *Taenia crassiceps* con resultados alentadores (65, 66),. En este sentido en 1983 Molinari y col observaron protección para desarrollar la cisticercosis, en cerdos inmunizados con un extracto crudo de cisticercos de *T. solium* y posteriormente desafiados con huevos del mismo parásito. Esta protección, estuvo asociada al incremento del título de anticuerpos y respuesta inflamatoria alrededor de los parásitos (65). Posteriormente, los mismos autores lograron disminuir la cisticercosis porcina del 5% al 0% con un extracto crudo del parásito en cerdos infectados naturalmente (67). Kumar y col (68) lograron obtener también protección (70%) en cerdos infectados experimentalmente, con el primer pico eluido de un extracto de escólex sometido a cromatografía de Sefadex G-200 con antígenos de secreción y excreción de cisticercos de *T. solium*.

Nascimento y col (69) obtuvieron resultados de protección similares a los anteriores (71%) con antígenos de escólex y diversos adyuvantes. Mientras que Manoutcharian y cols, con un extracto crudo de cisticercos de *T. crassiceps* lograron proteger en un 57% a cerdos infectados

experimentalmente con 250,000 huevos de *T. solium* (70), Plancarte y col, empleando una mezcla de proteínas recombinantes (45W, 16K, 18K) y antígenos nativos de oncosferas de *T. solium*, lograron proteger en un 93% y 83%, respectivamente, a diversos cerdos infectados experimentalmente (71). Con respecto al desarrollo de vacunas empleando GSTs de helmintos, desde que Mitchell y col (72) identificaron a una GST de 26 kDa y Balloul y col (73) otra de 28 kDa, ambas de *Scistosoma mansoni*, se han realizado una serie de modelos experimentales, que han demostrado que la inmunización realizada con los antígenos mencionados inducen inmunidad protectora contra este parásito (74) También, con una GST de 28-30 kDa de *Faciola gigantica* se logró proteger en un 36% a ganado vacuno contra este parásito (75) Recientemente Vivanco-Pérez y col lograron reducir en un 78% la carga parasitaria de *T. crassiceps* en ratones inmunizados con una fracción de GSTs de *T. solium*, semipurificada por cromatografía de afinidad (76).

Evasión inmune

Se sabe que el inicio de síntomas neurológicos en el hombre por la presencia de cisticercos de *T. solium* puede ocurrir hasta 30 años después de la infección, con un promedio de 4 años silenciosos (13); inclusive esta parasitosis puede ser un hallazgo fortuito (77), o acompañarse de una sintomatología mínima (78). Esta observación refleja que el parásito, debe desarrollar mecanismos de evasión inmune para poder sobrevivir en hospederos inmunológicamente competentes.

T. solium produce una paramiosina que se une al C1q e inhibe la vía clásica del sistema del complemento *in vitro* (41); cisticercos del mismo parásito sintetizan un factor inespecífico que anula la producción de diversas citocinas producidas

por linfocitos (79). Por otro lado, Molinari y col (80) demostraron una cistein proteasa del mismo parásito capaz de disminuir la población de células CD4⁺ y Tato y col (81) han mostrado, que esta cisteín proteasa induce la apoptosis en este tipo de células, lo que explicaría un mecanismo de evasión inmune de este parásito. Otro ejemplo que sugiere, que el cisticercos de *T. solium* pudiera evadir la respuesta inmune es el descrito por Sealey y col. (82) Los autores demuestran, en un modelo murino, la activación policlonal de linfocitos B debido a las proteínas de extractos crudos de cisticercos. Correlacionando esta activación celular, con la observación descrita por Willms y col (83) acerca de la presencia de inmunoglobulinas situadas en el tegumento del parásito, ambos autores sugieren que las inmunoglobulinas, podrían ser transportadas al interior de la membrana, y como consecuencia el parásito “desaparecerlas”. De ser así el parásito podría evitar el desarrollo de la respuesta inflamatoria en su membrana.

Con respecto a las moléculas oxidativas altamente tóxicas generadas por las células de la respuesta inmune, se sabe que al menos siete especies diferentes de protozoarios y once de helmintos escapan del daño producido por ellas (84). También, la ausencia de enzimas anti-oxidantes está asociada a daño, tales como la catalasa (85). Los macrófagos polimorfonucleares, eosinófilos y plaquetas tienen la capacidad de responder contra los parásitos produciendo diversas moléculas reactivas del oxígeno (MRO) durante la “explosión respiratoria” (ER). La ER es un fenómeno que desarrollan las células de la respuesta inflamatoria al ser estimuladas antigénicamente, consiste en producir MRO por medio de reducir químicamente a las moléculas de oxígeno. En esta reacción en cadena se generan las MRO primarios, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical superóxido (O₂^{·-}) y el radical hidroxilo (HO[·]) que al

interaccionar con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos les producen un gran daño. También de esta última interacción se originan las MRO secundarias y terciarias, como hidroperóxidos alquilados y peróxidos lipídicos más dañinos que los anteriores (86-88). De actuar así el aparato inmune del huésped podría eliminar a los parásitos, inclusive empleando una respuesta inmune innata donde la ER sería uno de los eventos más destacados (89). Sin embargo, por diversas razones no esclarecidas, los cisticercos logran superar el efecto de las MRO durante el proceso de infección y más adelante, ya que las oncosferas, una vez establecidas en alguna parte del cuerpo, continúan su crecimiento hasta desarrollarse en cisticercos. En la mayoría de los casos de cisticercosis humana, porcina y murina con periodos de varios meses y/o años de evolución, se han encontrado células mononucleares, polimorfonucleares y eosinófilos además de linfocitos alrededor de los cisticercos (90-92). Estas células probablemente están produciendo activamente diversas moléculas, entre ellas las MRO, sin repercutir en daño al cisticerco.

Las enzimas glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión S-transferasa (GST), catalasa, y superóxido dismutasa (SOD) inactivan a las MRO que producen las células de la respuesta inflamatoria de los hospederos (93-95). En general, su modo de acción lo llevan a cabo disminuyendo la reactividad de las MRO, al transformarlos en moléculas químicamente más estables. Los mecanismos de acción de estas enzimas son diferentes entre sí; la SOD oxida los aniones superóxidos a peróxidos de hidrógeno y oxígeno molecular, mientras que la GSH-Px hidroliza los peróxidos de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, de tal forma que estas dos enzimas actúan de manera secuencial (96). Por otro lado, la GST conjuga el glutatión (GSH) con diversos compuestos electrofílicos,

tales como hidroperóxidos lipídicos, reactivos carbonilos y diversos medicamentos, para después eliminarlos por varias vías entre las que se encuentra principalmente la del ácido mercapturico (97). También se sabe que las dos últimas enzimas utilizan al GSH reducido para llevar a cabo su función reductora sobre los radicales de oxígeno, motivo por el cual la enzima que regenera a este glutatión, es decir, la glutatión reductasa es importante en la actividad de las enzimas mencionadas (98,99). Recientemente, a la gran cantidad de GSTs citosólicas descubiertas, se ha incrementado otro conjunto denominado MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathion metabolism), -proteínas asociadas a membrana, relacionadas con el metabolismo de eicosanoides y glutatión-. (100) Se ha propuesto que estas enzimas participan en la producción de diversas prostaglandinas y leucotrienos, moléculas importantes en los mecanismos inmunes e inflamatorios. Por ejemplo, en *S. mansoni* se ha observado una correlación entre la penetración de las cercarias a su huésped y la producción de leucotrienos y ácidos hidroxieicosatetraenoico (101) Otros autores han propuesto que los eicosanoides, de origen parasitario, podrían jugar un papel importante en la evasión inmune, inhibiendo las funciones de macrófagos, y células T y B. (102) El estudio de algunas de estas proteínas en *T. solium* ha sido limitado y enfocado principalmente al estadio de cisticerco. El ampliar estas observaciones en número y abarcar a las otras formas biológicas del parásito, conducirá a una comprensión mas detallada de la manera en que sobrevive el metacestodo de *T. solium* "dentro" del sistema inmune de sus hospederos.

Glutación S-transferasas (GSTs)

La función más conocida de las GSTs es la detoxificación intracelular. Compuestos xenobióticos como mutágenos, carcinógenos, medicamentos así como endobióticos derivados del metabolismo basal y/o de la respuesta inmune, –potencialmente tóxicos,– son los componentes que deben ser conjugados por las GSTs antes de ser eliminados por la vía del ácido mercapturico. Son escasos los organismos que no cuentan con este tipo de enzimas, siendo lo más común la presencia de varias isoformas de GSTs en cada especie. Esta profusión de las GSTs esta relacionada también con la multifuncionalidad que las caracteriza. Se sabe que pueden unir en forma reversible y transportar diversos ligandos; también unen pero en forma covalente e inactivan a moléculas electrofílicas detoxificando no catalíticamente. Otras funciones enzimáticas que presentan las GSTs son la de peroxidasa e isomerasa así como originar mediadores proinflamatorios y espasmogénicos como el leucotrieno LTC₄ (100).

Se han detectado diversas isoformas de las GSTs en microorganismos e invertebrados. Los estudios se han enfocado, en los invertebrados principalmente, a demostrar la acción protectora de estas enzimas contra diversos pesticidas.

Homogenados de bacterias desarrollan muy baja actividad para GST (0.002-0.008 $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$), usando CDNB como substrato (101). En forma similar, algunas GSTs de hongos también son poco activas para el mismo substrato (0.050-0.100 $\text{nM min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (102). En diversos Coleopteros, Dipteros y Cnidarios las actividades catalíticas varían en un rango similar al de las bacterias hasta los mamíferos (103). La cucaracha *Blatella germanic*, el

escarabajo *Phyllopertha horticola* y la mosca *Ischnura elegans* son algunos de los pocos organismos de este tipo con elevadas actividades de GSTs ($6-9 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (104).

La presencia de este tipo de enzimas en invertebrados ha sido relacionada con la selección natural, por ejemplo comparado la susceptibilidad a insecticidas entre diversas cepas de moscas comunes, resulta que aquellas que tienen una pobre resistencia a los químicos presentan un número y concentración reducido de isoformas de GSTs en sus tejidos, en contraste con aquellas con elevados valores de resistencia (105).

Los helmintos tienen un sistema enzimático de detoxificación limitado. En diversas especies estudiadas no se ha encontrado el complejo citocromo P-450, y en algunas de ellas no se detecta la catalasa. Pese a ello, normalmente cuentan con alguno(s) de los sistemas detoxificantes encargados de controlar los primeros ataques producidos por la ER ó el metabolismo oxidativo (106). Sin embargo, si éstos son superados, deben de actuar los sistemas detoxificantes secundarios. Los sistemas redox dependientes del glutatión y de tioredoxina son en estos animales los principales medios de detoxificación de los productos secundarios, como hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos (107). Las GSTs de helmintos comparten homologías bioquímicas con las cuatro clases de mamíferos (μ , α , π , θ), además de todas las otras funciones para las GSTs anteriormente mencionadas. De esta forma, el encontrar GST en los cisticercos de *T. solium*, sugiere que podría el parásito utilizar a la enzima, para contrarrestar las moléculas tóxicas originadas por la explosión respiratoria de las células inflamatorias. También se ha sugerido la capacidad de las GSTs para modular la respuesta inmune e inflamatoria del

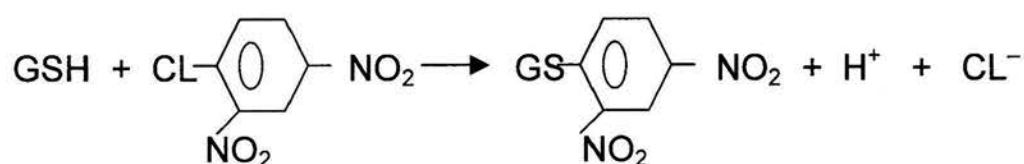
huésped. La PGD₂ sintasa de *Schistosoma mansoni* (108), en un modelo murino, fue capaz de inhibir la migración de las células de Langerhans hacia los ganglios linfáticos. La enzima bloquea al receptor prostanoide D (DP-1) y se deja de producir PGD₂. Como consecuencia de este bloqueo, además de la inhibición celular, no se origina INF α ni iL-10 y se incrementa la producción de IL-4. También se observa, que se reduce la respuesta inflamatoria en hígado e intestino, por la presencia de los huevos del esquistosoma. El conjunto de estas observaciones sugiere, que el parásito evade la respuesta inmune e inflamatoria empleando a la PGD₂ sintasa. Desde el punto de vista farmacológico, se ha encontrado que las GSTs pueden ser inducidas por compuestos quimioterapéuticos; en este sentido, evidencias preliminares sugieren que las GSTs de *Echinococcus granulosus* (109) y la de *Hymenolepis diminuta* (110) pueden ser inducidas por el fenobarbital. Por otro lado, la actividad de la GST varía entre los diferentes grupos de helmintos, asociándose los valores más altos con helmintos de cubiertas poco resistentes –como los *Digeneos*,– en contraste con los que viven en los tejidos.

Diversos procesos bioquímicos han sido utilizados para purificar a las GSTs de helmintos sin embargo, en pocos casos se ha logrado obtener proteínas nativas en forma homogénea.

Inicialmente, las GSTs se identificaron por su capacidad de unirse a moléculas lipofílicas, como la bilirrubina, de tal forma que las asociaron con las proteínas denominadas “ligandinas” (111). Actualmente se sabe que la mayoría de las GSTs (EC 2.5.1.18) son una familia de enzimas diméricas compuestas de formas homodiméricas y heterodiméricas (112) Fig. 2. Las GSTs se han clasificado en función de su reactividad inmunológica cruzada, tipo de

estructura primaria, afinidad por sustratos, sensibilidad a diversos inhibidores, estructura terciaria y capacidad de hibridizar en dímeros las subunidades de estas enzimas. Con esta información se han dividido en las clases: Alfa, Beta, Kappa, Mu, Omega, Pi, Sigma, Teta y Zeta (113,114).

El sustrato más utilizado para demostrar las diversas isoformas de las glutationes S-transferasas en diversas especies biológicas es el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno, la reacción se lleva a cabo de la siguiente forma:



La estructura molecular de las GSTs es muy parecida entre las diversas clases con un plegamiento muy similar entre ellas. Cada subunidad cuenta con dos dominios. El dominio 1 amino terminal (1-80 residuos) es topológicamente similar al de la tioredoxina (115-117), así como otras proteínas que aparentemente han evolucionado para unir residuos de cisteína o GSH (118-120) (Fig. 3). Este dominio es muy conservado, en él se encuentra el sitio de unión para GSH ("sitio G") y se conecta con el dominio 2 por una pequeña secuencia de unión. El dominio 2 (del residuo 87 al 210) empieza en el carboxilo terminal de la secuencia de unión y consiste de diversas α -helices, cuyo número varía dependiendo de la clase de GST. Este dominio contribuye en la interacción con el segundo sustrato, y se piensa que las diferencias en él entre las distintas GSTs se relacionan con la afinidad variada que se encuentra para un mismo sustrato (115).

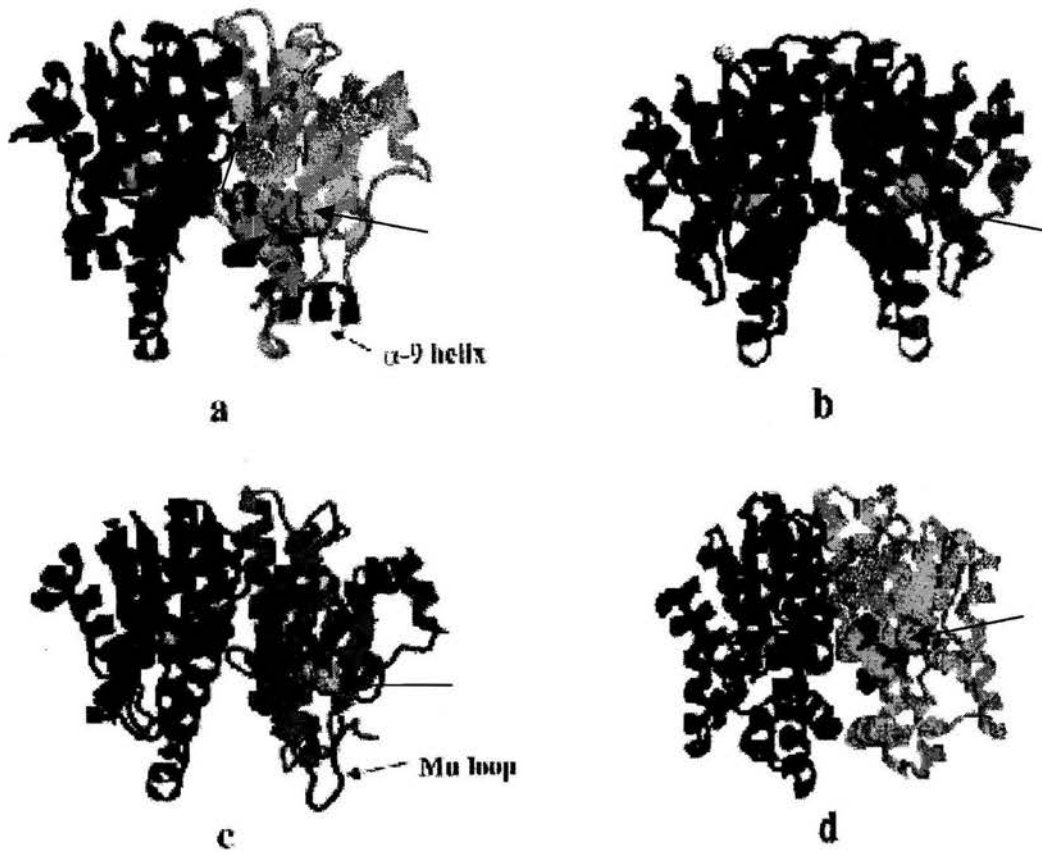


Figura 2. Estructuras de glutatión S-transferasas diméricas (GSTs): a) GST alfa, b) GST pi, c) GST mu, d) GST tetra. Cada una muestra sus subunidades (gris y negro) y para la clase alfa su distintiva hélice α así como para la clase mu su curva Mu. Cada subunidad presenta un sitio activo, aquí solo se remarcó con una flecha el de las subunidades en gris. Cada subunidad esta formada a su vez por 2 dominios diferentes. Sheehan, D. y col. *Biochem J.* 2001. 360: 1-16.

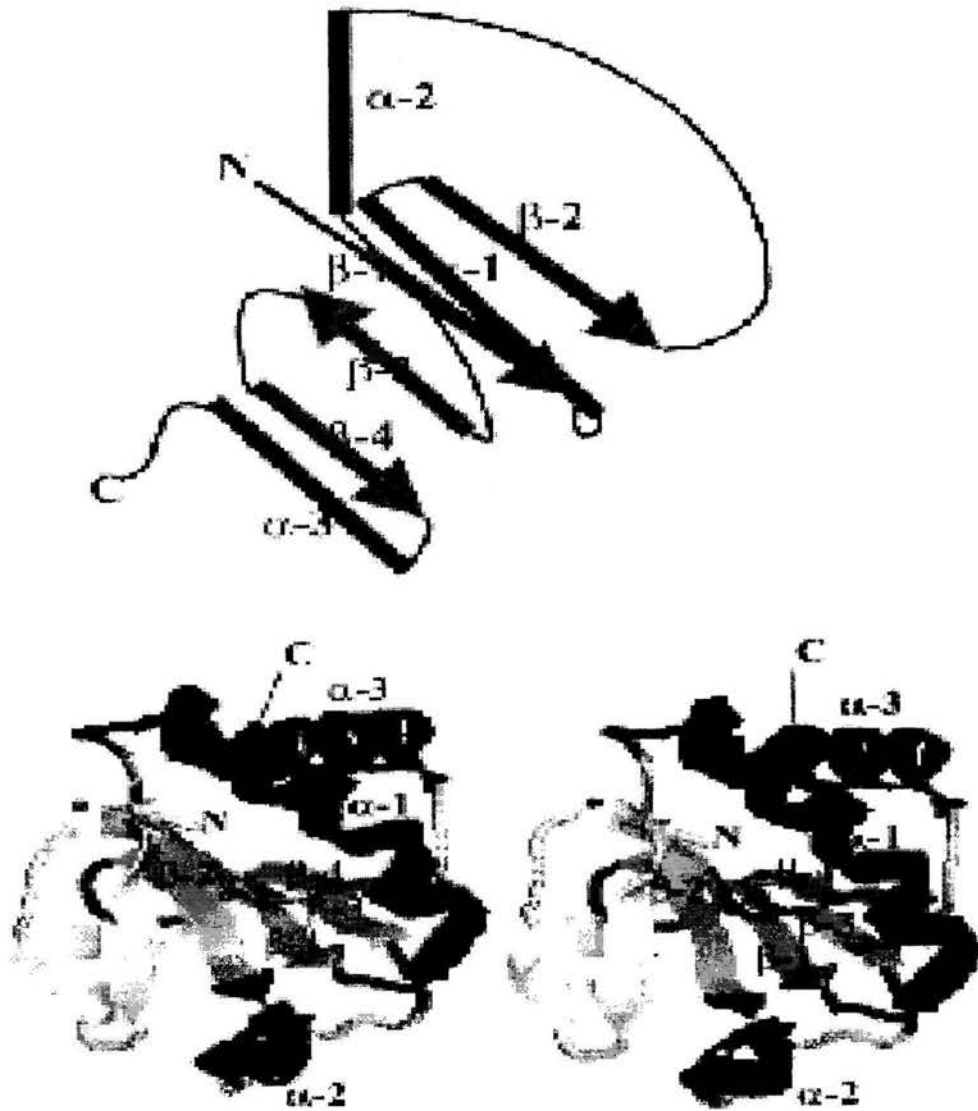


Figura 3. Plegamiento característico de las tioredoxinas el cual se encuentra también en el amino terminal del dominio 1 (residuos 1-80) de las GSTs. Este plegamiento consiste de 4 conformaciones β flanqueadas por 3 hélices α . Esta estructura se presenta en familias de enzimas que han evolucionado para unir residuos de cisteína o GSH. Sheehan, D. y col. *Biochem J.* 2001. 360: 1-16.

Cada subunidad de la GST pesa aproximadamente 25 kDa, (la enzima microsomal es trimérica con subunidades de 17 kDa); además, cada subunidad de una GST citosólica dimérica es independiente de su vecina en cuanto a su eficiencia catalítica con diferentes sustratos y a su capacidad de inhibirse (121-122).

Las GSTs nativas se han logrado obtener a homogeneidad por métodos bioquímicos de purificación como fraccionamiento salino, cromatografías de intercambio iónico, filtraciones en geles y cromatoenfoco, entre otros (123-126); además, como muchas isoenzimas de GSTs se unen a derivados de glutatión inmovilizados en resinas inertes, entonces pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad (127). Las matrices de afinidad más comunes son la S-hexylglutathione Sefarosa y Glutatión Sefarosa. Bajo condiciones favorables, en una única etapa de purificación se puede aislar una sola GST de un homogenado proteico (128).

Las GSTs tienen como sustratos sustancias electrofílicas originadas por el metabolismo de compuestos tóxicos endógenos y de xenobióticos. Estos sustratos incluyen epóxidos, alquenos activados e hidropéroxidos orgánicos. Debido a que las GSTs aceptan diversos sustratos existen muchas formas de realizar sus ensayos cinéticos (129,130). Una prueba conveniente, aunque no fisiológica, es emplear, como se mencionó anteriormente, al sustrato al 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (131). La formación del conjugado GSH-DNB puede medirse espectrofotométricamente. Sin embargo, hay algunas GSTs que tienen una baja actividad para el CDBN y en algunos casos es poco sensible (130). Otros sustratos –como el aminocromo, dopacromo y adrenocromo– tienen cromógenos que permiten seguir la actividad enzimática

espectrofotométricamente (132). En algunos casos, las GSTs catalizan reacciones reductoras donde el GSH es oxidado a GSSG. Un ejemplo importante es la reducción de hidroperóxidos:

$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$. Esta reacción puede acoplarse a la reducción catalítica del GSSG por la enzima Glutación reductasa y registrarse espectrofotométricamente a 340 nm la oxidación del NADPH (131). Sin embargo, un gran número de reacciones catalíticas efectuadas por diversas GSTs no es posible demostrarlas espectrofotométricamente y se deben separar los sustratos y productos por procedimientos bioquímicos (133). El marcaje radiactivo del GSH o sustratos xenobióticos es posible. Por otro lado, se sabe que en todas las reacciones efectuadas por las GSTs se consume GSH y es factible medir su desaparición, aunque es más fácil evaluar la formación de los productos. Finalmente, se puede detectar a las GSTs inmediatamente después de separarlas por electroforesis en geles de poliacrilamida o almidón. La actividad enzimática de GST se localiza en la superficie del gel por tinción con su sustrato y glutación reducido. Esta técnica permite la comparación de diversas muestras entre sí y por lo tanto determinar la relación genética entre diferentes isoenzimas de las GSTs (134,135).

El mecanismo catalítico de las GSTs implica el ataque nucleofílico del átomo de azufre del GSH sobre los sustratos electrofílicos. Este ataque es facilitado por la ionización del GSH (disociación de sus protones por la enzima) a su forma de tiolato (136). El grupo tiol del GSH cuando está unido a la enzima, tiene un pKa de 6.3, en contraste con el pKa de 9.2 del GSH en solución, indicando que el GSH unido a la enzima está altamente ionizado (137). El anión tiolato se estabiliza mediante un puente de hidrógeno con un grupo hidroxilo fenólico de

un residuo de tirosina del sitio activo. La enzima contribuye a la catálisis no sólo activando al grupo tiol, sino también orientando al GSH en una posición favorable hacia el segundo sustrato. En la unión del GSH a las GSTs se involucran tanto interacciones y uniones peptídicas del tripéptido sobre la cadena de aminoácidos de la enzima (138).

Enzimología

La cinética enzimática permite conocer las diversas características de una enzima. Esta información es fundamental para conocer de su mecanismo de reacción, especificidad por el sustrato o los sustratos, incluyendo las diversas etapas y las secuencias de las mismas (139). También nos informa sobre la influencia que tienen sobre la enzima diversas condiciones experimentales. Así, es factible apreciar la estabilidad de la enzima frente a cambios de temperatura, pH, fuerza iónica. Se pueden obtener características de regulación enzimáticas al emplear sustancias inhibitorias, además de adquirir información sobre su estructura molecular. La cinética enzimática nos permite determinar los parámetros catalíticos de una enzima, como la constante de Michaelis (K_m), velocidad máxima de la reacción (V_{max}), constante de inhibición (K_i), etc, que son datos numéricos que facilitan las comparaciones entre enzimas, reacciones de la misma enzima sometida a algún tratamiento y/o características fisiológicas de donde se obtuvo a la misma (140). Es necesario enfatizar que para realizar la mayoría de los estudios enzimáticos mencionados es conveniente contar con la enzima en forma pura.

A partir de este conjunto de observaciones se decidió trabajar en los siguientes objetivos y metas.

OBJETIVO

Caracterizar enzimológicamente a la SGST_{26.5} de cisticercos de *T. solium*

OBJETIVOS particulares

- a) Se purificará a la SGST_{26.5} por procedimientos bioquímicos
- b) Se determinarán los principales parámetros enzimáticos de la SGST_{26.5}

METAS

- a) Determinación del pH óptimo para la actividad específica de la enzima.
- b) Determinación de la temperatura óptima para la actividad específica de la enzima.
- c) Determinación de la actividad específica para diversos sustratos.
- d) Determinación de la constante catalítica Km tanto para el primero como para el segundo sustrato.
- e) Determinación de la velocidad máxima (Vmax) para el GSH y CDNB.
- f) Determinación de las constantes de inhibición (Ki) para diversas sustancias inhibitorias.
- g) Determinación de las dosis de inhibición al 50% de la actividad enzimática de SGST_{26.5} con diversas sustancias inhibitorias.
- h) Determinación del tipo de estructura dimérica por procedimientos de inhibición simple.
- i) Determinación del mecanismo cinético de la SGST_{26.5}

MATERIAL Y METODOS

Reactivos químicos

De la compañía Aldrich Chemical (Milwaukee, WI) se obtuvieron los siguientes productos: 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), 1,2-dicloro-4-nitrobenzono, 2,4-hexadienal, *trans*-2-nonenal, 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrofenoxi) propano y el ácido etacrínico. De la compañía Sigma Chemical (San. Luis MI) se consiguieron el azul de cibacrón, bromosulfoftaleina, cloruro de trifeniltin, glutatión reducido, glutatión reductasa, NADPH, e hidroperoxido de cumeno. De la casa Merck (Darmstadt, Alemania) se adquirió el peroxido de hidrógeno. Las resinas GSH-Sefarosa 4B y Sefacril S-200, así como el Polybuffer 96 y el intercambiador Polybuffer para el cromatofoco fueron comprados a Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia) y los marcadores de peso molecular de Gibco BRL (Rockville, MD). El resto de los reactivos también fueron de buena calidad y se consiguieron de diversos proveedores comerciales.

Purificación de la enzima

Obtención de los parásitos

La enzima fue purificada a partir de cisticercos de *T. solium*. Los parásitos se obtuvieron de cerdos infectados en forma natural provenientes del estado de Morelos, México.

El músculo esquelético de los cerdos fue disecado para obtener los cisticercos, los parásitos se lavaron en solución salina fisiológica pH 7.0 y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Obtención del extracto crudo del metacéstodo (ECM)

El extracto crudo del metacéstodo (ECM) se obtuvo siguiendo la técnica de Vibanco-Pérez y col con algunas modificaciones (141). Brevemente, 5 g de cisticercos se suspendieron en una relación de 1:10 (p / v) en 0.01M de amortiguador de fosfatos más 0.15 M de cloruro de sodio (PBS), incluyendo 5 mM de EDTA, 25 µg / mL de Aprotina, 0.1 mM TLC, 25 µg / mL de Leupeptina y 0.006% de PMSF (pH 7.4). Los parásitos se homogenizaron a 4° C y a 15000 rpm empleando un Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY) con un vástago de 1 X 16 cm. El material insoluble del homogenizado se eliminó centrifugándolo a 100 000 g por 1 h, 4° C; el sobrenadante de la centrifugación es el ECM.

Obtención de la fracción de GST de T. solium (SGSTF)

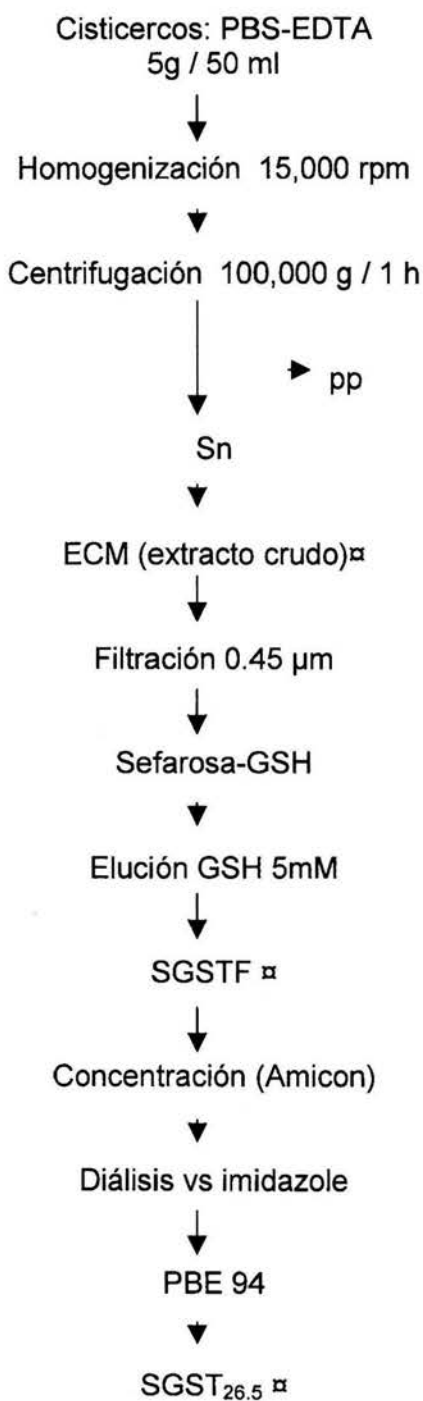
El ECM se filtró por una membrana de 0.45 µm (Millipore) y se hizo pasar por una columna de Sefarosa-glutación (3 X 3 cm) (Pharmacia Biochem) equilibrada en PBS pH 7.4. La velocidad del flujo se estableció en 100 mL / h y se colectaron fracciones de 3 mL. Las proteínas que no se absorbieron a la resina se lavaron de la columna con suficiente cantidad de PBS. Posteriormente las GSTs fueron eluidas de la resina con una solución 5mM de glutación reducido (GSH) en PBS pH (7.4); el eluido es la SGSTF. Tanto el desempeño cromatográfico de las proteínas como la actividad enzimática para

GST se registraron espectrofotométricamente, a 280 y 340 nm, respectivamente.

Obtención de la SGST_{26.5} y de su punto isoeléctrico (pI)

El último paso de purificación para obtener a la SGST_{26.5} en forma homogénea se realizó por medio de un cromatoenfoco (142). Las fracciones provenientes de la columna de afinidad (Sefarosa-GSH) que presentaron actividad enzimática para GSTs, se juntaron y concentraron por medio de un sistema Amicon (Amicon Millipore) con la ayuda de una membrana para ultrafiltración YM-5 (Amicon Millipore). Posteriormente, la fracción SGSTF concentrada se dializó exhaustivamente contra 0.025 M de amortiguador de imidazole-HCL, (pH 7.35). La SGSTF dializada se cromatografió en una columna de 1 X 18 cm formada de una resina intercambiadora de iones denominada polybuffer exchanger 94 (PBE) (Pharmacia Biotech) y equilibrada con el mismo amortiguador imidazole-HCL. Para eluir a las proteínas del intercambiador de iones se hizo pasar una solución de Polybuffer 74 diluída 1:16 en agua desionizada (pH 4.0) a un flujo de 20 ml / h. Se colectaron fracciones de 1 mL, se les evaluó su pH, y posteriormente se dializaron frente a PBS pH 7.2 para determinar su actividad enzimática de GST.

PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN PARA LA SGST_{26.5}



▣ actividad específica

Obtención del GST de líquido vesicular de cisticercos (LVC)

Como una información adicional al proyecto de purificación de SGST_{26.5} se investigó la presencia de la actividad específica para GST en el líquido vesicular de cisticercos (LVC). Se obtuvieron 5 ml de LVC al puncionar los parásitos con jeringas de tuberculina. El LVC se aclaró centrifugándolo a 10,000 g durante 30 min a 4° C.

Cinco mL de LVC, conteniendo 5 mg de proteína, se fraccionaron en la columna de afinidad Sefarosa-GSH bajo las mismas condiciones cromatográficas anteriormente descritas. Las fracciones obtenidas fueron tratadas en forma similar como las correspondientes a los tejidos de los cisticercos. Aquellas fracciones con actividad enzimática para GST se almacenaron para su análisis posterior.

Determinación proteica y análisis por PAGE

La concentración de proteína se determinó por la técnica de Lowry (143). Geles de poliacrilamida reductores (PAGE) al 10% en condiciones desnaturizantes se realizaron siguiendo la técnica de Laemmli (144).

Determinación de los pesos moleculares

El peso molecular nativo de la SGST_{26.5} se determinó por cromatografía de filtración (145). La enzima se pasó a través en una columna de Sefacril S-200

(0.9 X 60 cm) equilibrada en PBS (pH 7.2). La columna se calibró previamente empleando las siguientes proteínas de referencia: β galactosidasa (200 000), deshidrogenasa alcoholica de levadura (150 000), albúmina sérica bovina (66 000), ovoalbúmina (43 000), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29 000) y mioglobina (17 000). Para evitar efectos de agregación en las proteínas de referencia, éstas fueron aplicadas en dos lotes. El peso molecular estimado de la SGST_{26.5} se calculó interpolando su coeficiente de partición (K_{av}) en una gráfica construida con el logaritmo del peso molecular en función de los K_{av}s de las proteínas de referencia. El peso molecular de las subunidades de la SGST_{26.5} se estimó empleando geles de poliacrilamida reductores y desnaturalizantes y teniendo marcadores de peso molecular como referencia.

Ensayos enzimáticos

Todas las actividades enzimáticas específicas para GST, realizadas tanto en las fracciones semipurificadas como en la SGST_{26.5}, se obtuvieron por el método de Habig y col. (131); las diversas condiciones experimentales se describen en la tabla 1. Brevemente, las reacciones catalíticas se monitorearon empleando un espectrofotómetro Ultrospect 1000 (Pharmacia Biochem). En un tubo de ensayo 0.3 μ g de la enzima parasitaria se mezcló en amortiguador de ensayo (K₂HPO₄ 100 mM, EDTA 1 mM, GSH 5 mM) a pH 6.5 ó 7.5.

Tabla 1. Condiciones experimentales para los diversos sustratos					
Substrato	mM	pH	[GSH] mM	λ (nm)	ξ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
1-cloro-2,4-dinitrobenceno	7	6.5	5	340	9.6
1,2-di-cloro-4-nitrobenceno	1	7.5	5	345	8.5
Bromosulfaleína	0.03	7.5	5	330	4.5
Ácido etacrínico	0.2	6.5	0.25	270	5
1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi)	5	6.5	5	330	0.5
Hexa-2,4-dienal	0.05	6.5	2.5	280	34.2
Trans-non-2-enal	0.025	6.5	0.25	225	19.2

Concentración experimental de SGST_{26.5} 1.3 X 10⁻¹¹ M

La concentración de GSH fue de 5 mM, excepto en los ensayos que emplearon *trans-non-2-enal*, ácido etacrínico y hexa-2,4-dienal, que fue de 2.5 mM. Las reacciones enzimáticas siempre se iniciaron, al adicionar al tubo de ensayo 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) (7 mM) en etanol al 96%, al menos que otro sustrato fuese el evaluado. El volumen de reacción se mantuvo siempre en 1 mL; la concentración final del etanol fue menor al 1%. Todas las velocidades de reacción se registraron a la longitud de onda elegida y hasta 3 minutos después de su inicio. Una mezcla de ensayo conteniendo todos los reactivos, excepto la enzima, se empleó como control negativo; los valores resultantes de este

control fueron restados de los valores experimentales. El control positivo consistió en emplear 5 μg de GST de hígado de conejo (Sigma) por ensayo. Se realizaron duplicados o triplicados de cada ensayo enzimático y septuplicados en los referentes al mecanismo catalítico, y con el valor promedio de ellos se construyeron las gráficas. Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por minuto bajo las condiciones del ensayo descritas. La actividad específica se define como la unidad de actividad enzimática por mg de proteína, ésta última determinada por el método de Lowry (143).

La capacidad de la $\text{SGST}_{26.5}$ para catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y / o hidroperóxido de cumeno se determinó espectrofotométricamente por el método de Paglia y Valentine (146). Brevemente, en un volumen final de 1 mL de amortiguador se adicionó una alícuota de la $\text{SGST}_{26.5}$, se mezcló e incubó 15 minutos a 37°C ; la reacción enzimática se inició al adicionar peróxido de hidrógeno o hidroperóxido de cumeno, y después de 20 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbancia del NADPH a 340 nm ($\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Determinación del pH óptimo

El pH óptimo de la reacción enzimática para la $\text{SGST}_{26.5}$ se evaluó también por el método de Habig y col (131), empleando al CDNB como sustrato y diversos amortiguadores de ensayo descritos en la tabla 2.

Tabla 2. Amortiguador y rango de pH de trabajo

Amortiguador	pH
citrato de sodio-ácido cítrico	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0
fosfato de sodio dibásico- monobásico	6.5, 7.0, 7.5, 8.0
tris(hidroximetilaminometano)-HCL	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0

Las concentraciones del resto de los reactivos y de la enzima fueron similares a las descritas para la determinación de la actividad enzimática de GST.

Estabilidad de la enzima a diferentes valores de pH

Se evaluó la estabilidad de la SGST_{26.5} en un intervalo de diferentes valores de pH. Para tener a la enzima parasitaria en cada uno de los pH estudiados, una alícuota de la misma se dializó durante 4 h contra el amortiguador que proporcionó el pH en estudio (tabla 2); inmediatamente después se agregó la enzima parasitaria al amortiguador de ensayo (siempre a pH 6.5) y se continuó con el procedimiento de Habig y col (105) para obtener las velocidades de reacción.

Estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas

La estabilidad de la $SGST_{26.5}$ a diferentes temperaturas se analizó por estudios de cinética enzimática (131). Diversas alícuotas de la enzima parasitaria (0.3 μg c/u) se incubaron durante 5 minutos, cada una en el amortiguador de ensayo (pH 6.5) ajustado a una temperatura específica. El intervalo de temperatura empleado fue de 10 - 93°C (ciudad de México) y en el análisis se consideraron intervalos de 10 °C. Después de la incubación se adicionó el sustrato CDNB (7 mM), y durante los siguientes 3 minutos, a temperatura ambiente, se registró el cambio de absorbancia a 340 nm. Se realizaron ensayos adicionales manteniendo a la $SGST_{26.5}$ por 30 minutos a temperaturas de 20°C y 37°C en el amortiguador de ensayo, para posteriormente iniciar la reacción catalítica y obtener los resultados de la manera ya descrita.

Determinación de las constantes catalíticas de la $SGST_{26.5}$

Para determinar las constantes catalíticas de la enzima para el GSH y CDNB se realizaron diversos ensayos de la velocidad inicial catalizados por la enzima y evaluados espectrofotométricamente a 340 nm (131). Para este fin, se mantuvo fija la concentración de la enzima (0.3 μg) y a saturación la del CDNB (7 mM), mientras que la concentración del GSH se varió en un intervalo de 0.12 a 5 mM (Tabla 3). Para determinar las constantes correspondientes para el CDNB, se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración del CDNB en un intervalo de 0.03 a 7 mM mM, manteniendo a saturación la del GSH (5mM), (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de sustratos (mM)	
CDNB	GSH
0.03	0.12
0.06	0.185
0.12	0.25
0.25	0.375
0.5	0.5
1.0	0.61
2.0	0.75
5.0	0.875
6.0	1.0
7.0	1.5
	2.0
	4.0
	5.0
	10

Nota: en cada ensayo cada concentración de CDNB se combinó con GSH a 5 mM, y cada concentración de GSH se combinó con CDNB a 7 mM.

Para determinar los valores de las constantes cinéticas se construyeron graficas Lineweaver-Burk con los valores inversos de las velocidades iniciales frente a los valores inversos de las concentraciones de los sustratos. De estas gráficas la pendiente de la recta es la K_m / V_{max} el intercepto de la recta en la ordenada la $1 / V_{max}$ y el intercepto de la recta en la abscisa es la $-1 / K_m$.

Determinación de la I₅₀

Los estudios de inhibición se desarrollaron para determinar los valores de I₅₀ de diversos compuestos por el procedimiento descrito por Tahir, M. K., y Mannervik, B. (147). La I₅₀ se define como la concentración de inhibidor necesaria para producir el 50% de inhibición en el ensayo enzimático estándar; en el caso de las GSTs (131), empleando al CDNB como el sustrato secundario.

Las sustancias inhibidoras que se utilizaron fueron el colorante poliaromático sulfonado azul de cibacron (AC), el compuesto aniónico bromuro de sulftaleína (BST) y el fungicida cloruro de trifeniltin (TFC). La cantidad de cada inhibidor evaluada se describe en la Tabla 4 .

Tabla 4. Concentraciones de inhibidores (µM)

AC	TFC	BST
0.07	0.1	0.05
0.15	0.22	1.0
0.31	0.5	5.0
0.62	1.0	21.8
1.25	3.	50
5	10.0	75
10	15.0	100
25	20.0	125
35	35.0	150

Azul de cibacron (AC), cloruro de trifeniltin (TFC), bromuro de sulftaleína (BST)

El volumen empleado en cada uno de los ensayos de inhibición, independientemente del tipo de inhibidor y de su concentración, fue de 50 μ L. Este volumen, se adicionó al amortiguador de ensayo y posteriormente una alícuota de SGST_{26.5} (0.3 μ g); la mezcla se dejó equilibrar por unos segundos y se inició la reacción al agregar al CDNB (7 mM), el volumen final de la reacción fue de 1 ml. El cambio de absorbancia se registró a 340 nm durante 3 minutos (131).

El grupo de datos correspondientes para cada inhibidor se graficó como el % de la actividad residual frente al logaritmo de la concentración del inhibidor. El valor de la I₅₀ se determinó al interpolar del punto de la grafica que definió el 50% de actividad específica al de la concentración de inhibidor.

Tipo de inhibición y constantes inhibitorias (K_i)

El tipo de inhibición que cada inhibidor (AC, BST, TFC) efectuó sobre la SGST_{26.5} fue estudiado por medio de sistemas de inhibición simple (147). El procedimiento para llevarlos a cabo consistió en obtener los datos de las velocidades iniciales de la enzima influida por las sustancias inhibitorias. Para evaluar al AC se mezclaron la enzima (0.3 μ g), el GSH (5 mM), AC a 0.63 mM en el amortiguador de ensayo, después de 5 minutos se inició la reacción enzimática al añadir una de las siguientes concentraciones de CDNB 0.2, 2, 4, 6.6, 8.3, 10, 13.3 mM, el volumen de la reacción fue de 1 mL. El registro espectrofotométrico del ensayo a 340 nm se realizó durante 3 minutos. El conjunto de datos generados de esta forma sirvió para construir una recta en un sistema de Lineweaver-Burk, donde se graficó el inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de CDNB, de tal forma que la recta

representa el inverso de la velocidad inicial de la $SGST_{26.5}$ para la concentración de 0.63 mM de AC. Se construyó otra recta de este tipo para el AC pero con la concentración de 1.25 mM y otra más en ausencia de inhibidor. Para conocer el tipo de inhibición que ejerció el BST sobre la $SGST_{26.5}$, se repitió todo el procedimiento anterior, pero empleando las concentraciones de 5 y 15 μ M para el BST y las de 2, 3.3, 6.6, 10 y 13.3 mM para el CDNB. De manera similar para el TFC sus concentraciones fueron de 2 y 6 μ M, y las del CDNB de 0.2, 2, 4, 6.6, y 8.3 mM.

El comportamiento de las rectas, por el patrón de intersección tanto en el eje de las ordenadas como en el de las abscisas, definió el tipo de inhibición. Los valores de las constantes inhibitorias (K_i) para AC, BST y TFC se calcularon al re-graficar los valores de los interceptos en el eje de las ordenadas, –originados de la primera grafica de Lineweaver-Burk– frente a la concentración del inhibidor correspondiente.

Estructura oligomérica

Por medio de ensayos de inhibición simple, mas la ecuación de la velocidad fraccional (VF) se determinó el tipo de estructura de la enzima parasitaria (148). Los datos I_{50} de los inhibidores AC, BST y TFC se emplearon para ajustarlos a la ecuación de la VF, siendo esta: $y = I_{50} / I_{50} + [I]$, donde $y = a$ la velocidad fraccional (VF). Con estos datos se construyeron graficas de la VF frente al logaritmo de la concentración del inhibidor y se obtuvieron los valores de las pendientes en la región de inflexión al 50 % de inhibición. Para evaluar la sensibilidad de cada una de las curvas anteriormente mencionadas, se determinaron sus valores en las concentraciones inhibitorias I_{10} , I_{80} e I_{90} y se

compararon con los valores de la I_{50} . Los datos esperados de la ecuación de la VF deben ser: $I_{10} / I_{50} = 1 / 9$, $I_{80} / I_{50} = 4$ e $I_{90} / I_{50} = 9$ para oligómeros homodiméricos.

Cinéticas de estado estacionario en enzimas con mas de un substrato

Para determinar el mecanismo y los parámetros cinéticos de la $SGST_{26.5}$, se obtuvieron los patrones de velocidades iniciales, variando la concentración tanto del GSH como la del CDNB. Nueve diferentes concentraciones de CDNB se enfrentaron a 3 diferentes concentraciones de GSH (tabla 5). así también 9 diferentes concentraciones de GSH se enfrentaron a 4 diferentes concentraciones de CDNB (tabla 5). La enzima (0.3 μ g) se incubó en presencia de una de las concentraciones del GSH y la reacción se inició al adicionar alguna de las concentraciones de CDNB; el volumen de la reacción fue de 1 mL y el cambio de absorbancia a 340 nm se llevó a cabo durante 3 minutos. Posteriormente los resultados se analizaron empleando graficas de Hanes-Wolf de donde se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos.

Tabla 5 Concentraciones (mM) de los substratos empleadas en la evaluación del mecanismo cinético de SGST _{26.5}	
GSH	CDNB
0.1	0.4
0.2	0.81
0.4	1.7
0.62	2.6
1.5	3.5
2.3	4.3
3.2	5.2
4.1	6.7
5.0	7.0

NOTA: las concentraciones resaltadas de cada columna se escogieron para enfrentarse a todas y cada una de las concentraciones de su correspondiente columna de enfrente.

Resultados

Purificación de la enzima

La SGST_{26.5} se logró purificar a homogeneidad por un procedimiento basado en una cromatografía de afinidad en Sefarosa-GSH, (Fig.4) y posteriormente en un sistema de cromatoenfoco, PBE 94, (Fig. 5). Los resultados se resumen en la Tabla 6. La actividad específica de la enzima parasitaria pura fue de 78 unidades. La SGST_{26.5} se purificó 210 veces y se logró recuperar el 4.4 % de la actividad enzimática. Por este procedimiento la enzima pura resultó ser el

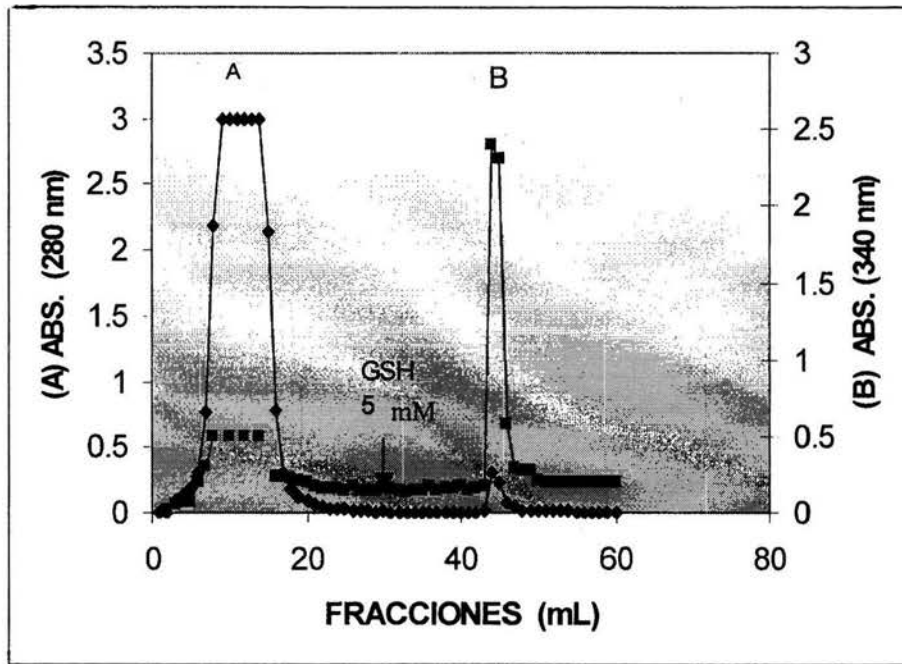


Fig.4. Cromatografía de afinidad Sefarosa-GSH para fraccionar al ECM,(A) (◆). La matriz (3x3 cm) de la columna se utilizó en una relación de 0.012 mg de proteína / ml de gel y un flujo de 100 ml h⁻¹. (B) corresponde a la fracción SGSTF (■) y fue eludía con GSH 5 mM.

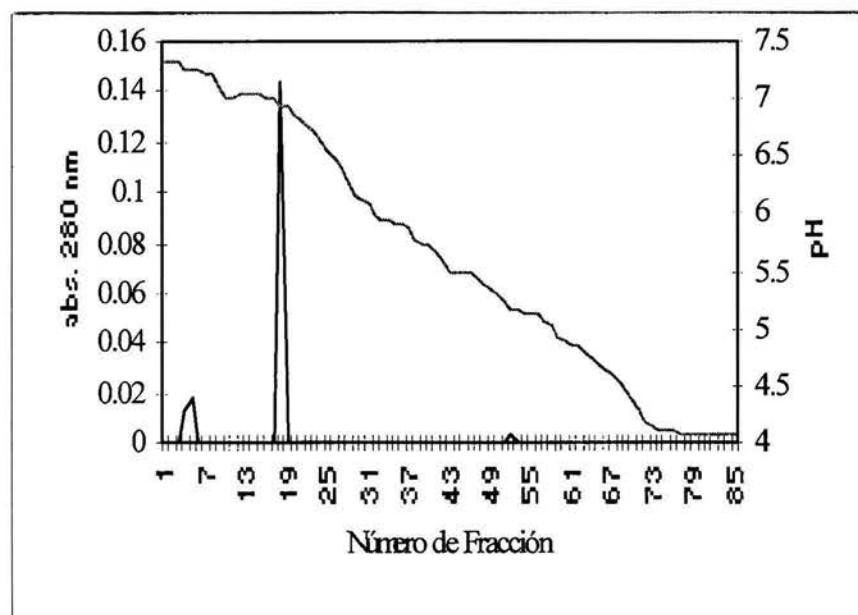


Fig.5. Cromatografía de SGST a pH 7-4. La SGST_{26.5} (fracciones 17-21) se purificó con una matriz de PBE 94 (1x18 cm), utilizando un flujo de 10 ml h⁻¹ y diluyendo 1:14 el polibuffer pH 4 para establecer el gradiente de pH. En negro absorbancia a 280 nm, en gris valores de pH.

0.02% del total de las proteínas que se pudieron solubilizar de los tejidos parasitarios.

Tabla 6. Resumen de la purificación de SGST_{26.5}.

Etapa	Volumen total (ml)	Proteína Total (mg)	actividad específica (U/mg)	actividad total (U)	Rendimiento(%)	#de purificaciones
ECM	174	572	0.42	240	100	1
SGSTF	8	6.2	16.6	103	43	40
SGST _{26.5}	1.7	0.12	78	10.6	4.4	210

Determinación del pI

El valor del pI para la SGST_{26.5} resultó ser de 7.07. Éste valor se obtuvo en el último paso de purificación. En la Fig. 5 se muestra el resultado del cromatofoco de la fracción SGSTF. Un pico principal de proteína y otro de menor proporción es particularmente lo que se observa en el fraccionamiento.

GST en el líquido vesicular del cisticerco (LVC)

Se demostró la presencia de la actividad enzimática para GST en el LVC. En la tabla 7 se muestran los datos del proceso de purificación. La actividad específica del LVCb, enriquecido por la cromatografía de afinidad, fue de 10.4 unidades de actividad, la enzima se purificó 27 veces y se alcanzó un rendimiento de 273 %.

Tabla 7. Resumen de la purificación de LVCb.

Etapa	Volumen total (ml)	Proteína Total (mg)	actividad específica (U/mg)	actividad total (U)	Rendimiento(%)	#de purificaciones
LVCa	5	5	0.38	1.9	100	1
LVCb	0.5	1	10.4	5.2	273	27

LVC líquido vesicular de cisticerco (a) crudo, (b) fraccionado en Sefarosa-GSH
 Una unidad de actividad es igual a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de producto por minuto bajo las condiciones del ensayo

Análisis electroforético

Todas las fracciones obtenidas en el procedimiento de purificación se analizaron por PAGE reductores. La fracción ECM esta formada por diversas bandas distribuidas en un intervalo de 5 – 250 kDa (Fig.6a). En la región de 26.5 kDa no se aprecia ninguna banda enriquecida. La fracción SGSTF muestra cuatro bandas (Fig.6b), resultado de su afinidad por el GSH. La banda de mayor movilidad electroforética corresponde a una masa molecular de 26.5 kDa, seguida por una de menor concentración de 26 kDa; la tercera pesó 25 kDa y la de menor movilidad 24 kDa. Esta cromatografía eliminó una gran cantidad de proteínas inespecíficas. Con el último paso de purificación se obtuvo a la SGST_{26.5} en forma homogénea. Esta preparación consistió de una sola banda de 26.5 kDa bajo condiciones desnaturizantes y reductoras (Fig.6c).

Determinación de los pesos moleculares y composición de subunidades

La forma nativa de la SGST_{26.5} presentó un peso molecular de 60 kDa con una variación de \pm 4 kDa (Fig. 7). Durante el proceso de filtración en el gel se evitó

la formación de agregados por correr en forma separada las proteínas controles así como a la enzima. La variación que se encontró en el valor del peso molecular resultó de cromatografiar a la enzima en dos ocasiones. Cuando la $SGST_{26.5}$ se desnaturalizó con SDS más 2- β -mercaptoetanol y se analizó en PAGE, se obtuvo una sola banda de 26.5 kDa \pm 500 (Fig. 6c). Este resultado confirmó la homogeneidad de la enzima así como su constitución dimérica.

Estructura oligomérica

La figura 8 muestra las gráficas de la velocidad fraccional de la $SGST_{26.5}$ frente al logaritmo de la concentración de los inhibidores AC, TFC y BST, respectivamente. Todas las graficas resultaron tener líneas simétricas con un punto de inflexión en la dosis de inhibición al 50%. El valor de las pendientes máximas, obtenido en cada uno de los puntos de inflexión, resultó ser -0.55 para el BST y de -0.6 , tanto para el TFC como para el AC. Adicionalmente, la tabla 8 presenta los datos que evaluaron las sensibilidades de las curvas de la VF frente al $\log [I]$. Comparando estos valores –generados por los inhibidores– con los predichos, propios de una enzima homodimérica, se encontró una gran similitud entre ellos.

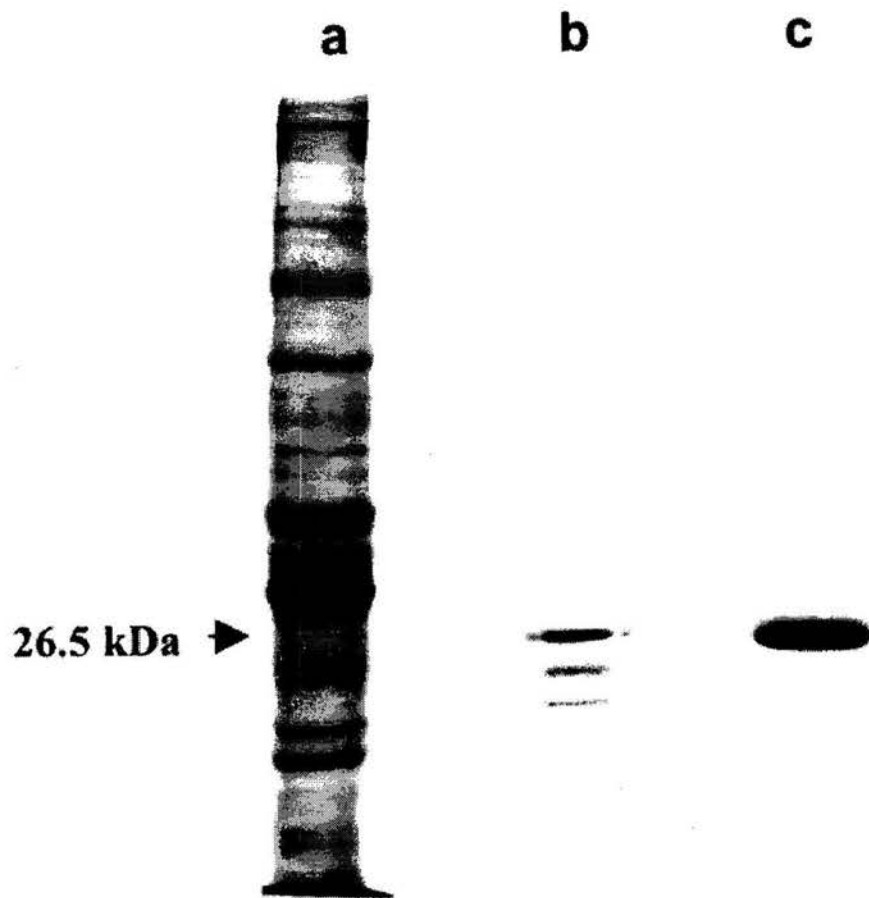


Figura 6. Análisis del procedimiento de purificación de $SGST_{26.5}$ por PAGE-SDS al 10%. Columna (a) extracto crudo de metacestodo (ECM), columna (b) fracción SGSTF, columna (c) glutatión S-transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de *T. solium* ($SGST_{26.5}$). Todas las muestras se redujeron con 1% de β mercaptoetanol.

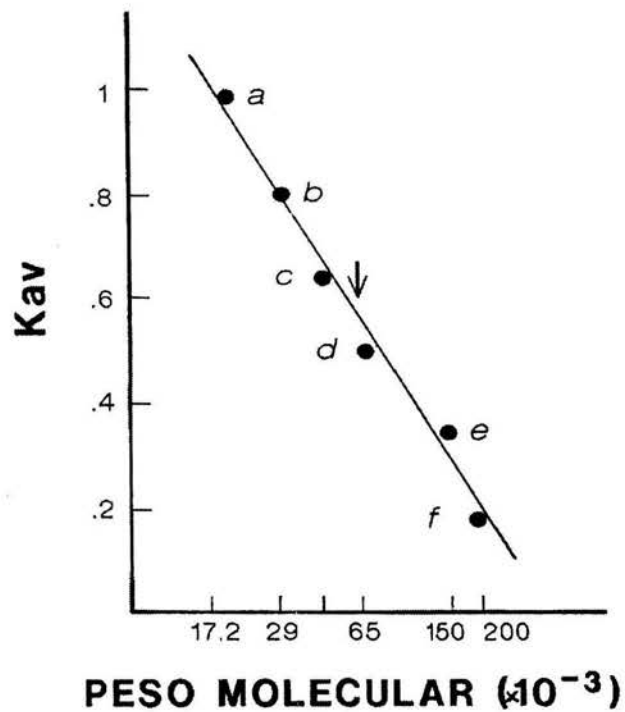


Fig. 7. Gráfica del coeficiente de partición (Kav) versus el peso molecular. Se aplicaron diversas proteínas como marcadores de peso molecular. La flecha indica el valor obtenido por la $SGST_{26.5}$. a) mioglobina (Mr = 17.2), b) anhidrasa carbónica de eritrocitos de borrego (Mr = 29), c) ovoalbumina (Mr = 43), d) albúmina sérica bovina, (Mr = 66), e) deshidrogenasa alcoholica de levadura (Mr = 150), f) β galactosidasa (Mr = 200). Los valores dentro de los paréntesis están dados en kDa.

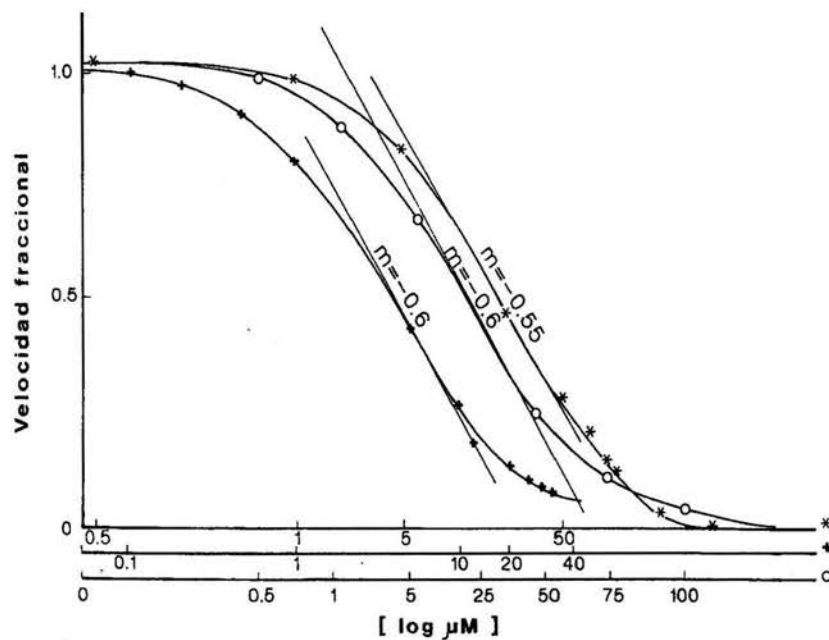


Fig. 8. Composición gráfica de las velocidades fraccionales (VF) desarrolladas por la $SGST_{26.5}$ frente al logaritmo de la concentración del azul de cibacrón (O), cloruro de trifeniltin (+) y bromuro de sulfaleína (*). Cada línea recta indica el valor máximo de la pendiente al 50% de inhibición que se espera para una gráfica descrita por la ecuación de la VF. Para una enzima homodímera.

Tabla 8. Parámetros inhibitorios para evaluar la forma de la curva de VF frente al log [I].

Inhibidor	Parámetros		
	I_{10} / I_{50}	I_{80} / I_{50}	I_{90} / I_{50}
BST	0.09	3.5	8
TPT	0.09	3.2	7.1
CB	0.2	5	8
Valores predichos para una enzima homodimera	0.1	4	9

Especificidad de sustrato

La tabla 9 muestra las diversas actividades específicas desarrolladas por la $SGST_{26.5}$ frente a una variedad de sustratos, característicos para evaluar a las GSTs. La enzima parasitaria desarrolló la máxima actividad con el CDNB, que es el sustrato "universal" para las GSTs, seguido por el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno, el 2-4-hexadienal y con la menor actividad para el *trans*-2-nonenal. La $SGST_{26.5}$ no tuvo actividad enzimática para la mayoría de los sustratos analizados, como la bromosulfaleina de sodio, el ácido etacrínico, el 1,2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi) propano, el hidroperóxido de cumeno y el peróxido de hidrógeno.

Tabla 9. Actividades específicas de SGST_{26.5} con diversos sustratos

Substratos	($\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
1-cloro-2,4-dinitrobenceno	83.33
1,2-di-cloro-4-nitrobenceno	7.1
Bromosulfaleina	ND
Ácido etacrínico	ND
1,2-epoxi-3-(p-nitofenoxi)propano	ND
hexa-2,4-di-enal	6.6
<i>trans</i> -non-2-enal	0.7
hidroperóxido de cumeno	ND
peróxido de hidrógeno	ND

ND no detectada

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la SGST_{26.5}

La Fig. 9 (curva a), presenta el comportamiento de la actividad enzimática en función del pH utilizado en el ensayo enzimático. La actividad óptima se obtuvo en el intervalo de 6.5 - 7.0 y decrece rápidamente en ambos lados del máximo. Estos resultados son parecidos a los reportados para otras GSTs. En la Fig 9 (curva b), se muestra la estabilidad de la enzima por el efecto del pH al que estuvo sometida durante 4 horas. La figura indica que la SGST_{26.5} fue estable en un intervalo de pH 4.5 – 8.5; es decir, la enzima logra conservar sus grupos ionizables en una forma apropiada para mantener la conformación de su sitio activo en este intervalo de pH.

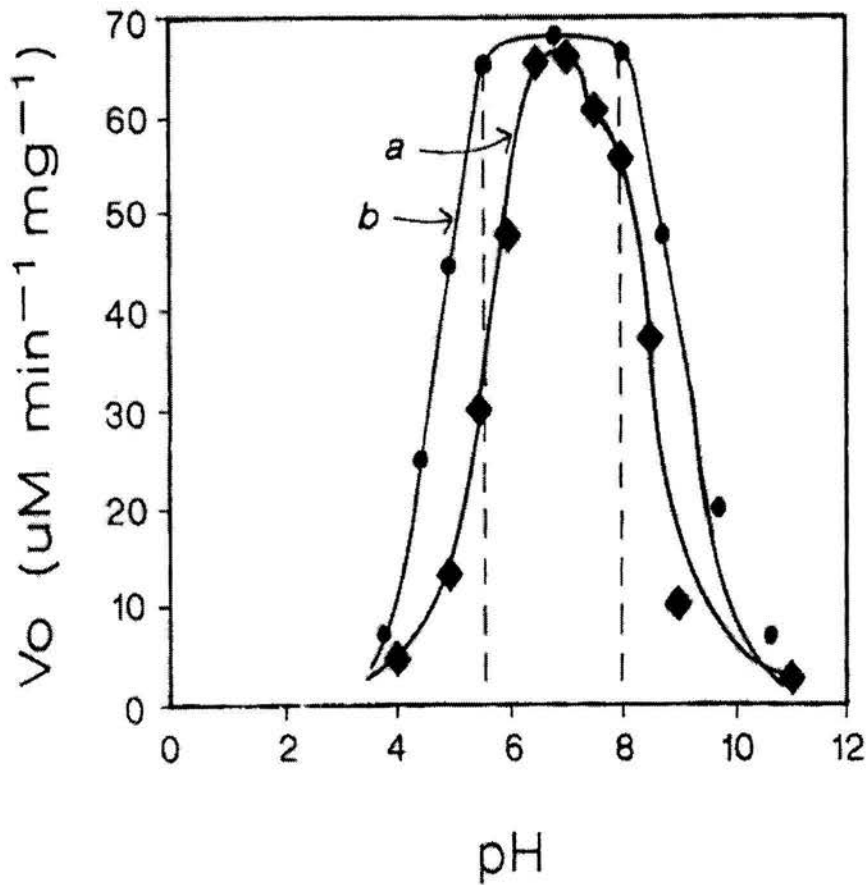


Fig. 9. Efecto del pH sobre la actividad enzimática y estabilidad de la $\text{SGST}_{26.5}$. En la curva (a) se muestra la variación de la actividad entre los pH 4 a 11 debido a la capacidad del pH de ionizar los grupos ionizables, entre otros, los situados en el sitio activo. La curva (b), referente a la estabilidad de la enzima, indica la disminución de la actividad por debajo del pH 5.5 ó por encima del pH 8.0 debido a la desnaturalización de la $\text{SGST}_{26.5}$.

Efecto de la temperatura sobre la $SGST_{26.5}$

La Fig. 10 muestra el porcentaje de la actividad enzimática de la $SGST_{26.5}$ en función de la temperatura a la cual se realizó el ensayo enzimático. Se puede observar que la enzima se mantuvo estable en el intervalo de 10 °C hasta los 40 °C. Temperaturas más elevadas produjeron la inactivación gradual de la enzima hasta su completa inactivación a partir de los 75 °C. Adicionalmente incubaciones de la enzima durante 30 minutos a 20 °C y a 37 °C no modificaron su actividad.

Determinación de las constantes catalíticas

La Fig. 11 presenta los resultados de la evaluación del cambio de absorbancia por unidad de tiempo de las reacciones enzimáticas de la $SGST_{26.5}$, utilizando diversas concentraciones de GSH y a concentración saturante del CDNB. Las pendientes de las rectas se fueron incrementando conforme se incrementó la concentración del GSH, hasta no presentar cambios a niveles de saturación del GSH. De manera similar, La Fig.12, presenta los resultados de las reacciones enzimáticas de la $SGST_{26.5}$ con diversas concentraciones de CDNB y la del GSH a saturación. Podemos observar en ambas gráficas un comportamiento semejante.

Al analizar los datos de la Fig. 11 y 12 en gráficas de la V_o frente a la concentración del sustrato, se obtuvieron las Figs. 13 y 14 para el GSH y CDNB, respectivamente. Ambas gráficas mostraron una hipérbola rectangular con límites de V_{max} y K_m características de enzimas que se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten. Para tener valores más precisos de las constantes catalíticas se construyeron gráficas de Lineweaver-Burk con los

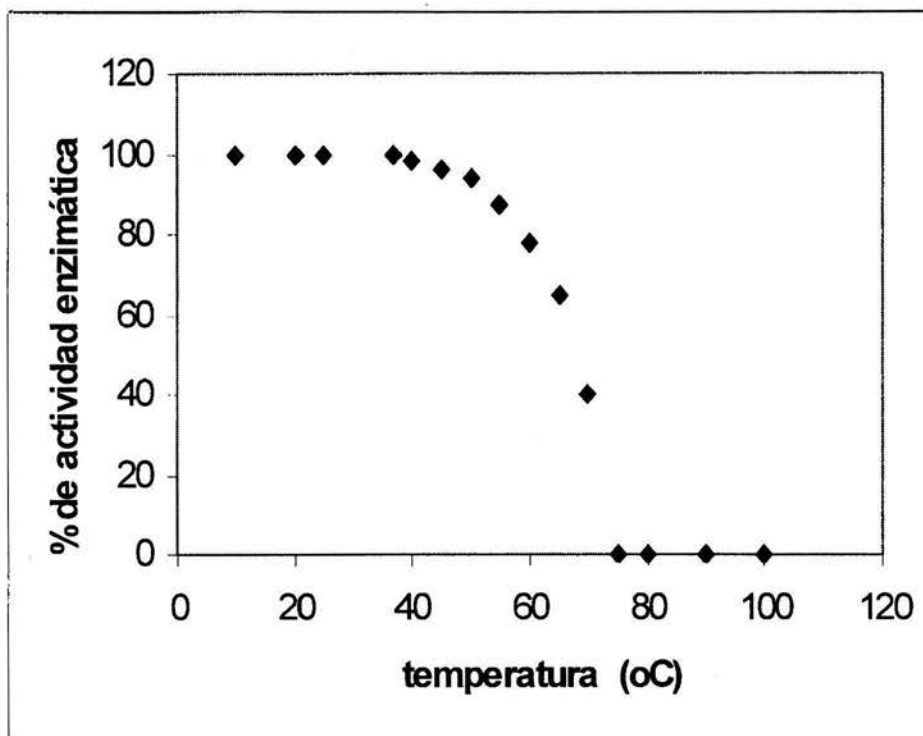


Fig. 10. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la SGST_{26.5}. La enzima mostró una actividad óptima en un intervalo de 10 – 42°C.

datos de las Figs, 13 y 14. La Fig. 15 muestra la gráfica de la doble recíproca para la $SGST_{26.5}$ frente a diversas concentraciones de GSH. A partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max(GSH)} = 78 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $K_{m(GSH)} = 1.3 \text{ mM}$. La Fig. 16 es la gráfica de la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en función de las concentraciones empleadas con CDNB. De esta forma se aprecia que la $V_{max(CDNB)} = 83 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y la $K_{m(CDNB)} = 0.5 \text{ mM}$.

Estudios de inhibición (I_{50} , K_i y tipo de inhibición)

En la figura 17 se presentan las gráficas del porcentaje de la actividad residual (% actividad) de la $SGST_{26.5}$ frente a las concentraciones de BST, TFC y AC, respectivamente. Los valores de las I_{50} fueron: para el AC = $0.5 \mu M$, para el TFC = $21.8 \mu M$ y para el BST = $3.8 \mu M$. Estos valores se situaron dentro del intervalo que identifica a las GSTs de la clase μ y α .

Cuando se utilizó al CDNB como substrato variable en los ensayos de inhibición, se identificó que los tres inhibidores empleados desarrollaron el tipo de inhibición no competitiva sobre la $SGST_{26.5}$. Este efecto se muestra en las Fig. 18, 19 y 20 para el BST, TFC y AC, respectivamente, donde los tres inhibidores produjeron una disminución en las V_{max} de las reacciones sin modificarse la K_m , siendo tal efecto característico de este tipo de inhibición. El graficar los valores de las pendientes ($m = K_m/V_{max}$) de las Figs. 18, 19 y 20 frente a las concentraciones del respectivo inhibidor, proporcionaron valores de $K_{iapp} = 4 \mu M$, $0.4 \mu M$ y $0.35 \mu M$ para el BST, TFC y AC respectivamente (Figs.

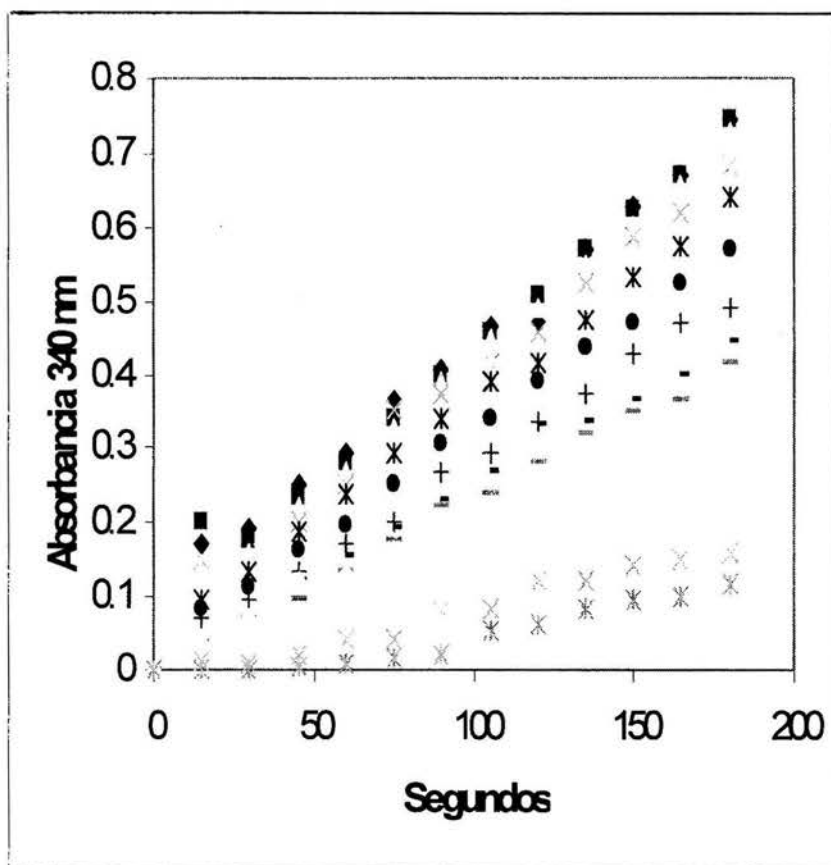


Fig. 11. Gráfica del cambio de absorbancia a 340 nm por unidad de tiempo de la $SGST_{26.5}$ frente a concentraciones variables de CDNB: 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 mM. El GSH se utilizó a saturación (10 mM). Cada pendiente representa el valor de la velocidad inicial para una determinada concentración de CDNB.

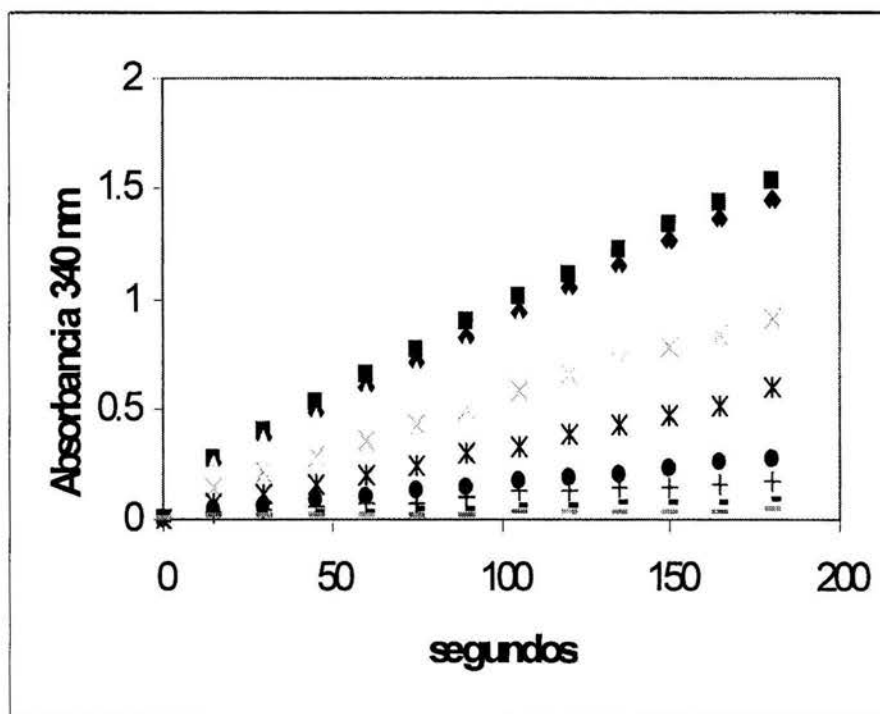


Fig. 12. Gráfica de la absorbancia a 340 nm en función del tiempo de reacción de la SGST_{26.5} frente a concentraciones variables de GSH: 0.12, 0.185, 0.25, 0.375, 0.5, 0.61, 0.75, 0.875, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 mM. El CDNB se utilizó a saturación (7 mM). Cada pendiente representa el valor de la velocidad inicial para una determinada concentración de GSH.

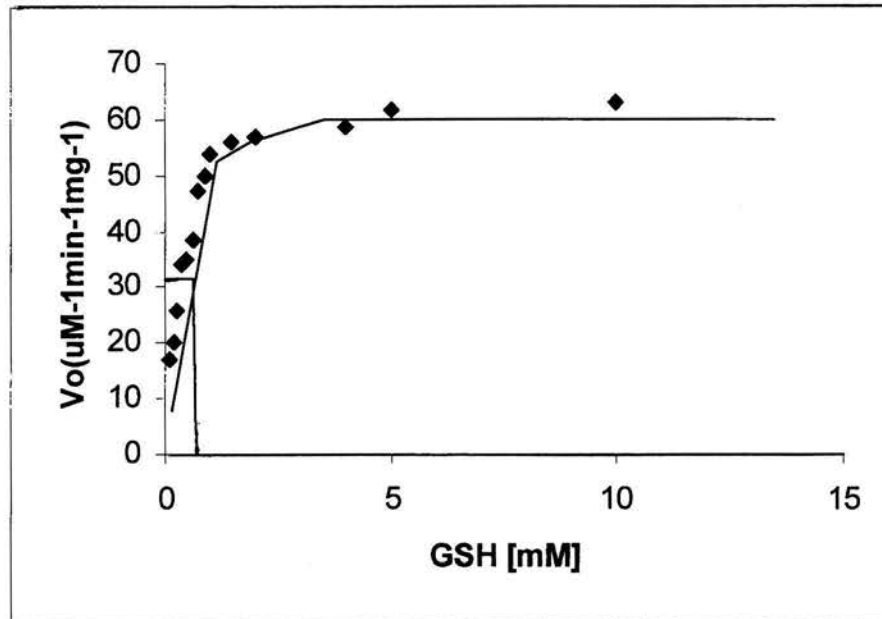


Fig. 13. Curva de la velocidad inicial frente a la concentración del GSH. Los valores de la grafica 11 se emplearon para construir esta grafica.

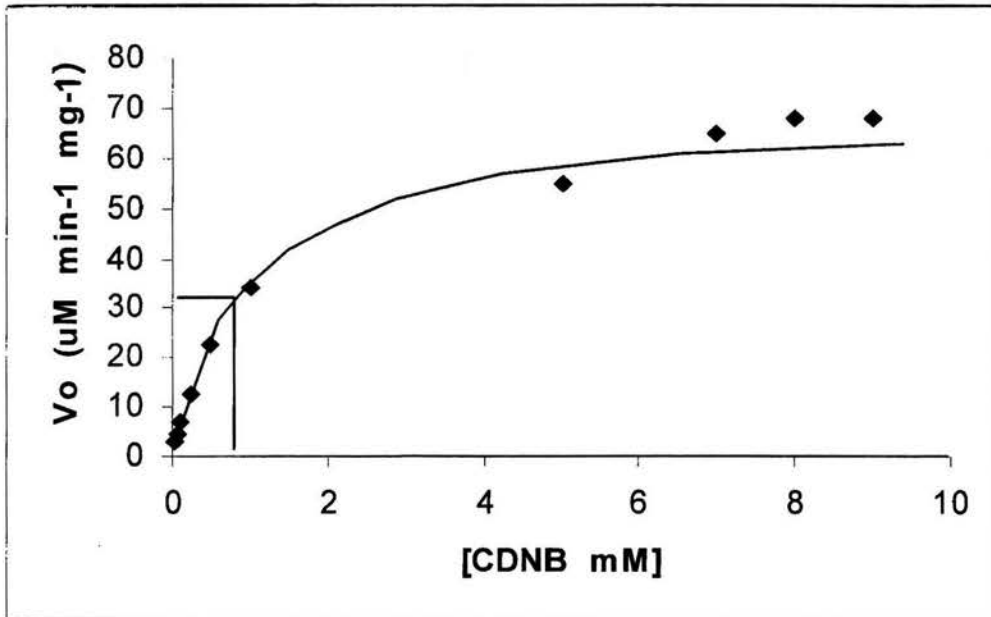


Fig. 14. Curva de la velocidad inicial frente a la concentración del CDNB. Los valores de la gráfica 12 se emplearon para construir esta gráfica.

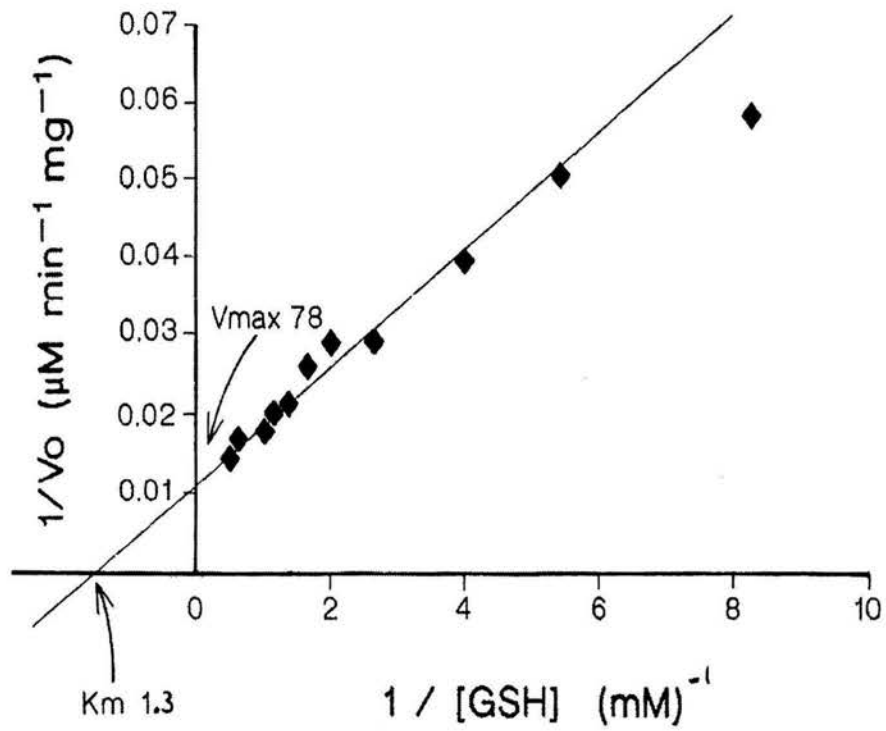


Fig. 15. Gráfica de Lineweaver-Burk o de la doble recíproca construida con los datos de la Fig. 13. Se aprecia el valor de la $K_m_{(GSH)_{ap}} = 1.3$ y de la $V_{\text{max}}_{(GSH)_{ap}} = 78 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

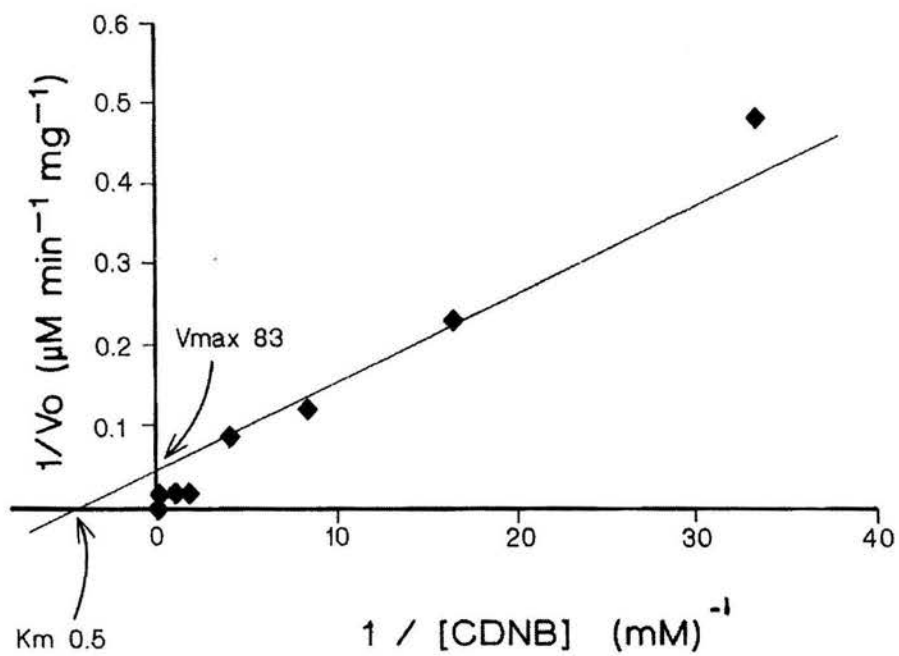


Fig. 16. Gráfica de Lineweaver-Burk o de la doble recíproca construida con los datos de la Fig. 14. Se aprecia el valor de la $K_{m_{(CDNB)_{ap}}} = 0.5$ y de la $V_{\text{max}_{(CDNB)_{ap}}} = 83 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

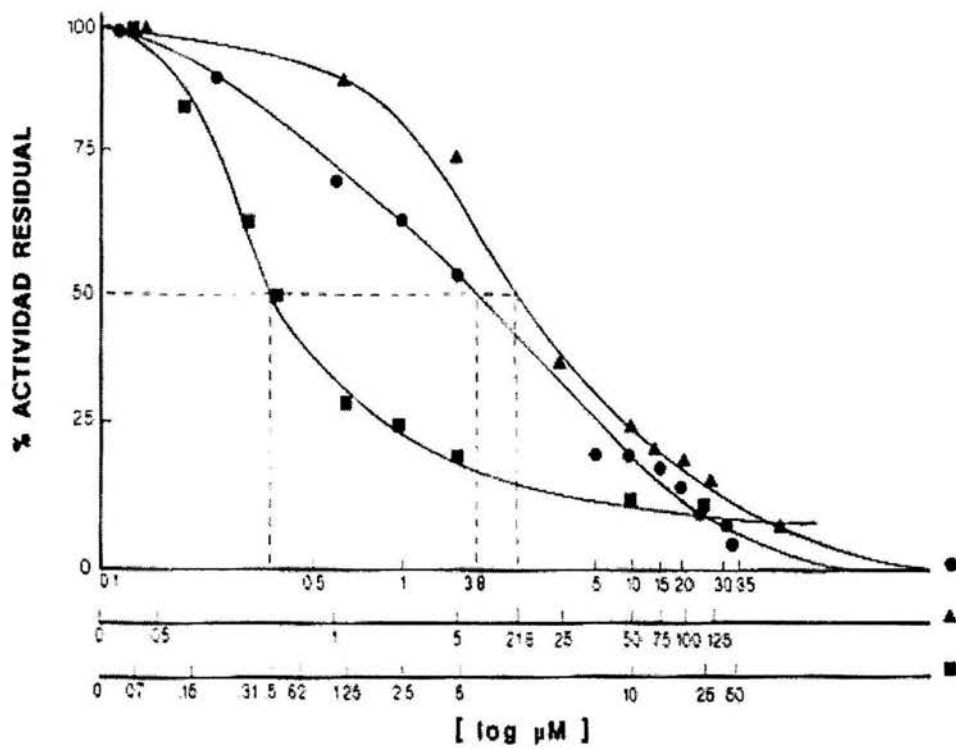


Fig. 17. Composición gráfica de la inhibición al 50% de la actividad enzimática de la $SGST_{26}$ y concentración del inhibidor para lograr este efecto: TFC ($3.8 \mu M$) (●), BST ($21.8 \mu M$) (▲) y AC ($0.5 \mu M$) (■).

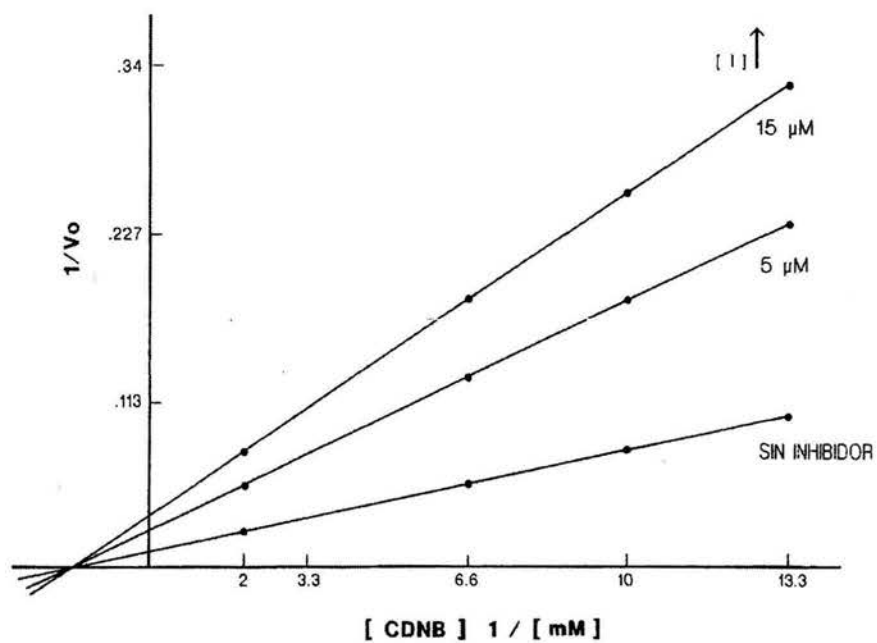


Fig. 18. Gráfica de Lineweaver-Burk del inverso de la velocidad inicial ($\mu\text{M mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) frente a $1 / [\text{CDNB}]$ tanto en ausencia de inhibidor como en presencia de 5 y 15 μM de bromuro de sulfaleina. La gráfica indica una inhibición del tipo no competitivo.

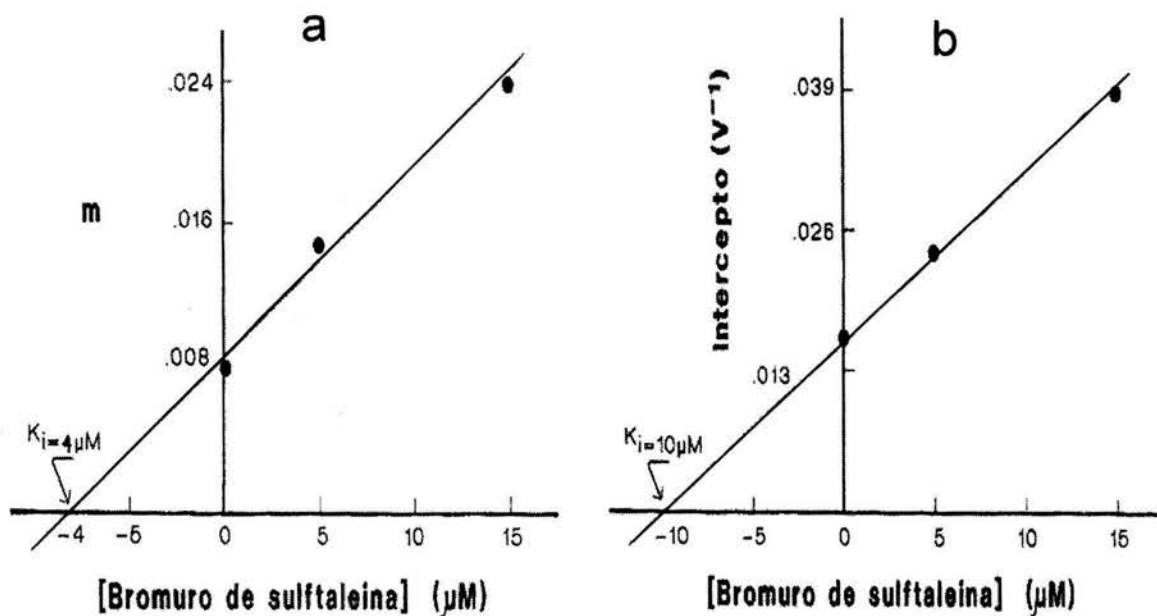


Fig. 18 (a) Gráfica de los valores de las pendientes ($m = K_m/V_{max}$) obtenidas de la Fig. 18 frente a la concentración del BST. De esta gráfica se obtuvo el valor de la $K_i = 4 \mu\text{M}$ para el BST. (b) Gráfica de los valores de $1/V_{max}$ o intercepto de la Fig. 18 frente a la concentración de BST de donde se obtuvo la K_i de disociación = $10 \mu\text{M}$.

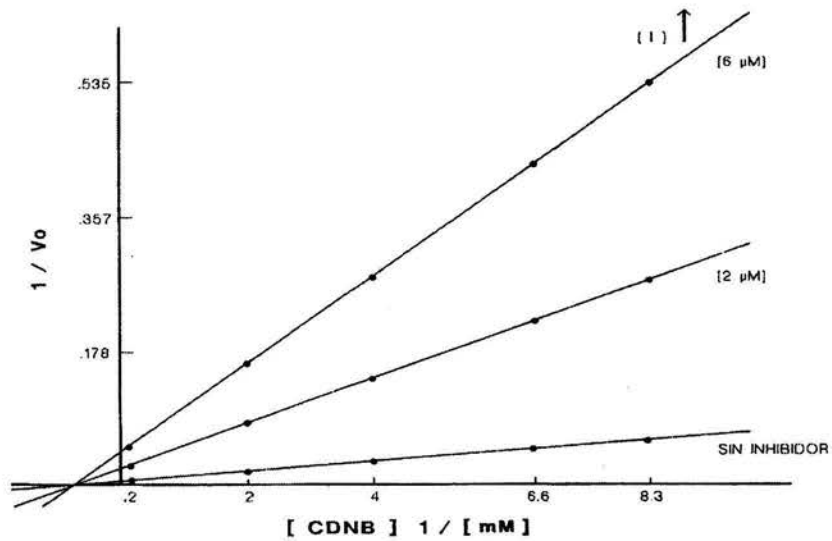


Fig. 19. Gráfica de Lineweaver-Burk del inverso de la velocidad inicial ($\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) frente a $1 / [\text{CDNB}]$ en ausencia de inhibidor y en presencia de 2 y 6 μM de cloruro de trifeniltin. La gráfica indica una inhibición del tipo no competitivo.

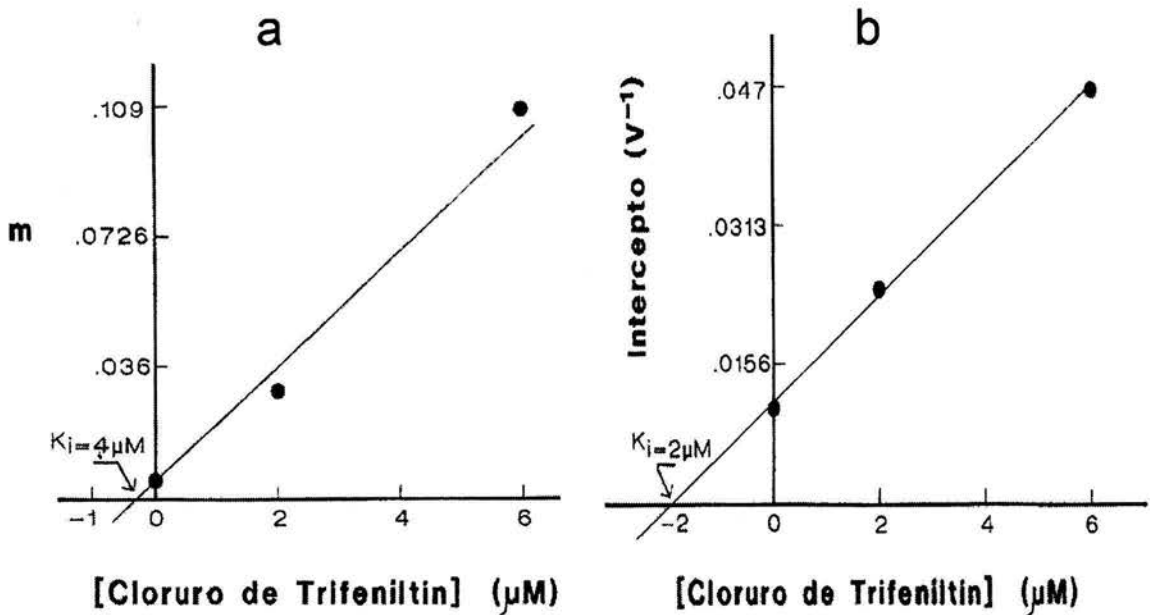


Fig. 19 (a). Gráfica de los valores de las pendientes ($m = K_m/V_{max}$) obtenidas de la Fig. 19 frente a la concentración del TFC. De esta gráfica se obtuvo el valor de la $K_i = 0.4 \mu\text{M}$ para el TFC. (b) Gráfica de los valores de $1/V_{max}$ o intercepto de la Fig. 19 frente a la concentración de TFC de donde se obtuvo la K_i de disociación = $2 \mu\text{M}$.

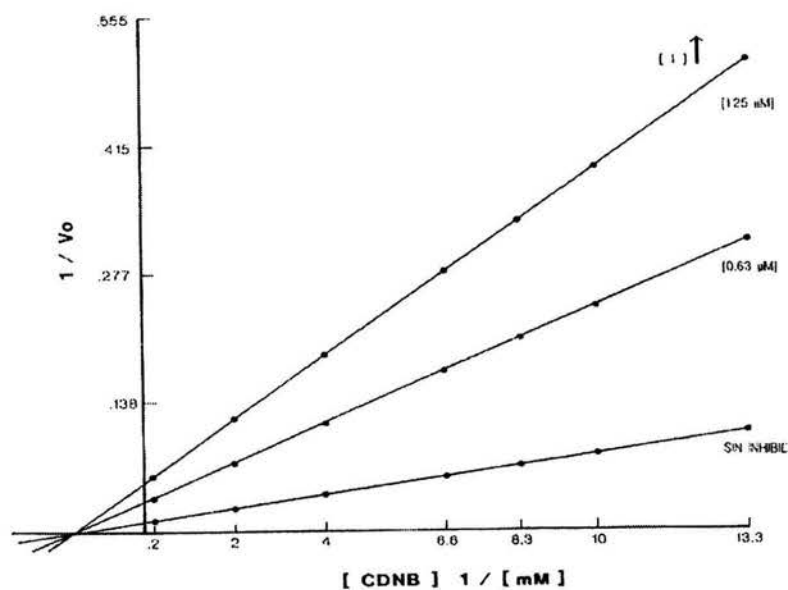


Fig. 20. Gráfica de Lineweaver-Burk del inverso de la velocidad inicial ($\mu\text{M mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) frente a $1 / [\text{CDNB}]$ en ausencia de inhibidor y en presencia de 0.63 y 1.25 μM de azul de cibacron. La gráfica indica una inhibición del tipo no competitivo.

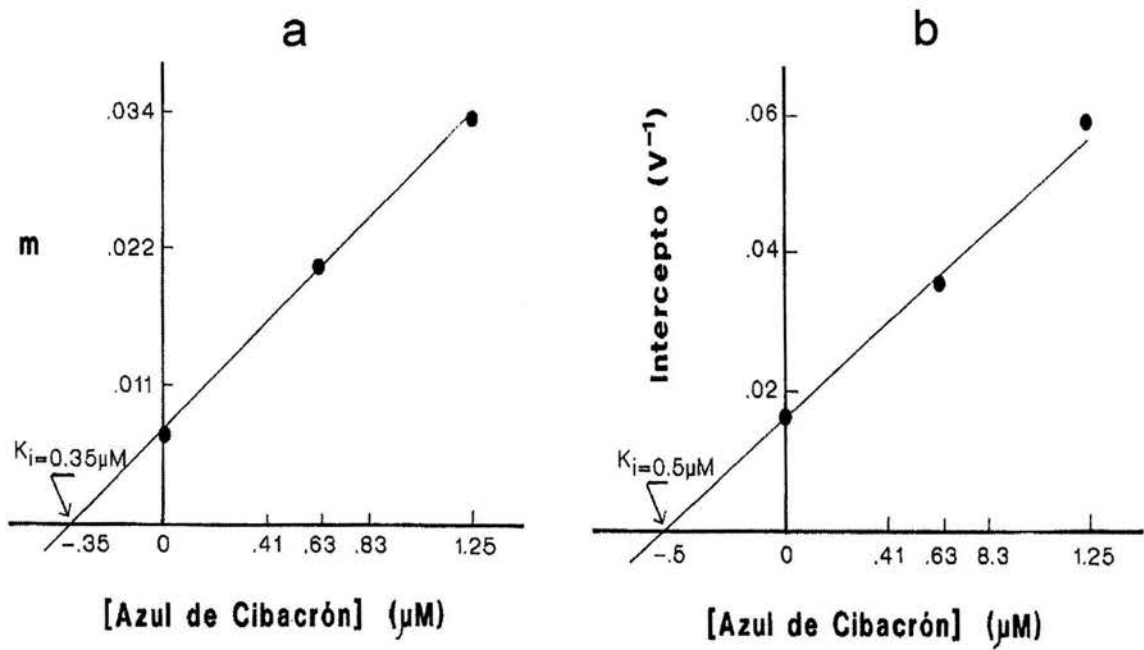


Fig. 20 (a) Gráfica de los valores de las pendientes ($m = K_m/V_{max}$) obtenidas de la Fig. 20 frente a la concentración del azul de cibacron. De esta gráfica se obtuvo el valor de la $K_i = 0.35 \mu M$ para el AC. (b) Gráfica de los valores de $1 / V_{max}$ o intercepto de la Fig. 20 frente a la concentración de AC de donde se obtuvo la K_i de disociación = $0.5 \mu M$ para el AC.

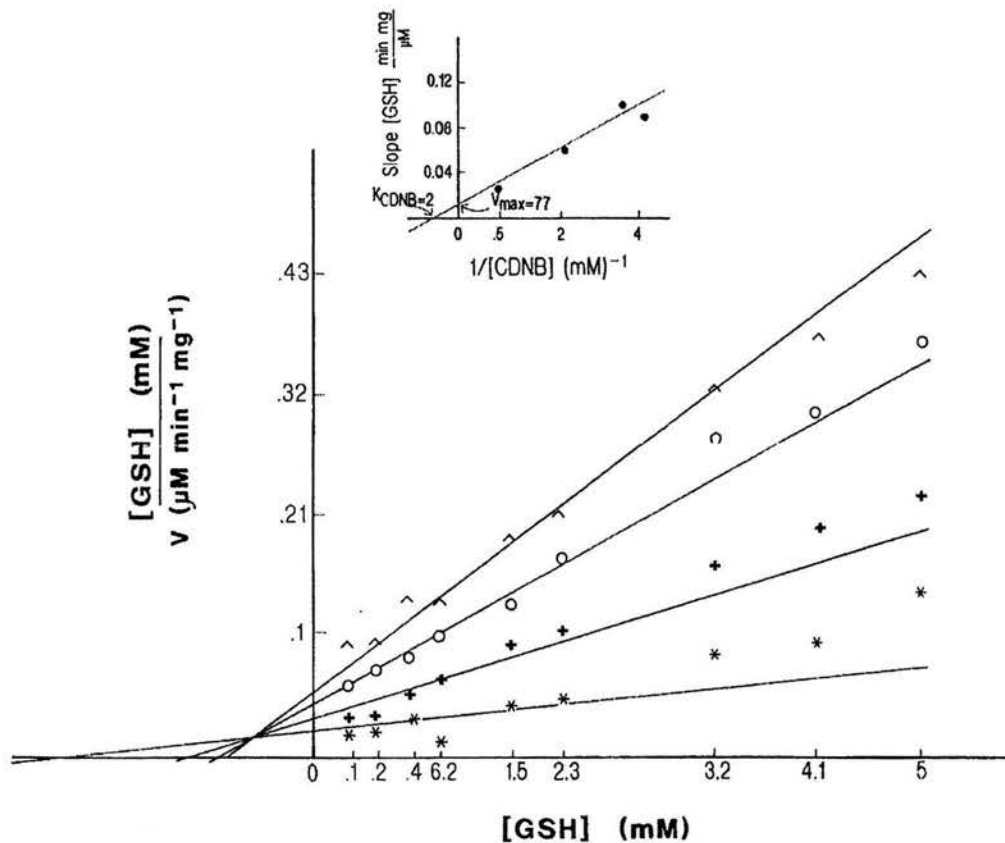


Fig. 21. Gráfica de Hanes-Woolf de $[GSH]/V$ (min) frente a $[GSH]$ (mM)⁻¹ en presencia de 0.25 mM (^), 0.3 mM (o), 0.5 mM (+) y 2 mM (*) de CDNB. La grafica insertada es la grafica secundaria con los valores de las pendientes obtenidos de la gráfica original de Hanes-Woolf para determinar los valores reales de $K_{m(CDNB)} = 2$ y $V_{max(CDNB)} = 77$.

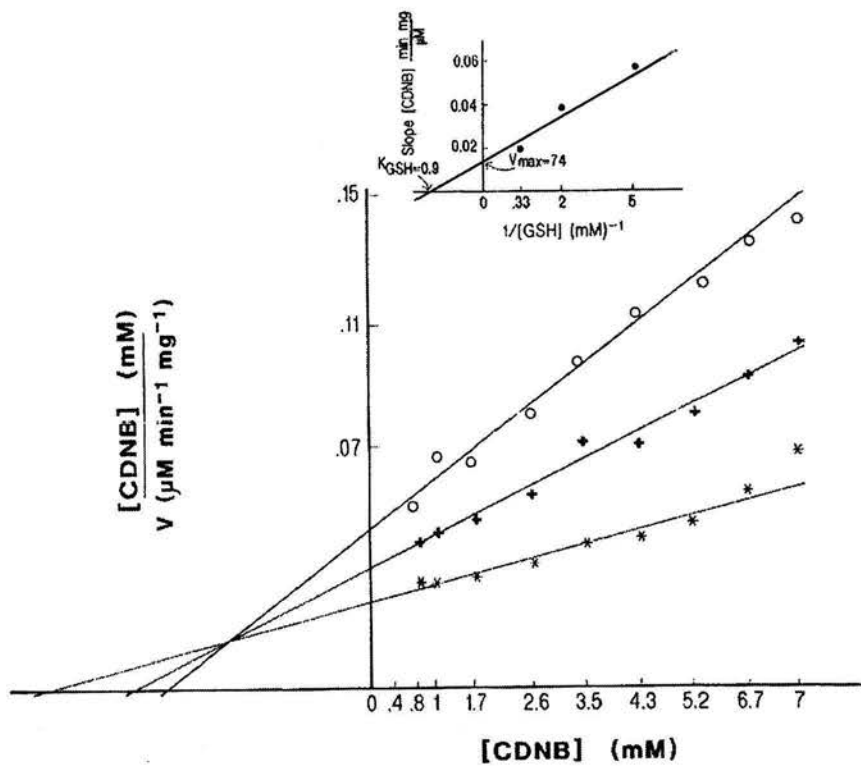


Fig. 22. Gráfica de Hanes-Woolf de $[CDNB]/V$ (min) frente $[CDNB]$ (mM) $^{-1}$ en presencia de 0.2 mM (o), 0.5 mM (+) y 3 mM (*) de GSH. La gráfica insertada es la gráfica secundaria con los valores de las pendientes obtenidos de la gráfica original de Hanes-Woolf para determinar los valores reales de $K_{m(GSH)} = 0.9$ y $V_{max(GSH)} = 74$.

18a, 19a y 20a). Sin embargo, el graficar los valores de los interceptos de las gráficas 18, 19 y 20 frente a la concentración de los inhibidores originaron los valores de las constantes de disociación K_I del complejo GSH-inhibidor. Estos últimos valores fueron $K_{i_{BST}} = 10 \mu\text{M}$, $K_{i_{TFC}} = 2 \mu\text{M}$ y $K_{i_{AC}} = 0.5 \mu\text{M}$, (Figs. 18b, 19b y 20b, respectivamente). Este hecho, así como el que en las 3 últimas gráficas se obtuvieron líneas rectas y no hipérbolas reafirmaron la condición del tipo de inhibición no competitivo.

Cinéticas de estado estacionario en enzimas con mas de un substrato

Con el objeto de conocer el mecanismo cinético desarrollado por la $\text{SGST}_{26.5}$, así como determinar sus parámetros cinéticos, se llevaron a cabo diversos ensayos enzimáticos. Se empleó una matriz de 9 diferentes concentraciones de GSH x 9 concentraciones diferentes de CDNB para realizar los experimentos. Las Figs. 21 y 22 muestran las graficas de Hanes-Woolf las cuales describen un sistema bi bi de estado estacionario ordenado. De las gráficas insertas en cada una de ellas se obtuvieron los valores reales para la $K_{m(\text{GSH})} = 0.9 \text{ mM}$, $K_{m(\text{CDNB})} = 2 \text{ mM}$ así como los valores de la $V_{\text{max}(\text{GSH})} = 77 \mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y $V_{\text{max}(\text{CDNB})} = 74 \mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

Discusión

Las glutatión S-transferasas (GST) (E.C. 2.5.1.18) son enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre presente en el glutatión, γ -glutamilcisteinilglicina (GSH), sobre los grupos electrofílicos de diversos compuestos xenobióticos o endobióticos, los cuales son los substratos secundarios de estas enzimas.

Un aspecto característico de las GSTs es formar una familia de isoenzimas. Las GSTs se encuentran ampliamente distribuidas prácticamente en cualquier especie aerobia; además hay organismos que pueden presentar diferentes GSTs en función del tipo de tejido. Inclusive su concentración puede modificarse por efectos inductores debido a compuestos tóxicos. En el caso particular de *T. solium* hay dos GSTs, una de ellas clonada rSGST_{25.5} (149), la SGST_{26.5} así como otras dos posibles (Fig. 7). En el presente trabajo se logró purificar a la SGST_{26.5} en forma homogénea y gracias a esto se realizaron diversos estudios con la SGST_{26.5}.

El procedimiento de purificación para obtener a la SGST_{26.5} en forma homogénea fue el utilizado por una gran cantidad de grupos de investigación. Éste se basó en la afinidad específica de la enzima hacia el GSH para concentrarla y eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes, además de identificar a la enzima en función de su punto isoeléctrico así como su actividad enzimática. Sin embargo, la eficiencia en el procedimiento de purificación fue baja; estos datos fueron similares a los obtenidos por Brophy y Barret (110). Estos investigadores proponen que el bajo rendimiento se debe a factores bloqueadores, que se acompañan en el proceso de purificación e impiden una unión adecuada de la enzima a la columna de afinidad Sefarosa-

GSH. También postularon que estos factores bloqueadores podrían funcionar como moléculas reguladoras de las GSTs. Otra explicación, para esta misma observación es que la enzima pudiera tener en forma natural su sitio G ocupado con GSH. De ser así, durante la purificación, la enzima tendría una baja capacidad para interaccionar con las moléculas de GSH unidas a la columna de afinidad, y una parte de ella se perdería en la fracción que se excluye.

Por otro lado, al analizar el rendimiento en la purificación de las GSTs que se encuentran en la fracción LVcb, (Tabla 7), se observó un incremento de más del doble. También, la actividad específica se incrementó en aproximadamente 27 veces. Al comparar estos datos, con los relacionados a la fracción SGSTF (Tabla 6), se puede especular que las GSTs del parásito situadas en el líquido vesicular difieren de las citosólicas en varias cosas. Estas GSTs, no contienen GSH en su sitio G, probablemente exista una diferencia en la concentración de GSH entre los tejidos del parásito y su líquido vesicular. También es probable que en el líquido vesicular, no este presente algún inhibidor, como sugiere Brophy y Barret (110) o que es eliminado durante el proceso de purificación porque esta unido a la enzima con menor fuerza que en las GSTs citoplásmicas.

Desde el punto de vista fisiológico, la existencia de estas enzimas en el compartimiento vesicular estaría más de acuerdo con su capacidad de unir en forma covalente (detoxificación pasiva), a diversas moléculas que transportan desde los tejidos a este sitio, que el de prestar algún papel detoxificante catalítico. Es decir, comúnmente se ha aceptado que el compartimiento donde se encuentra el líquido vesicular es un sitio donde se acumulan los productos

de desecho del metabolismo parasitario. Por esta razón, si ya están fuera de las células los productos tóxicos, o hay productos tóxicos en el LVC, el papel detoxificante catalítico o pasivo de la enzima no concluya en la Fase III de detoxificación (vía del ácido mercaptúrico).

El peso molecular nativo para la SGST_{26.5} fue de ~ 60 kDa. Este valor resulta ser ligeramente más elevado en comparación con la mayoría de las GSTs de vertebrados, pero similar al de la enzima de algunos invertebrados (104). El peso molecular determinado para las subunidades resultó ser de ~ 26.5 kDa, el cual es muy parecido para la mayoría de las GSTs de cualquier especie (133). Estos datos apoyan el hecho de que la SGST_{26.5} de *T. solium* esta formada de dos subunidades como la mayoría de las GSTs.

La máxima actividad enzimática desarrollada por la SGST_{26.5} fue a pH de 6.5 – 7.0. Este dato concuerda con la función catalítica que tienen las GSTs (150, 151).

La mayoría de estas enzimas están constituidas por estructuras diméricas de subunidades idénticas o similares. Cada subunidad esta formada por dos dominios conectados por una secuencia corta que los une (Fig.2). Existe un sitio activo por subunidad que es independiente de la de su vecino. Uno de los residuos catalíticamente importantes para activar al grupo sulfhídrico del GSH es la tirosina. Así, a pH fisiológico el residuo de tirosina del centro catalítico actúa como una base promoviendo la abstracción de un protón del tiol del GSH y creando así un anión tiolato con una reactividad altamente nucleofílica. Después de esto, la reacción enzimática continúa con el ataque nucleofílico sobre el centro de una variedad de sustratos xenobióticos y endobióticos.

La actividad específica de la enzima pura, desarrollada para el CDNB, fue alta comparándola con las publicadas para las GSTs de tremátodos y cestodos (149, 152, 153). La SGST_{26.5} también catalizó a los substratos 1,2-dicloro-4-nitrobenceno, al hexa-2,4-dienal y al *trans*-non-2-enal, los últimos dos característicos de los sistemas de la Fase II de detoxificación. Por otro lado, la SGST_{26.5} no presentó actividad de glutatión peroxidasa, debido a que no catalizó la reducción del peróxido de hidrógeno ni del hidroperóxido de cumeno. Adicionalmente, debido a que los valores de la actividad específica de la enzima están dentro del rango de los substratos que caracterizan a las GSTs de la clase μ y α , podría situarse a la SGST_{26.5} dentro de estas familias moleculares.

Los estudios de inhibición en la enzimología son una herramienta útil porque permiten establecer algunas características de las enzimas, como su especificidad, mecanismos de acción y la naturaleza de los grupos funcionales del sitio activo, entre otros. Existen tres tipos principales de inhibición enzimática reversibles: competitiva, no competitiva y acompetitiva; estos tipos inhibitorios se pueden diferenciar experimentalmente por medio de análisis gráfico. Adicionalmente, los efectos inhibitorios realizados por diversos compuestos químicos sobre las GSTs, han sido utilizados para apoyar la clasificación establecida de estas enzimas.

Se estudió la sensibilidad de la SGST_{26.5} hacia los inhibidores AC, BST y TFC. Las formas de las gráficas de la actividad residual frente a la concentración del inhibidor fueron típicas de inhibiciones lineares simples para los tres compuestos. La SGST_{26.5} fue menos susceptible hacia estos inhibidores en

comparación con las GSTs de *Moniezia expansa* (152), *Schistosoma mansoni* (153) y una proteína recombinante de *T. solium*, rSGSTF_{25.5} (149). Basándose en que la SGST_{26.5} tuvo valores de susceptibilidad hacia los tres inhibidores dentro del rango que caracteriza a las GSTs, tanto de la clase μ como de la clase α se sugiere que podría clasificarse dentro de estos grupos. Algo similar también se observó con el efecto de los sustratos.

El análisis del tipo de inhibición que desarrollaron los inhibidores sobre la SGST_{26.5} fue realizado por medio de las gráficas de Lineweaver-Bruck. Estas gráficas mostraron que todos los inhibidores actuaron en forma no competitiva sobre la enzima; es decir, los inhibidores no tuvieron un efecto directo sobre el sitio catalítico, sino se unieron a la enzima en cualquier parte de ella excepto en el sitio activo. De acuerdo con ello los inhibidores se unieron reversiblemente, tanto a la enzima libre ($E + I = [EI]$) como a la que se encuentra en forma de complejo con el sustrato ($[ES] + I = [ESI]$). Así, en este tipo de inhibición nunca se establece una competencia entre el sustrato y el inhibidor por el sitio activo enzimático. Aunque durante la reacción enzimática se llega a formar el complejo $[ES]$, este se vuelve inactivo cuando se le une el inhibidor, es decir, el inhibidor, al unirse a la enzima, le confiere cambios que resultan en alterar el sitio activo impidiendo su funcionamiento normal. La formación del complejo $[ESI]$ siempre se establece en presencia del inhibidor, inclusive a altas concentraciones de sustrato. Al existir muy pocos complejos $[ES]$ libres de inhibidor (en comparación con los $[ESI]$), el valor de la V_{max} disminuye en función de la concentración del inhibidor. Sin embargo, debido a que los inhibidores no impiden la formación de los complejos $[ES]$ los valores de la K_m por el sustrato no son alterados.

De esta forma, el patrón de las gráficas Lineweaver-Bruck para la $SGST_{26.5}$, con cualquiera de los tres inhibidores utilizados, mostró una disminución de la V_{max} ($1 / V_o$) dependiente de la concentración del inhibidor; por otra parte, los valores de la K_m no se modificaron, como se determinó al coincidir en el eje de las abscisas ($1 / K_m$) todas las rectas de cada una de las gráficas (Figs. 18, 19 y 20).

La confirmación del tipo de inhibición no competitivo lineal efectuado por los tres inhibidores, se obtuvo al graficar los valores del intercepto de la gráfica de Lineweaver-Burk versus la concentración del inhibidor (Figs. 18b, 19b y 20b). Estas nuevas gráficas mostraron una línea recta; si se hubiera tratado de una inhibición no competitiva parcial, la línea de la gráfica hubiera resultado en una hipérbola. Asimismo, por medio de estas gráficas se obtuvieron los valores de las constantes de disociación inhibitorias a partir del intercepto de la recta en el eje de la concentración de los inhibidores, los cuales resultaron mayores que los valores de las K_i .

La $SGST_{26.5}$, como cualquier GST, cataliza reacciones entre dos sustratos para originar dos productos. Para conocer el mecanismo cinético de la $SGST_{26.5}$, así como los valores verdaderos de la K_m y V_{max} –tanto para el GSH como para el CDNB– se analizaron cinéticas en el estado estacionario. Las gráficas de Hanes-Woolf para $[GSH] / V_o$ versus $[GSH]$ mostraron que a concentraciones crecientes del CDNB, la V_o se incrementó hasta alcanzar los valores de V_{max} y la $K_{m_{appGSH}}$ disminuyó de valor hasta alcanzar el valor de la $K_{m_{GSH}}$. Estos resultados están de acuerdo con un sistema bi bi ordenado (140).

La re-gráfica de la gráfica de Hanes-Woolf para $[GSH] / V_o$ versus $[GSH]$, cuyo eje en Y es la pendiente del GSH versus el $1 / [CDNB]$, indicó un valor para la $K_{m_{CDNB}} = 2 \text{ mM}$ y de $77 \mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ para la V_{max} . En forma similar, la gráfica de $[CDNB] / V_o$ versus $[CDNB]$ mostró el mismo comportamiento al previamente descrito. Se puede observar que conforme se aumenta la concentración del GSH, los valores de la $K_{m_{appCDNB}}$ disminuyen hasta acercarse a la $K_{m_{CDNB}}$. El análisis de su re-gráfica siendo el eje Y la pendiente de CDNB versus $1 / [GSH]$, mostró un valor para la $K_{m_{GSH}} = 0.9 \text{ mM}$ y un valor de $V_{\text{max}_{GSH}} = 74 \mu\text{M min}^{-1}$. Todos estos datos sugieren un sistema en el cual el GSH y el CDNB se combinan con la enzima mediante un mecanismo secuencial ordenado; es decir, el CDNB puede unirse solo al complejo GSH-enzima. Esta observación esta de acuerdo con el mecanismo catalítico establecido para las GSTs (86). Este mecanismo establece que el GSH es modificado en una forma en que participa en la captura del CDNB y lo dispone en una forma apropiada para conjugarlo con él mismo.

Finalmente, se ha demostrado que estudios de inhibición simple, donde se mide la actividad enzimática residual en función de la concentración del inhibidor, pueden ser útiles para distinguir el tipo de oligómero, es decir, homodimeros o heterodimeros, que conforman a las GSTs. Nuestros resultados mostraron que la $SGST_{26.5}$ es una enzima homodimerica.

La caracterización bioquímica realizada en $SGST_{26.5}$ tuvo el objeto de conocer algunos aspectos básicos de cinética enzimática de la enzima. Esta información puede ser potencialmente útil para apoyar al desarrollo de diversas estrategias inmunológicas y farmacológicas que tengan como meta controlar a esta parasitosis (95).

Conclusiones

- Los cisticercos de *T. solium* presentan más de una glutatión S-transferasa.
- La SGST_{26.5} tiene características fisicoquímicas de la clase Mu y Alfa.
- La SGST_{26.5} tiene una actividad catalítica con un número reducido de sustratos
- La SGST_{26.5} tiene una actividad catalítica con sustratos endógenos.
- La SGST_{26.5} podría ser una enzima importante de detoxificación de la Fase II en *T. solium*.
- La SGST_{26.5} realiza un sistema catalítico del tipo bi-bi ordenado.
- La SGST_{26.5} cuenta con parámetros enzimáticos cuantitativos.
- Las propiedades caracterizadas de la SGST_{26.5} son una referencia que permite compararlas con las de otras enzimas y consigo misma al ser sometida a algún tratamiento.
- Estas referencias podrían ser útiles al evaluar a la SGST_{26.5} como una molécula blanco contra la cisticercosis.

Bibliografía

1. Cheng, T. 1986. General Parasitology. Academic Press Collage Division. Hardcourt Brace Hovanovich, Publishers. New York. pp-827.
2. Gemmel. M. A. 1977. Taeniidae: modification to the life span of the egg and the regulation of tapeworm populations. Exp Parasitol 41: 314.
3. Yoshino, K. 1933. Studies on the Post-embryonal development of *Taenia solium*. J Med Formosa 32: 139-141.
4. Prabhakar S, Sing G. 2002. Neurocysticercosis: an overview of clinical presentations In *Taenia solium* cysticercosis. From basic to clinical

- science. Sing G, Prabhakar S (eds) CABI Publishing. Wallingford Oxon, UK. pp-169-176.
5. Rabiela, M. T., Lombardo, L., Flores-Barroeta, F. 1972. Cisticercosis cerebral: análisis de 68 casos de autopsia. *Patol* 10: 27.
 6. Mazzoti, L. 1954. Incidencia de *Cysticercus cellulosae* en cerdos de diferentes localidades de la República Mexicana. *Rev Inst Salub Enf Trop (México)* 14: 53.
 7. Merchant, MT., Aguilar, L., Avila, G., Robert, L., Flisser, A., Willms, K. 1998. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections *J Parasitol* 84: 681-685.
 8. Escobar, A. 1983. The Pathology of Neurocysticercosis In: Palacios E, Rodríguez-Carbajal J, Taveras JM, eds. *Cisticercosis of Central Nervous System*. Springfield: Charles C Thomas pp-27-54.
 9. Carpio A, Escobar A, Hauser WA. 1998. Cysticercosis and epilepsy: A critical review. *Epilepsia* 39: 1025-1040.
 10. Carpio A, Bittencourt PRM. 1999. Epilepsy in the Tropics. In: Chopra JS, Sawney IMS. (eds). *Neurology in the tropics*. New Delhi: B.I. Churchill-Livingstone Pvt Ltd. pp-527-532.
 11. Del Bruto, O. H., Rajshekhar, V., White, A. C., Tsang, V., Nash, T., Takayanagui, O., Schantz, P., Evans, C., Flisser, A., Correa, D., Botero, D., Allan, J., Sarti, E., González, A., Gilman, R., García, H. 2001. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurol* 57: 177-183.
 12. Marquez, H., Austria, B. 1969. Cisticercosis en el Hospital General de México. Estudio anatomopatológico de 155 casos. *Rev Lat Patol* 8: 79.

13. Dixon, H. B. F., Lipscomb, F. M. 1961. Cysticercosis : an analysis and follow up 450 cases. Privy Council Med Res Special Report Ser 229: 1-58.
14. Bourilkov, T., Babadjov, L. 1968. La cysticerose, probleme de diagnostic diferencial en pneumologie. A propos de deux cas. Poumon coeur 24: 239-242.
15. Sánchez-Fontan, R. 1964. Cisticercosis ocular. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.
16. MacArthur, W. P. 1934. Cisticercosis as seen in the British Army, with special reference to the production of epilepsy. Trans R Soc Trop Med. Hyg 27: 343.
17. Garcia, H. H., Del Bruto, O. H. 1999. Heavy nonencephalitic cerebral cisticercosis in tapeworm carriers. Neurol 53: 1582-1584.
18. Del Bruto, O. H., Garcia, H., Prabhakar, S. 2002. Heavy Multilesional cysticercotic síndromes in: *Taenia solium* cisticercosis. From basic to clinical science. Singh, G., Prabhakar, S (eds) CABI Publishing pp-189-197.
19. Garcia, H., Del Bruto, O. H., and the Cysticercosis Working Group in Peru. 1999. Heavy non-encephalitic cerebral cysticercosis in tapeworm carries. Neurol 53: 1582-1584.
20. Keilbach, N., Aluja, A. S., Sarti-Gutierrez, E. 1989. A programme to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*) experiences in a Mexican village. Acta Leiden 57: 181-189.

21. Acha, P., Szyfres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica No 503, OPS pp-763-774.
22. Aluja, A, S., Vargas, G. 1988. The histopatology of porcine cisticercosis. *Vet Parasitol* 28:65-77.
23. Santamaría, E., Plancarte, A., Aluja, A. 2002. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of installation. *J Parasitol* 88: 69-73.
24. Aluja, A., Villalobos, A. N., Plancarte, A., Rodarte, L. F., Hernández, M., Zamora, C., Sciutto, E. 1999 *Taenia solium* cisticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol* 81: 129-135.
25. Arseni, C., and Samitica, O. C. 1957. Cisticercosis of the brain. *Br Med J* 2: 494.
26. Román, G., Sotelo, J., del Bruto, O. 2000. A proposal to declare neurocysticercosis an International reportable disease. *Bull World Health Organ* 78: 399-406.
27. Costero, I. 1946. Tratado de Anatomía Patológica vol 2 México, editorial Atlante.
28. Carpio, A. 1988. Neurología, Temas relevantes. Fac. de Ciencias Médicas. Universidad de Cuenca pp-135-170.
29. Arseni, C., and Cristescu, A. 1972. Epilepsy due to cerebral cisticercosis. *Epilepsy* 16: 256-259.
30. Stepien, L.. 1962. Cerebral cisticercosis in Poland. Clinical symptoms and operative results in 132 cases. *J Neurosurg* 19: 505-509.

31. Nelson, G., S., Pester, F. R., and Rickman, R. 1965. The significance of wild animals in the transmission of cestodes of medical importance in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 59: 507-510.
32. Craig, P. S., Rogan, T. M., Allan, J. C. 1996. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol* 38: 169-250.
33. Schantz, P. M., Wilkins, P. P., Tsang, V. C. W., 1998. Immigrants, imaging, and immunoblot: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: Scheld, W. M., Craig, W. A., Hughes, J. M. (Eds). *Emerging Diseases*, vol. 2, ASM Press, Washington, D.C. pp-213-242.
34. Organización Panamericana de la Salud. 1994. *Epidemiología y Control de la Teniasis y Cisticercosis en América Latina*. OPS/OMS.
35. Moses, A. 1911. Dos métodos biológicos de diagnóstico para la cisticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 3: 322-326.
36. Plancarte, A., Hirota, C., Martinez, Ocaña, J., Mendoza-Hernandez, G., Zenteno, E., Flisser, A. 1999. Immunodominant *Taenia solium* cysticerci antigens GP39-42 and GP24 can be reduced to a 10 kDa protein, probably the monomeric form. *Parasitol Res* 85: 680-684.
37. Nieto D. 1956 Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurol* 6: 725-738.
38. Goldsmith HS, Kagan IC, Reyes-González MA, Cedeño-Ferreira J. 1971 *Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México. I Encuesta*

- de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Bol Sanit Panam 71: 500-518.
39. González-Barranco D, Sandoval M, Trujillo V. 1978. Reacción de inmunofluorescencia indirecta en cisticercosis. Arch Inv Med 9: 51-58.
 40. Espinoza B, Flisser A, Plancarte A, Larralde C. 1982. Immunodiagnosis of human cisticercosis: ELISA and immunoelectrophoresis. In Cisticercosis: Present state of knowledge and perspectives Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds) Academic Press, New York, pp-163-170.
 41. Laclette JP, Shoemaker Ch, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1'. J Immunol 148: 124-128.
 42. Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. 1980. Human cisticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin Exp Immunol. 39: 27-37.
 43. Savigny D, Voller A. 1980. The communication of ELISA data from laboratory to clinician I. Immunoassay 1: 105-128.
 44. Tsang V, Brand AJ, Boyer AE. 1989. An enzyme immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human *Taenia solium* cisticercosis. J Inf Dis 159: 50-59
 45. Wilson, M., Bryan, R. T., Freid, J. A., Ware, D. A., Schantz, P., Pilcher, J. B., Tsang, V. 1991. Clinical evaluation of the cisticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. J Infect Dis 164: 1007-1009.
 46. Larralde, C., Montoya, R. M., Sciutto, E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm in antigens. *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*,

- and *Taenia crassiceps* resolving with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med and Hyg* 40: 282-290.
47. Ostrosky-Zeichner L, Garcia-Mendoza E, Rios C, Sotelo J. 1996. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch Med Res* 27:513-517.
48. Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM. 1998. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol* 89:64-72.
49. Evans, C, A., Garcia, H., Hartnell, H., Gilman, R., Jose, P., Martinez, M., Remick, D., William, T., Friedland, J. 1998. Elevated concentrations of eotaxin and Interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun* 66: 4522-4525.
50. Willms, K., Merchant, M. T. 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscles: ultrastructural and light microscopic observations. *P Immunol* 2: 261.
51. Brophy, P. M., Pritchard, D. I. 1992. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance *Parasitol Today* 8: 419-422.
52. Sotelo, J., Escobedo, F., Rodríguez, Carvajal. J. 1984. Therapy of parenchymal brain cisticercosis with praziquantel. *N Eng J Med* 34: 1137-1139.
53. Patzchke, K., Putter, J., Wegner, L. A. 1979. Serum concentration and renal excretion in humans after oral administration of praziquantel. Results of three determination methods. *Eur J Drug Metab Pharm* 3: 149-156.

54. Overbosh, D., Van de Nes, J., Groll, E. 1988. Penetration of Praziquantel into cerebrospinal fluid in cisticercosis. *Eur J Clin Pharm* 33: 287-292.
55. Watt, G., White, N., Padre, L., Ritter, W., Fernando, M., Ranoa, C., Laughlin, L. 1988. Praziquantel pharmacokinetics and side effects in *Schistosoma japonicum* infected patients with liver disease. *J Infect Dis* 157: 530-535.
56. Jung, H., Medina, R., Castro, N. Corona, T., Sotelo, J. 1997. Pharmacokinetics study of Praziquantel administered alone and in combination with cimetidine in a single-day therapeutic regimen. *Ant A Chem* 41: 1256-1259.
57. Bittencourt, P., Garcia, C., Martins, R. 1992. Phenytoin and carbamazepine decrease oral bioavailability of praziquantel *Neurol* 42: 492-496.
58. Redman, C. A., Robertson, A., Fallo, P. G., Modha, J., Kusel, J. R., Doenhoff, M. J., Martín, R. J. 1996. Praziquantel: An urgent and existing challenge. *Par Today* 12:14-20.
59. Brindley, P. J., Sher, A. 1987. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in dependent on the host antibody response. *J Immunol* 136: 215-220.
60. Marriner, S., Bogan, J. 1980. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Am J Vet Res* 41: 1126-1129.
61. Del Bruto, O. H., Sotelo, J., Aguirre, R. 1992. Albendazole therapy for giant subarachnoid cysticerci. *Arch Neurol* 49: 535-538.

62. Rivera, E., Sotelo, J. 1999. Tratamiento de la neurocisticercosis. En: Cisticercosis del sistema nervioso. Alarcón T. (ed). Abad Cía. Ltda.. Guayaquil, Ecuador. pp-179-192
63. Cotting, J., Zengin, T., Steign, U. 1990. Albendazole kinetics in patients with echinococcosis: delayed absorption and unpaired elimination in cholestasis. Eur J Clin Pharm 38 : 605-608.
64. Mc Tigue, M. A., Williams, D. R., Tainer, J. A. 1995. Cristal structures of a Schistosomal drug and vaccine target: Glutathione S-transferase from Schistosoma japonica and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel J Mol Biol. 246: 21-27
65. Molinari, J. L., Meza, R., Suárez, B., Palacios, B. y Tato, P. 1983. *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. Exp Parasitol 55: 340-357.
66. Diaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gomez-Conde E, Hernandez P, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. 2003. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. Vet Immunol Immunopathol 93: 81-90.
67. Molinari, J. L., Soto, R., Tato., Rodríguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J., Palet, A. 1993. Immunization against porcine cisticercosis in an endemic area in México: a field and laboratory study. Am J Trop Med Hyg 49: 502-512.
68. Kumar, D., Gaur, S., N. S., y Pathak, K., M.,L. 1987. Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and

- second peaks of *Cysticercus cellulosae* scolex antigen. 1987. *Indian J An Sci* 57: 932-935.
69. Nascimento, E., Costa, G., Tavares, C. 1995. Effective immune protection of pigs against cisticercosis. *Vet Immunopathol* 45: 1-2.
70. Manoutcharian, K., Larralde, C., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Govezensky, T., Baca, M., y Sciutto, E. 1996. Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vaccine Col. Spring Harvor Laboratory Press*. 95: 63-68.
71. Plancarte, A., Flisser, A., Gauci, Ch., and Lightowers, M. 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 29: 643-647.
72. Mitchell, G. F., 1989. Glutathione S-transferase potential components of anti-schistosome vaccines *Par Today* 5: 34-37.
73. Ballou, J. M., Sondermeyer, P., Dreyer, D., Capron, M., Grzych, J. M., Pierce, R., Carballo, D., Lecocq, J. P., Capron, A. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes *Nature* 326: 149.
74. Ivanoff, N., Phillips, N., Schacht, Ch., Capron, A., Riveau, G. 1996. Mucosal vaccination against schistosomiasis using liposome-associated SM 28 kDa glutathione S-transferase *Vaccine* 14: 1123-1131.
75. Estuningsih, E., Smooker, P., Wiedosari, E., Widjajanti, S., Vaiano, S., Partoutomo, S., Spithill, T. 1997. Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle *Int J Parasitol* 27: 1419-1428.

76. Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Merchant, M. T., and Landa, A. 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol* 85: 448-453.
77. Rabiela, M. T., Rivas, A., Rodríguez, J. 1979. Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. *Patología* 17:119-136.
78. Flisser, A., Madrazo, Plancarte, A., Schantz, P., Allan, J., Craig, P., Sarti, E. 1993. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniocidal dose of praziquantel. *Lancet* 342: 748.
79. Arechavaleta, F., Molinari, J.L., Tato, P. 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84: 117-122.
80. Molinari, J. L., Mejia, H., Clinton, A. C. 2000. *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes *in vitro*. *Exp Parasitol* 94: 133-142.
81. Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL. 2004. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res* 92: 197-204.
82. Sealey, M., Ramos, C., Willms, K., Ortiz-Ortiz, L. 1981. *Taenia solium*: mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes *Par Immunol* 3: 299-302.
83. Willms, K., Arcos, L. 1977. *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique *Exp Parasitol* 43: 396-398)

84. Callanhan, H. L., Crouch, R. K., James, E.R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitol Today* 4: 218-225.
85. Fantone, J.C. Ward, P. A. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 396-418.
86. Birnboim, H. C. Kanabus-Kaminska, M. 1985. The production of DNA strand breaks in human leukocytes by superoxide anion may involve a metabolic process. *Proc Natl Acad Sci* 82: 6820-6824.
87. Hyslop, P. A., Hinshaw, D. B., Hasley, W. A., Schraufstatter, I., Sauerheber, R., Spragg, R., Jackson, J., Cochrane, Ch. 1988. Mechanism of oxidant mediated cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 263: 1665-1675.
88. Sacks, T., Moldow, C. F., Craddock, P. R., Bowers, T. K., Jacob, H. S. 1978. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An *in vitro* model of immune vascular damage. *J Clin Invest* 61: 1161-1167.
89. Adams, D. O., Hamilton, T. A. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immun* 2: 283-318.
90. Aluja, A., González, D., Rodríguez-Carbajal, J., Flisser, A. 1989. Histological description of tomographic images of *Taenia solium* cysticerci in pig brains. *Clin Imag* 13: 292-298.
91. González, A., Marquez-Monter, H. 1967. Ultraestructura del cisticerco *cellulosae* y *racemosus*. Reunión conjunta de la Sociedad Mexicana de

- Neurología y Psiquiatría, A. C. Minnesota Psych Soc and Minnesota Soc
Neurol Sci Marzo 1-3, México, D. F.
92. Ansari, A., Williams, J. F. 1976. The eosinophilic response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis* J Parasitol 62: 737-744.
93. Fridovich, I. 1986. Superoxide dismutase Adv Enzymol 58: 61-97.
94. Flohe, L. 1989. The selenoprotein glutathione peroxidase Meth Enzymol 70: 643- 731.
95. Brophy, P. M., Barret, J. 1990. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminths Mol Biochem Parasitol 42: 205-212.
96. Estabrook, R. E. W., Pullman, E., (eds). Oxidation and Phosphorylation. Meth Enzymol Academic, New York, vol 10. 1967.
97. 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 Nat Acad Sci USA 82: 7202-7206.
98. Leid, W., Suquet, C., Tanigoshi, L. 1989. Oxygen detoxifying enzymes in parasites: a review. Acta Leiden 57: 107-114.
99. Agorio, A., Chalar, C., Cardozo, S., Salinas, G. 2003. Alternative mRNAs arising from transsplicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase J Biol Chem 278: 12920-12928.
100. Jakobsson, P., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B. 1999. Common structural features of MAPEG a

- widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism *Prot Sci* 8: 689-692.
101. Lau, E. P., Nieswander, L., Watson, D., Fall, E. R. 1980. Glutathione S-transferase is present in a variety of microorganisms *Chemosphere* 9: 565-569.
 102. Cohen, E., Gamiel, A., Katan, J. 1986. Glutathione and glutathion S-transferase in fungi: Effect of pentachloro-nitrobenzene and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene: purification and characterization of the transferase from *Fusarium* *Pestic Biochem Physiol* 26: 1-9.
 103. Stenersen, J., Kobro, S., Bjerke, M., Arend, U. 1987. Glutathion S-transferase in aquatic and tereestrial animals from nine phyla. *Comp Biochem Physiol* 86C: 73-82.
 104. Clark, A., G. 1989. The comparative enzymology of the glutathion S-transferase from non-vretebrate organisms *Comp Biochem Physiol* 92B: 419-446.
 105. Clark, A. G., Shamaan, N., A., Dauterman, W., C., Hayaoka, T 1984 Characterization of glutathione S-transferases from the housefly, *Musca domestica* (L). *Pestic Biochem Physiol* 22: 51-59.
 106. Smith, N. C., and Bryant, C. 1986. The role of host generated free radicals in helminth infections: *Nippostrongylus brasiliensis* and *Nematospiroides dubis* compared *Int. J. Parasitol.* 16 : 617-622.
 107. Arner, E. S., and Holmgren, A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase *Eur J Biochem* 267: 6102-6109.
 108. Herve, M., Angeli, V., Pinzar, E., Wintjens, R., Faveuw, Ch., Narumiya, S.,

- Capron, A., Urade, Y., Capron, G., Trottein, F. 2003. Pivotal roles of the parasite PGD₂ synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion Eur J Immunol 33: 2764-2772.
109. Morello, A., Repetto, Y., Atias, A. 1982. Characterisation of glutathione S-transferase activity in *Echinicoccus granulosus*. Comp Biochem Physiol 72B: 449-452.
110. Brophy, P. M., Barret, J. 1990. Blocking factors and the isolation of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophylidea). Parasitol 100: 137-141.
111. Reviewed in: Ketterer B. 1986 Detoxication reactions of glutathione transferases Xenobiotica 16: 957-973.
112. Armstrong, R. N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases Chem Res Toxicol 10: 2-18.
113. Hayes JD, Mc Lellan L. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress Free Radic Res 31: 273-300.
114. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily Biochem J 360: 1-16.
115. Wilce, M. C. J., Parker, M. W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferase. Biochem Biophys Acta 1205: 1-18.
116. Katti, S. K., LeMaster, D., M., Eklund, H. 1990. Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution J Mol Biol 212:167-184.

117. Martin, J. L. 1995. Thioredoxin-a fold for all reasons Srtucture 3: 245-250.
118. Martin, J. L., Bardwell, J. C. A., Kurlyan, J. 1993. Crystal structure of the DsbA protein required for disulfide bond formation in vivo Nature (London) 365: 464-468.
119. Bushweller, J. H., Billeter, M., Holmgren, A., Wuetrich, K. 1994. The nuclear magnetic resonance solution structure of the mixed disulfide between *Escherichia coli* glutaredoxin (C14S) and glutathione J Mol Biol 235: 1585-1597.
120. Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A. 1983. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution Eur J Biochem 133: 51-59.
121. Mannervik B, Widersten M. 1995. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol J Biol Chem 257: 9909-9912.
122. Tahir M, Mannervik B. 1996. Simple inhibition studies for distinctions between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase J Biol Chem 261: 1084-1051.
123. Clemmitt RH, Chase HA. 2002. Direct recovery of glutathione S-transferase by expanded bed adsorption: Anion exchange as an alternative to metal affinity fusions Biotech Bioeng 77: 776-785.
124. Prabhu KS, Reddy PV, Gumprich E, Hildenbrandt GR, Scholz RW, Sordillo LM, Reddy CC. 2001. Microsomal glutathione S-transferase A1-1 with glutathione peroxidase activity from sheep liver: molecular cloning,

- expression and characterization *Biochem J* 360: 345-54.
125. Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsapralis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV. 2001. Human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily *Chem Res Toxicol* 14: 1051-1057.
126. Rouimi P, Anglade P, Benzekri A, Costet P, Debrauwer L, Pineau T, Tulliez J. 2001. Purification and characterization of a glutathione S-transferase Omega in pig: evidence for two distinct organ-specific transcripts *Biochem J* 358: 257-262.
127. Alin P, Jensson H, Guthenberg C, Danielson U, Tahir M, Mannervik B. 1985 Purification of major basic glutathione transferase isoenzymes from rat liver by use of affinity chromatography and fast protein liquid chromatofocusing *Anal Biochem* 146: 313-320.
128. O'Learly K, Hathaway K, Tracy J. 1982 *Schistosoma mansoni*: Single-step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4 *Exp Parasitol* 75: 47-55.
129. De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Andreoli R, Bergamaschi E, Cavazzini S, Franchini I, Mutti A. 2001. Polymorphism of xenobiotic-metabolizing enzymes and excretion of styrene-specific mercapturic acids *Chem Res Toxicol* 14: 1393-1400.
130. Mannervik B, Awasthi Y, Board P, Hayes J, Di Ilio C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Muramatsu M, Pearson W, Pickett C, Sato K., Widersten M, Wolf C. 1992. Nomenclature for human glutathione S-transferase *Biochem J* 282: 305-306.

131. Habig W, Pabst M, Jakoby W. 1974. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation J Biol Chem 249: 7130-7139.
132. Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson A., Mannervik B. 1997 Glutathione S-transferases catalyse the detoxification of oxidized metabolites (o-quinines) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular damage Biochem J 324: 25-28.
133. Ketterer B, Taylor J, Meyer D, Pemble S, Coles B, Chulin X, Spencer S. 1993. Some functions of glutathione transferases. In: Tew K, Mannervik B, Mantle T, Pickett C, Hayes J. (eds). Structure and function of glutathione transferases. Boca Raton, Florida; CRC Press; pp.15-27.
134. Board P. 1980. A method for the localization of glutathione S-transferase isozymes after starch gel electrophoresis. Anal Biochem 105: 147-150.
135. Ricci G, Bello M, Caccuri A, Galiazzo F, Federici G. 1984. Detection of glutathione transferase activity on polyacrilamide gels Anal Biochem 143: 226-228.
136. La Du B, Mandel H, Way L. 1971. Fundamentals of drug metabolism and drug disposition, Williams and Wilkins, Baltimore, Md. pp-167.
137. Labrou N, Mello L., Clonis Y. 2001. Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase Biochem J 358: 101- 110.
138. Caccuri, AM., Antonini, G., Board, PG., Flanagan, J., Parker, MW., Paolesse, R., Turella, P., Federici, G., Lo Bello, M., Ricci, G. 2001.

- Human glutathione transferase T2-2 discloses some evolutionary strategies for optimization of substrate binding to the active site of glutathione transferases J Biol Chem 276: 5427-5431.
139. Segel, I. 1975. Simple inhibition systems. In: Enzyme Kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Jhon Wiley and Sons, Inc. New York. pp-100-160.
140. Segel, I. 1976. Biochemical calculations. Jhon Wiley and Sons, Inc. New York. pp-441.
141. Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Merchant, M. T. and Landa, A. 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium* J Parasitol 85: 448-453.
142. Giri, L. 1990. Chromatofocusing. In: Methods in Enzymology . Deutscher, M.P. (ed) Academic Press, New York. 182: 380-392.
143. Lowry, O., Rosenbrough, N., Lewis-Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
144. Laemmli, V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature (London) 227: 680-685.
145. Thomas , M. L., Rodees, D. G. 1990. Determination of size, molecular weight, and presence of subunits In: Meth Enzymol Deutscher, M.P. (ed) Academic Press, New York. 182: 566-587.
146. Paglia, D. E., and Valentine, W. N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase J Lab Clin Med 70: 158-169.
147. Tahir, M. K., and Mannervik, B. 1985. Inhibitors for distinction of three

- types of human glutathione transferase FEBS 181: 249-252.
148. Tahir, M., K., and Mannervik, B. 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase J Biol Chem 261: 1048-1051.
149. Vibanco-Perez, N., Jiménez, L., Mendoza-Hernandez, G., and Landa, A. 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S transferase from *Taenia solium* Parasitol Res 88: 398-404.
150. Brophy, P. M., Southan, C., and Barret, J. 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa* Biochem J 262: 939-946.
151. Mannervik, B. 1988. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. CRC Crit Rev in Biochem 23: 283-337.

A. Plancarte · J. L. Rendon · A. Landa

Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa

Received: 4 December 2003 / Accepted: 26 February 2004 / Published online: 1 May 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Glutathione S-transferases are major phase II detoxification enzymes. *Taenia solium*, a parasite of humans and pigs, is exposed to toxic products. The aim of this work was to purify and characterize a *T. solium* glutathione S-transferase isoform of 26.5 kDa (SGST_{26.5}) in order to obtain its kinetic parameters. Homogeneous SGST_{26.5} was obtained by a simple purification procedure. SGST_{26.5} showed a *pI* of 7.07, and a native *M_r* of 60 kDa with 26.5 kDa subunits. The optimum activity for SGST_{26.5} was found at pH 6.5–7.0 in the range 10–42°C. SGST_{26.5} had a specific enzyme activity of 78, 7.1, 6.6, and 0.7 μM min⁻¹ mg⁻¹ with CDNB, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, 2,4-hexadienal and *trans*-2-nonenal as substrates, respectively. It also had a $k_{cat}/K_m(\text{CDNB}) = 2.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_m(\text{GSH}) = 4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and V_{max} for GSH and CDNB = 74 and 77 μM min⁻¹ mg⁻¹, respectively. SGST_{26.5} was inhibited in a noncompetitive form by cibacron blue, bromosulphophthalein and triphenyltin chloride. Inhibition studies as a function of inhibitor concentration show that the enzyme is a homodimer. Bireactant system analysis show that it follows an ordered sequential mechanism.

Introduction

Taenia solium is a parasitic cestode in humans and pigs (White 1997). The larvae can survive in host tissue for long periods, even in the presence of a functional

immune system (Dixon and Lipscomb 1961). Glutathione S-transferases (GSTs) appear to be one of the major detoxification enzymes in parasitic helminths (Mannervik 1985). Such enzymes are part of the phase II detoxification system that catalyzes the conjugation of a multitude of exogenous and endogenous toxic compounds to glutathione. They also have peroxidase and isomerase activities, and are able to detoxify a number of toxic ligands by acting as a non-catalytic intracellular binding protein (Sheehan et al. 2001). GSTs have the potential to participate in the modulation of the host immune response by contributing to the production of leukotriene (LT) C₄ (Sjostrom et al. 2001). They have been studied most extensively in mammals, and a focal point has been their relevance to human pharmacology and oncology (Ketter et al. 1983). Enzymological studies on GSTs have proven critical to their understanding. The nomenclature, classification, structure-activity relationships and physiological regulation of GSTs support this statement (Jakoby 1976; Mannervik et al. 1985). Although GSTs have been documented in several helminths, their enzymological aspects have scarcely been explored (Clark 1989; Brophy et al. 1989; Brophy and Barret 1990a). This background prompted us to purify and characterize SGST_{26.5} from the cysticerci of *T. solium*. The information obtained could be used to develop therapeutic and protective strategies against this parasite.

Materials and methods

Chemicals

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, 2,4-hexadienal, *trans*-2-nonenal, 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane, and ethacrynic acid were obtained from Aldrich (Milwaukee, Wis.). Cibacron blue, the sodium salt of bromosulphophthalein, triphenyltin chloride, reduced glutathione, glutathione reductase, NADPH, and cumene hydroperoxide were from

A. Plancarte (✉) · A. Landa
Departamento de Microbiología y Parasitología,
Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
México, UNAM, Circuito interior, 04510 Mexico City, Mexico
E-mail: apc@servidor.unam.mx
Tel.: +52-55-56232358
Fax: +52-55-56590084

J. L. Rendon
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México,
UNAM. Circuito interior, 04510 Mexico City, Mexico

Sigma (St. Louis, Mo.). Merck (Darmstadt, Germany) provided hydrogen peroxide. GSH-Sepharose 4B, Polybuffer 96, Polybuffer exchanger for chromatofocusing and Sephacryl S-200 were from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) and the low molecular weight markers from Gibco BRL (Rockville, Md.). All other chemicals were of the highest purity and were purchased from common commercial sources.

Enzyme purification

T. solium cysticerci were obtained and processed as previously reported (González et al. 2002). Unless otherwise stated, all purification steps were carried out at room temperature.

Affinity chromatography

Purification of the *T. solium* GST activity fraction (SGSTF) was carried out by the technique described by Vibanco-Pérez et al. (1999), with some modifications. Briefly, 2.5 g of parasites were suspended at a 1:10 ratio (w/v) in 0.01 M sodium phosphate buffer containing 0.15 M NaCl, pH 7.4 (PBS) and disrupted in a Polytron homogenizer (Brikmann Instruments, Westbury, N.Y.) (1,500 rpm). The homogenate was ultracentrifuged at 100,000 g for 1 h at 4°C to obtain a metacystode crude extract supernatant (MCE). This step was repeated several times to obtain sufficient MCE for the rest of the purification. The MCE with GST activity were applied to a reduced GSH-Sepharose affinity column (3×3 cm) previously equilibrated in the PBS solution. A ratio of 0.012 mg protein/ml of gel and a flow rate of 100 ml/h were used. After washing the column, the protein attached to the resin was eluted with 5 mM reduced glutathione (GSH) in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0. Fractions with enzyme activity (SGSTF) were pooled and concentrated to 1 ml by ultrafiltration (YM-5 membrane; Amicon-Millipore, Bedford, Mass.) under nitrogen.

Chromatofocusing

SGSTF were dialyzed overnight against a 0.025 M imidazole-HCl buffer pH 7.35 at 4°C. The SGSTF was then applied to a polybuffer exchanger 94 column (PBE) (1×18 cm) equilibrated with the same dialysis buffer. The proteins were eluted with Polybuffer 74 diluted 1:16 in deionized water, and adjusted to pH 4.0 with HCl. Fractions of 1 ml were collected and the pH was evaluated. Then, all the fractions were dialyzed against PBS at pH 7.0 and assayed for GST activity.

Denaturing electrophoresis

Standard polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed by the Laemmli procedure (1970)

to analyze the fractions. Coomassie blue was used to stain the proteins, and low molecular weight proteins from GIBCO BRL were used as references. The protein concentration was determined by the Lowry (1951) method using bovine serum albumin as standard protein.

Determination of molecular mass

Determination of the native molecular mass was carried out on a Sephacryl S-200 column (0.9 cm×60 cm) equilibrated with PBS (Thomas and Rodees 1990). Molecular mass markers were: β galactosidase (200,000); yeast alcohol dehydrogenase (150,000); bovine serum albumin (66,000); ovoalbumin (43,000); bovine erythrocyte carbonic anhydrase (29,000) and myoglobin (17,000). The molecular weights of the subunits of the SGST_{26.5} were estimated by SDS-PAGE.

Enzyme assays

The determination of both the activity of glutathione S-transferase during the purification procedure, and the kinetic parameters for SGST_{26.5}, were performed as described by Habig et al. (1974) using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate. Initial rates were determined by monitoring changes in absorbance at 340 nm ($\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in an Ultraspec 1000 spectrophotometer (Pharmacia-Biochem, Uppsala, Sweden) for 3 min after starting the enzyme assays. A complete assay mixture without enzyme was used as a control. Each enzyme assay was performed with 0.3 μg of SGST_{26.5} in PBS. *Trans*-non-2-enal conjugating activity was measured in 1 ml assay buffer (5 mM glutathione, 1 mM EDTA in 100 mM potassium phosphate pH 6.5) using 50 μM of the reactive carbonyl substrate, as previously described (Habig and Jakoby 1981). The conjugating activities with other electrophilic substrates were determined as previously described (Habig and Jakoby 1981). The ability of the purified enzyme to catalyze the (GSH)-mediated reduction of hydrogen peroxide and/or cumene hydroperoxide (i.e., to function as a glutathione peroxidase) was determined according to Paglia and Valentine (1967). Briefly, 1 ml reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM GSH, 2 units of glutathione reductase, 0.2 mM NADPH and 0.25 mM hydrogen peroxide or 1.2 mM cumene hydroperoxide (dissolved in ethanol to a final concentration in the assay of less than 5%).

Effect of pH on SGST_{26.5} activity and stability

The activity of SGST_{26.5} as a function of pH (Segel 1975) was evaluated in the range 3–12, in the appropriate pH buffer, by using GSH (5 mM) and CDNB (7 mM) as substrates. Similar conditions were used for

the stability measurements with an enzyme preincubation of 20 min in the corresponding buffer, before the beginning of the enzymatic assay at pH 6.5.

Effect of temperature on SGST_{26.5} enzyme activity

In order to evaluate the dependence of SGST_{26.5} activity on temperature, enzyme assays of SGST_{26.5} at different temperatures (10–100°C) were carried out in the assay buffer using 7 mM CDNB and 5 mM GSH as substrates (Segel 1975). An enzyme aliquot was incubated for 5 min in PBS buffer (pH 6.5) at the corresponding temperature. Substrates were then added, and the initial velocity was recorded. In addition, 30 min incubations of the SGST_{26.5} in PBS buffer pH 6.5 at 20°C and 37°C were performed.

Oligomeric structure

In order to gain insight into the subunit composition of SGST_{26.5}, inhibition studies were performed by the procedure of Tahir and Mannervik (1985) with cibacron blue (CB), triphenyltin chloride (TPT) or bromosulphophthalein sodium hydrate (BST). In all cases, variable concentrations of the inhibitor were preincubated in the assay buffer with SGST_{26.5} and GSH (5 mM) in a final volume of 1.0 ml. The reaction was started by the addition of CDNB (7 mM). The concentration of inhibitor giving 50% inhibition (IC₅₀) was obtained by plotting the percentage residual activity versus the log of inhibitor concentration. All of the measurements were performed by duplicate.

Fractional velocities (FV) developed by SGST_{26.5} in the presence of either CB, TPT or BST were determined as described by Tahir and Mannervik (1985). These FV values were plotted versus the log of the inhibitor concentration. The shape of the curves, as well as the maximum value of the slope at IC₅₀ were considered to distinguish between heterodimeric and homodimeric subunit composition. The shape of the curves was evaluated sensitively by determining the concentration of inhibitor giving 10, 80 and 90% inhibition (IC₁₀, IC₈₀ and IC₉₀), and comparing them with the IC₅₀ value. The FV equation predicts the ratios IC₁₀/IC₅₀=1/9, IC₈₀/IC₅₀=4 and IC₉₀/IC₅₀=9 (Tahir and Mannervik 1986) for a homodimeric subunit composition.

Table 1 Summary of the purification of GST_{26.5}. A unit of activity is defined as amount of enzyme catalyzing the formation of 1 µmol/min of product under the conditions of the specific assay. Metac-

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Total activity (U)	Yield	Fold purified
MCE	174	572	0.42	240	100	1
SGSTF	8	6.2	16.6	103	43	40
SGST _{26.5}	1.7	0.12	78	10.6	4.4	210

The K_i values for each SGST_{26.5} inhibitor were determined by replotting the slopes obtained from the double reciprocal plots as a function of inhibitor concentration (Albassam 1998).

In order to determine the type of reversible inhibition exerted by the three inhibitors on SGST_{26.5}, initial velocities were performed with the inhibitors. The enzyme was preincubated for a few seconds in the assay buffer with 5 mM GSH and an inhibitor at the corresponding concentration: CB, 0.63 and 1.25 µM; TPT, 2 and 6 µM and BST, 5 and 15 µM. The reaction was then initiated by the addition of one of a range of 0.075–5.0 mM concentrations of CDNB. A set of reactions in identical conditions were performed by inhibitor concentrations varying with CDNB concentration. The results were registered spectrophotometrically as described above. Data were analyzed by plotting 1/v versus the inverse of the different CDNB concentrations in the presence of different concentrations of the inhibitor.

Bireactant system

For the determination of the kinetic mechanism, initial velocity data were obtained by varying the concentration of both substrates in order to construct a 9×9 data matrix. The enzyme was preincubated for a few seconds in the assay buffer in the presence of the desired concentration of GSH and the reaction was initiated by the addition of CDNB. The CDNB concentration was varied from 0.03 to 7 mM, while the GSH concentration was varied from 0.12 mM to 5 mM. Data were plotted according Hanes-Woolf to obtain the values of the kinetic parameters (Frear and Swanson 1970).

Results

Enzyme purification

SGST_{26.5} was purified using a simple procedure which involved a GSH-Sepharose affinity column followed by a chromatofocusing PBE 94 system. The results are summarized in Table 1. The specific activity of the pure enzyme was 78 units/mg protein. It was purified 210 times with a 4.4% recovery of the enzyme activity. The SGST_{26.5} obtained from the chromatofocusing step showed a homogeneous band under denaturing conditions (Fig. 1c).

estode crude extract (MCE), *Taenia solium* glutathione S-transferase activity fraction (SGSTF), *T. solium* glutathione S-transferase of 26.5 kDa (SGST_{26.5})

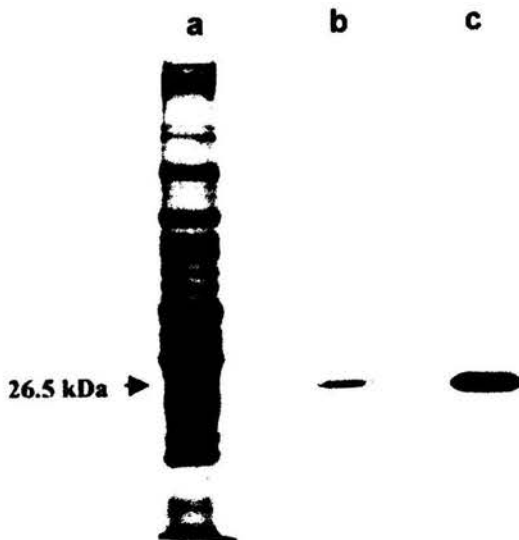
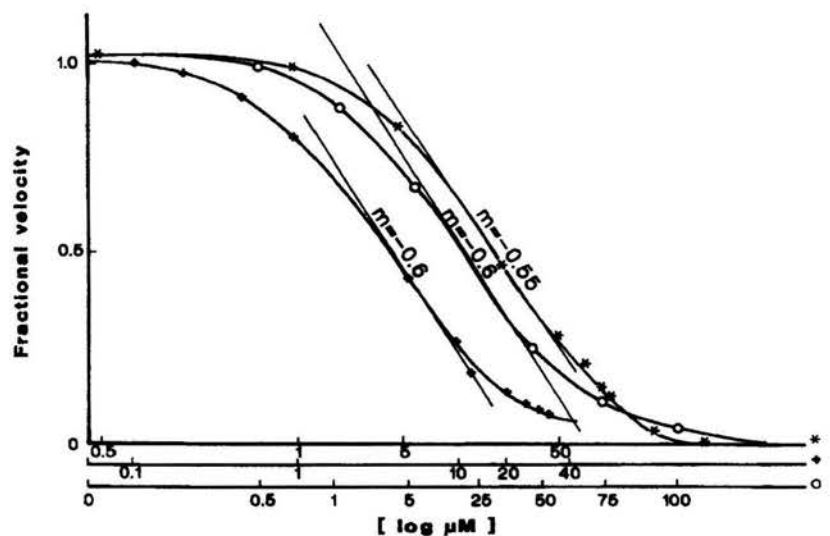


Fig. 1 SGST_{26.5} purification procedure analysis by SDS-PAGE in 10% slab gels. Lane a Metacestode crude extract (MCE), lane b *Taenia solium* glutathione S-transferase activity fraction (SGSTF), lane c *T. solium* glutathione S-transferase of 26.5 kDa (SGST_{26.5}). All samples were reduced with 1% β -mercaptoethanol

Determination of molecular weights and subunit composition

The native molecular mass of SGST_{26.5} was estimated by gel filtration at about 60 ± 4 kDa. Electrophoresis on SDS-PAGE resulted in a single protein band with a M_r of 26.5 ± 0.5 kDa. These results suggest that SGST_{26.5} exists as a dimeric protein. In order to gain insight into the subunit composition (i.e. identical or different), the analysis proposed by Tahir and Mannervik (1986) was performed. Figure 2 shows graphs of the FV for SGST_{26.5} versus the logarithm of inhibitor concentration with either BST, TPT or CB. The straight line indicates

Fig. 2 Plot composition of fractional velocities versus log [I] for the inhibition of SGST_{26.5} with bromosulphothalein (BST) (asterisk), triphenyltin chloride (TPT) (plus), cibacron blue (CB) (open circle). The straight lines indicate the maximal slope expected at 50% inhibition for a graph consistent with fractional velocities equation



the maximum slope at IC₅₀. The corresponding values were -0.55 , -0.6 and -0.6 , respectively, for BST, TPT and CB. Additionally, the curve shape parameters I_{10}/I_{50} , I_{80}/I_{50} and I_{90}/I_{50} for all the inhibitors suggest that SGST_{26.5} is constituted by identical subunits (Tahir and Mannervik 1986).

Effect of pH on SGST_{26.5} activity and stability

SGST_{26.5} activity had an optimum pH of from 6.5 to 7.0, but a sharp decrease on either side of these values was observed (data not shown). This result has been reported for other GSTs (Frear and Swanson 1970; Cochrane et al. 1987; Baars et al. 1987). The values for SGST_{26.5} stability as a function of pH are located in a broader range of 4.5–8.5. This result indicates the capacity of the enzyme to maintain the correct conformation.

Effect of temperature on SGST_{26.5} activity

Enzyme activity was not affected in the temperature range 10–40°C. Beyond 40°C, activity decreased until none was detected at 75°C. In addition, the enzyme proved to be stable at 20°C and 37°C for 30 min.

Kinetic properties

Substrate specificity of SGST_{26.5} for a variety of chemicals is shown in Table 2. The *T. solium* enzyme showed maximum preference for CDNB, followed by 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, hexa-2,4-dienal and *trans*-non-2-enal. The enzyme showed no activity with either BST, ethacrynic acid, 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy) propane, cumene hydroperoxide or hydrogen peroxide.

Table 2 Specific activity of SGST_{26.5} with selected substrates. ND Not detected

Substrate	$\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	88.3
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	7.1
Bromosulphthalein	ND
Ethacrylic acid	ND
1,2-Epoxy-3-(<i>p</i> -nitrophenoxy) propane	ND
2,4-Hexadienal	6.6
<i>Trans</i> -2-nonenal	0.7
Cumene hydroperoxide	ND
Hydrogen peroxide	ND

Inhibition studies

IC_{50} and K_i

The results of IC_{50} for the SGST_{26.5} were inhibitor dependent. CB was the most powerful inhibitor, with a IC_{50} of 0.5 μM . The corresponding values for BST and TPT were 21.8 μM and 3.8 μM , respectively. Using CDNB as the variable substrate, a noncompetitive inhibition pattern was observed for all three inhibitors (CB, BST and TPT). Figure 3 shows the double-reciprocal pattern with BST as an inhibitor. From the replot of $1/v$ axis-intercept against inhibitor concentration (inset of Fig. 3) a K_i value of 10 μM was obtained for BST. By the same graphic procedure, K_i values of

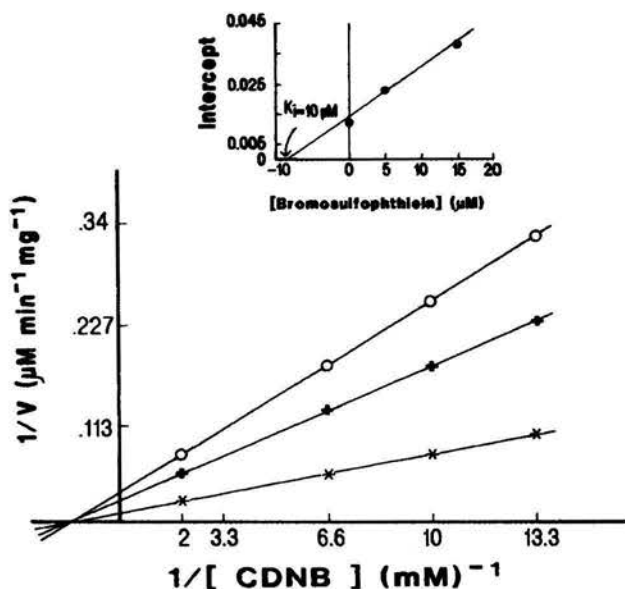


Fig. 3 Lineweaver-Burk plot of initial velocities SGST_{26.5} activity ($1/v$) versus $1/[\text{CDNB}]$ (mM^{-1}) in the absence (asterisk) and presence of 5 μM (plus) and 15 μM (open circle) of BST with various concentrations of CDNB (2–13.3 mM). Inset shows secondary plot of the $1/V_{\text{max}}$ values derived from the primary Lineweaver-Burk plot versus BST concentrations for the determination of K_i

2 μM and 0.5 μM , respectively, were obtained for TPT and CB.

Bireactant system

Figures 4 and 5 show the corresponding Hanes-Woolf plots of $[\text{GSH}]/v$ versus $[\text{GSH}]$ and the slope_{GSH} in the inset, and $[\text{CDNB}]/v$ versus $[\text{CDNB}]$ and the slope_{CDNB} in the inset, respectively. From the initial velocity patterns, a sequential bi bi kinetic mechanism is suggested. Kinetic parameters were obtained by replotting the slope of the first or second substrate versus the inverse of the second or first substrate, respectively. K_m values of 0.9 mM and 2 mM were calculated, respectively, for GSH and CDNB. The corresponding V_{max} values were 74 and 77 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ for GSH and CDNB, respectively.

Discussion

An interesting aspect of the GSTs isolated from mammals and invertebrates is the large number of isozymes capable of conjugating GSH with a variety of electrophiles. Likewise, *T. solium* contains at least two isoforms of such an enzyme whose subunit M_r are 25.5 and 26.5 (Fig. 1c). The former has recently been cloned (Vibanco-Perez et al. 2002).

In the present work, SGST_{26.5} was purified to homogeneity allowing for several enzymological analyses. The low efficiency of the purification procedure is in agreement with that obtained by Brophy and Barret (1990b, 1990c), and can be explained by the presence of blocking factors during purification.

The M_r value of the native SGST_{26.5} was 60 kDa. This figure is slightly higher than that obtained for the enzyme from vertebrates, but is closer to some invertebrate GSTs (Clark 1989). The M_r value determined for the subunits was 26.5 kDa, again consistent with the values quoted for a variety of vertebrate and invertebrate enzymes (Brophy and Pritchard 1994; Mannervik 1988).

It has been demonstrated, for proven GSTs, that simple inhibition studies involving measurements of residual enzyme activity as a function of inhibitor concentration can be used to distinguish between heterodimeric and homodimeric forms (Tahir and Mannervik 1985). Our results for SGST_{26.5} showed that its oligomeric structure belongs to the homodimeric type.

The chromatofocusing work on SGST_{26.5} showed a pI of 7.07. Some authors have attempted to establish a relationship between the pI and enzyme function in invertebrates (Clark 1989). It has been concluded that more research must be done in this particular area (Dierickx 1987).

The maximum enzyme activity of SGST_{26.5} was reached at pH 6.5–7.0. This observation was expected due to the chemical mechanism of the GSTs (Mannervik

Fig. 4 Hanes-Woolf plot of initial velocities of SGST_{26.5} activity $[GSH]/V$ (min) versus $[GSH]$ (mM)⁻¹ in the presence of 0.25 mM (inverted v), 0.3 mM (open circle), 0.5 mM (plus) and 2 mM (asterisk) of CDNB with various concentrations of GSH (0.2–5 mM). The inset shows a secondary plot of the slope values derived from the primary Hanes-Woolf plot for the determination of $K_m(\text{CDNB})$ and $V_{\max}(\text{CDNB})$

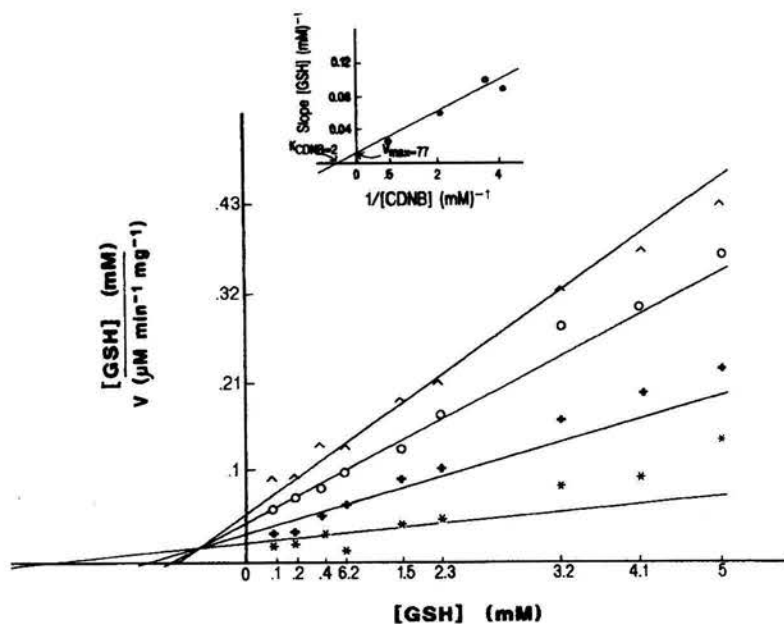
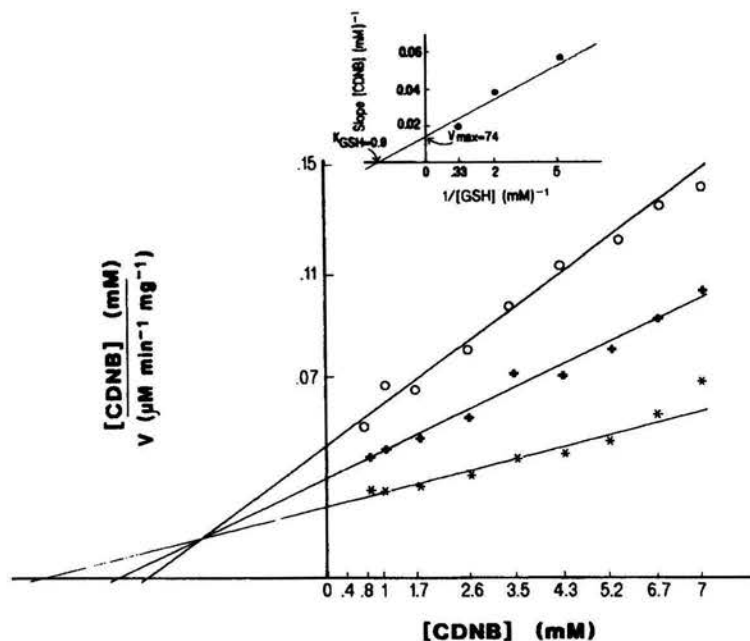


Fig. 5 Hanes-Woolf plot of the initial velocities of SGST_{26.5} activity $[CDNB]/V$ (min) versus $[CDNB]$ (mM)⁻¹ in the presence of 0.2 mM (open circle), 0.5 mM (plus) and 3 mM (asterisk) of GSH with various concentrations of CDNB (0.25–7 mM). The inset shows a secondary plot of the slope values derived from the primary Hanes-Woolf plot for the determination of $K_m(\text{GSH})$ and $V_{\max}(\text{GSH})$



1988). Thus, it is commonly accepted (Armstrong 1997), at physiological pH values, that the tyrosine residue from the catalytic site of GSTs acts as a general base and promotes proton abstraction from the GSH thiol by creating a thiolate anion with high nucleophilic reactivity. Next, the enzymatic reaction continues by nucleophilic attack on the electrophilic center of a variety of endogenous and xenobiotic electrophilic substrates.

The specific activity of the pure enzyme acting on CDNB was high in comparison with that reported for GST from a variety of trematodes and cestodes (Brophy

et al. 1989; Vibanco-Pérez et al. 2002), although the k_{cat}/K_m ratios for either GSH or CDNB were moderate. Our preparation was also active on 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, hexa-2,4-dienal and *trans*-non-2-enal. The last two compounds are characteristic substrates for the phase II detoxification system. Because of its inability to catalyze hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, the parasite enzyme has no peroxidase activity.

The sensitivity of SGST_{26.5} to three inhibitors was studied in order to evaluate its kinetic characteristics. The shape of the curves was typical of simple linear

inhibition (data not shown). SGST_{26.5} was less susceptible to these inhibitors compared to the enzymes from *Moniezia expansa* (Brophy et al. 1989), *Schistosoma mansoni* (O'Learly et al. 1992) and a recombinant protein from *T. solium* (Vibanco-Pérez et al. 1999).

Double reciprocal plots showed that the inhibition was of the noncompetitive type. The inhibition constants, obtained by replotting the slopes from the primary plot versus CDNB, were in agreement with the inhibition capacity for each inhibitor.

The decrease in V_{max} and the unaffected K_m in the action of the inhibitors on SGST_{26.5} is indicative of noncompetitive inhibition. The pure noncompetitive nature of inhibition for the three inhibitors was revealed by replotting the intercept versus inhibitor concentration (Fig. 3). The resulting plot (inset of Fig. 3) was linear, as expected for typical noncompetitive inhibition.

Additionally, SGST_{26.5} developed an inhibitor sensitivity and substrate specificity into the concentration range for the GST μ and α class, suggesting that the enzyme shares characteristics of both of these GST classes.

SGST_{26.5}, as any GST, catalyzes reactions between two substrates to yield two reactants. In order to gain insight into the kinetic mechanism, as well as to obtain the true K_m and V_{max} values for both GSH and CDNB, steady-state kinetics were developed on SGST_{26.5}. Hanes-Woolf plots, for $[GSH]/v$ versus $[GSH]$ (Fig. 4), revealed, at increasing concentrations of CDNB, that $V_{max(GSH)}$ is affected and $K_{m(app)(GSH)}$ decreases and approaches $K_{m(GSH)}$ as a limit value. These results are in accord with an ordered bi system (Segel 1975). The plot of the slope GSH versus $1/[CDNB]$ showed a $K_{m(CDNB)}$ value of 2 mM and $V_{max(CDNB)}$ of $77 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. The corresponding plot for $[CDNB]/v$ versus $[CDNB]$ (Fig. 5) showed the same initial velocity behavior for SGST_{26.5} as described above. As $[GSH]$ increases, $K_{m(app)(CDNB)}$ decreases and approaches the true K_m value for CDNB. The slope $CDNB$ versus $1/[GSH]$ revealed a $K_{m(GSH)}$ value of 0.9 mM and a V_{max} of $74 \mu M \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. These data suggest a system in which GSH and CDNB combine with the SGST_{26.5} in a sequential order. This is in agreement with the catalytic mechanism established for the GSTs, in which the GSH is modified into a form that then participates in positioning the CDNB properly in the catalytic groups of the enzyme (Caccuri et al. 2001).

The characterization performed on SGST_{26.5} was carried out in order to describe its basic kinetics. This information can be potentially useful in the development of both the pharmaceutical and immunological strategies in order to control *T. solium* (Brophy and Pritchard 1994).

Acknowledgements This work was financed by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Conacyt 27556-M) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, México) DGAPA IN212600. The authors wish to thank Dr. Gerardo Medina for valuable English corrections.

References

- Albassam BA (1998) Inhibition of wheat leaves nitrate reductase activity by cibacron blue. *Biochem Mol Biol Int* 46: 979–986
- Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10:2–18
- Baars AJ, Jansen M, Breimer D (1979) Xenobiotic metabolizing enzymes in *Drosophila melanogaster*. Activities of epoxide hydratase and glutathione S-transferase compared with similar activities in rat liver. *Mutat Res* 62:279–291
- Brophy PM, Barret J (1990a) Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminthes. *Mol Biochem Parasitol* 42:205–212
- Brophy PM, Barret J (1990b) Glutathione transferase in helminthes. *Parasitology* 100:345–349
- Brophy PM, Barret J (1990c) Blocking factors and the isolation of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *Parasitology* 100:137–141
- Brophy PM, Pritchard DI (1994) Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. 79:89–96
- Brophy PM, Southan C, Barret J (1989) Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem J* 262:939–946
- Caccuri AM, Antonini G, Board P, Flanagan J, Parker MW, Paolesse R, Turella P, Federic G, Lo Bello M, Ricci G (2001) Human glutathione transferase T2-2 discloses some evolutionary strategies for optimization of substrate binding to the active site of glutathione transferases. *J Biol Chem* 276: 5427–5431
- Clark AG (1989) The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp Biochem Physiol* 92B: 419–446
- Cochrane BJ, Morrissey JJ, LeBlanc GA (1987) The genetics of xenobiotic metabolism in *Drosophila*. IV. Purification and characterization of the major glutathione S-transferase. *Insect Biochem* 17:731–738
- Dierickx PJ (1987) Soluble glutathione S-transferase isoenzymes in *Daphnia magna* strains and their interactions with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and 1,4-benzoquinone. *Insect Biochem* 17:1–6
- Dixon HBF, Lipscomb FM (1961) Cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. *Privy Council Med Res Spec Rep Ser Lond* 229:1–58
- Frear DS, Swanson HR (1970) Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9:2123–2132
- Gonzalez R, Mendoza-Hernandez G, Plancarte A (2002) Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitol Res* 88:881–887
- Habig W H, Jakoby W (1981) Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods Enzymol* 77:398–405
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Jakoby WB (1976) The glutathione S-transferase: a triple-threat in detoxication. In: De Serres FJR, Bend JR, Philpot RM (eds) *In vitro* metabolic activation in mutagenesis testing. Elsevier/North-Holland Biomedical, Amsterdam, p 207
- Ketter B, Coles B, Meyer DJ (1983) The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49:59–69
- Laemmli V (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lowry O, Rosenbrough N, Lewis-Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Mannervik B (1985) The isoenzymes of glutathione transferase *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 57:357–417
- Mannervik B (1988) Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 23:283–337