



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD DE GLUTATIÓN S-  
TRANSFERASA MICROSOMAL EN  
CISTICERCOS DE *Taenia solium***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

GABRIELA NAVA BALDERAS

**DIRECTOR DE TESIS: DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO**

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

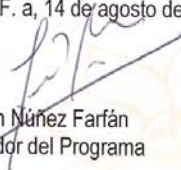
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

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 14 de mayo del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Nava Balderas Gabriela** con número de cuenta **94063853** con la tesis titulada: "**Caracterización de la actividad de Glutación S-transferasa microsomal en cisticercos de *Taenia solium* (frGSTMTs)**" bajo la dirección del Dr. Agustín Plancarte Crespo.

Presidente:	Dr. Ruy Pérez Montfort
Vocal:	Dr. Guillermo Mendoza Hernández
Secretario:	Dr. Agustín Plancarte Crespo
Suplente:	Dra. Adela Rodríguez Romero
Suplente:	Dra. Edda Lidia Sciotto Conde

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 14 de agosto del 2007

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

Esta tesis se realizó en la UNAM, en el Posgrado en Ciencias Biológicas.

Facultad de Medicina, Edificio A de Investigación, 6° Piso. Departamento de Microbiología y Parasitología. Laboratorio de Inmuno-Bioquímica de *Taenia solium*. Ciudad Universitaria, México, D. F. C.P. 04510.

El autor de este trabajo recibió una beca para la realización de sus estudios de Maestría del Programa de Becas del CONACYT (beca # 199347)

Asuntos del Personal Académico. Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN201906-3.

COMITÉ TUTORAL:

DRA. EDDA LIDIA SCIUTTO CONDE

DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ

DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO

## ***Agradecimientos***

Al Dr. Agustín Plancarte Crespo

Por todo el conocimiento transmitido.

Su asesoría, paciencia, consejos, la confianza dada; pero sobre todo, el apoyo incondicional y su comprensión.

A la Dra. Edith Graciela González Mondragón por la asesoría en el manejo del software Origin Pro.

Al Médico Cirujano Lilia Robert Guerrero por el apoyo en el estudio de Microscopia Electrónica.

Al Dr. Juan Luis Rendón por sus críticas realizadas al presente trabajo.

A la Dra. Patricia del Arenal por el apoyo en la cinética de la enzima succinato deshidrogenasa.

Al Técnico Académico, Bióloga Alicia Ochoa por la asesoría en algunas técnicas de laboratorio.

*A la vida o azar...*

A cada uno de los seres maravillosos que me rodean

Mis padres, *Rosario y Francisco*, por su apoyo incondicional, por su confianza y porque a ellos les debo todo lo que soy y seré.

Mis hermanos Teresa, Daniel y Enrique, porque han hecho de la vida una verdadera alegría.

Javy, por tu comprensión y paciencia, pero sobre todo por ser incondicional.

Mis tíos Elena, Rogelio y Alicia (donde estés), por su cariño y apoyo.

Juanita, Julián y Jaime, por complementar y apoyar nuestras vidas.

Mis primos Jessi, Mary, Pepe, Hugo, Luis y sus anexos.

Mis amigos y amigas, cada uno de ustedes saben lo que valen en mi y les agradezco profundamente todos los momentos compartidos.

Y principalmente, la razón de mi existencia

*N a t y.*

## Contenido

<b>Índice</b>	página
<b>Resumen</b>	8
<b>Abstract</b>	9
<b>1. Introducción</b>	10
Clasificación	10
Ciclo Biológico	10
Morfología del metacestodo de <i>Taenia solium</i>	12
Reticulo endoplásmico	13
Distribución geográfica	14
Evasión Inmune	15
Estrés Oxidativo	15
Glutación S- Transferasa	17
Cinética Enzimática	19
Inhibición Enzimática	23
<b>2. Antecedentes</b>	26
Enzimas detoxificantes en <i>Taenia solium</i>	29
Glutación S- Transferasa en <i>Taenia solium</i>	31
Actividad de GST en los microsomas de <i>Taenia solium</i>	32
<b>3. Hipótesis</b>	32
<b>4. Objetivos</b>	32
Metas	32
<b>5. Material y Métodos</b>	33
Obtención de cisticercos	33
Obtención de la fracción microsomal de <i>Taenia solium</i> (frGSTMTs)	33
Demostración de la pureza de las fracciones sub-celulares	34
Microscopia electrónica de transmisión	34
Marcadores enzimáticos	35
Ensayo enzimático de para GSTs en la frGSTMTs	36
Demostración de la actividad catalítica de la frGSTMTs	36
Purificación de la frGSTMTs	36
Demostración de la integridad de la actividad catalítica en la frGSTMTs en las membranas del RE	38
Ensayos de activación de la frGSTMTs con agentes sulfidrilicos ( <i>N</i> - Etilmaleimida e Iodacetamida)	39

Efecto del Tritón X – 100 sobre la actividad catalítica de la frGSTMTs	40
Determinación de la estabilidad de la frGSTMTs en función del pH	41
Determinación del pH óptimo de reacción para la frGSTMTs	42
Estabilidad de la frGSTMTs a diferentes temperaturas	42
Obtención de los parámetros cinéticos aparentes de la frGSTMTs	42
Obtención de Km y Vmax	42
Ensayos de inhibición de la actividad catalítica de la frGSTMTs	43
Tipo de inhibición y constantes inhibitorias	44
Especificidad de la frGSTMTs por diversos sustratos electrofílicos	45
Especificidad de la frGSTMTs por el N-acetil-L-cisteína (NAC)	46
<b>6. Resultados</b>	
Purificación de la fracción microsomal de <i>T. solium</i> (frGSTMTs)	46
Demostración de la pureza de las fracciones sub-celulares	47
Microscopia electrónica de transmisión	47
Marcadores enzimáticos	49
Actividad catalítica de GST en la fracción microsomal de <i>T. solium</i> (frGSTMTs)	50
Purificación de la frGSTMTs	52
Evidencias que demuestran que la actividad de GST en la frGSTMTs es de una proteína integral de membrana	56
Efecto de agentes sulfidrílicos ( <i>N</i> -Etilmaleimida e Iodacetamida)	59
Efecto del detergente Tritón X -100 en la solubilización de la frGSTMTs	60
Determinación de la estabilidad de la frGSTMTs en función del pH	61
Determinación del pH óptimo de reacción para la frGSTMTs	62
Efecto de la temperatura sobre la frGSTMTs	63
Determinación de las constantes catalíticas	64
Estudios de inhibición	69
Tipos de inhibición y constantes inhibitorias	71
Otros sustratos y el N-acetil-L-cisteína	76
<b>7. Discusión</b>	76
<b>8. Glosario de Abreviaturas</b>	81
<b>9. Apéndice</b>	83
<b>10. Referencias</b>	85



## Resumen

En este trabajo se caracterizaron algunas de las propiedades físico químicas y cinéticas de una glutatión *S*-transferasa; la cual se encontró firmemente unida a la fracción microsomal de cisticercos de *Taenia solium*. Esta actividad enzimática no pudo ser eliminada de los microsomas por medio de lavados u otros procedimientos fisicoquímicos que normalmente eliminan a las proteínas débilmente unidas a las membranas. La pureza de la fracción microsomal parasitaria, con actividad de GST, se estableció por medio de estudios de microscopía electrónica y con marcadores enzimáticos específicos subcelulares. La fracción microsomal de cisticercos de *T. solium* (frGSTMTs) se solubilizó con Tritón X-100 a concentraciones necesarias para solubilizar proteínas integrales de membranas y este procedimiento fue obligado para desarrollar la actividad de GST. Por otro lado, ni el *N*-etilmaleimida ni el ácido iodoacético activaron a la frGSTMTs parasitaria como tampoco lo hizo con *Escherichia coli*, *Synechocystis* sp., *Arabidopsis thaliana* y la rana *Xenopus levalis* que por estudios genómicos presentan secuencias relacionadas con GST microsomales. Varios sustratos e inhibidores se emplearon para caracterizar la actividad de la frGSTMTs. Su valor óptimo de estabilidad en función del pH es a 6.6 y a pH de 7.4 se desarrollo su óptima actividad catalítica. Fue estable en un rango de temperatura de 20 a 50 °C. La frGSTMTs presentó una  $appK_m$  (CDNB) = 1.22 mM,  $appK_m$  (GSH) = 0.167 mM, y  $appV_{max}$  para el glutatión y el CDNB 0.952 y 3.4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectivamente. La actividad de la frGSTMTs se inhibió por el Azul de Cibacron ( $I_{50}$  26.5  $\mu\text{M}$ ), bromosulfaleína ( $I_{50}$  41  $\mu\text{M}$ ), cloruro de trifeniltin ( $I_{50}$  8.0  $\mu\text{M}$ ) y Rosa de Bengala ( $I_{50}$  14.3  $\mu\text{M}$ ). También se observó que la enzima se inhibió de manera acompetitiva con el reactivo Rosa de Bengala y Azul de Cibacrón y no-competitiva con el cloruro de trifeniltin y bromosulfaleína. Los datos presentados muestran la existencia de una glutatión *S*-transferasa en los microsomas de los cisticercos de *T. solium* dispuesta como proteína integral y por lo tanto, diferente de las glutatión *S*-transferasas citoplásmicas de *T. solium*.

## Abstract

Glutathione S-transferase activity has been shown to be associated firmly with the microsomal fraction of *Taenia solium*. Activity was still observed after washing of the microsomes, and after carrying out procedures that release loosely bound material from membranes. Electron microscopy and subcellular enzyme markers criteria indicate the high purity of the microsomal fraction that presents the glutathione S-transferase activity. *T. solium* microsomes were solubilized using Triton X-100 at a similar concentration as used for solubilize integral microsomal proteins. This procedure proved necessary to obtain enzymatic activity. Neither *N*-ethylmaleimide nor iodoacetamide activated the parasite microsomes, as also observed for *Escherichia coli*, *Synechocystis* sp., *Arabidopsis thaliana* and the frog *Xenopus leavis*. In order to characterize this parasite enzyme activity, several substrates and inhibitors were used. The frGSTMTs presented appKm (CDNB) = 1,22 mM, appKm (GSH) = 0.167 mM and appVmax for the glutathione and CDNB of 0,952 and 3,4  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  respectively. The optimum activity for microsomal glutathione S-transferase was found at pH 6.6 *T. solium* microsomes were inhibited by Cibacron Blue (IC 50  $\mu\text{M}$ ), sulfobromophthalein (IC 50 53.5  $\mu\text{M}$ ), triphenyltin chloride (IC 50 8.0  $\mu\text{M}$ ) and Rose Bengal (IC 50 14.3  $\mu\text{M}$ ) and it was possible to establish the simple inhibition system for each inhibitor. These results indicate that the *T. solium* microsomal glutathione S-transferase is different from the parasite cytoplasmic enzymes catalyzing similar reactions.

## Introducción

### Historia

El cestodo *Taenia solium* es un parásito del hombre y del cerdo (1), su existencia se remonta a la antigua Grecia donde se observó a la forma larvaria antes que la forma adulta (2).

En el año 1000 d. C., Jbn Sena describe la forma adulta (2). En 1550 Paranolí describe la presencia de los metacestodos en el hombre. En 1558 Rumler y Gessner publican el primer caso de neurocisticercosis (3). En 1683 Redi precisó que el cisticerco era la etapa larvaria de *T. solium* (4). Sin embargo, en el siglo XVIII Linneo clasifica a la forma larvaria como *Cisticercus cellulosae* y a la forma adulta como *Taenia solium* (5). En 1853 P. J. Van Beneden da a conocer la relación existente entre los estadios del parásito (2). Vosgien, Van Beneden, Haubner, Leuckart entre otros, empezaron a obtener cisticercos de cerdos alimentados con proglotidos grávidos de *T. solium*. En 1856 Kuchenmeister comprueba y establece el ciclo biológico del parásito en un condenado a muerte, al observar una tenia en el intestino delgado del condenado después de haber ingerido cisticercos (4). En México y América Latina, *T. solium* se conoció en la conquista, al ser introducido el cerdo por los españoles. (6).

## Clasificación

Subreino: *Metazoarios*, Phylum: *Plathelminthos*, Clase: *Cestoidea*, Subclase: *Cestoda*, Orden: *Ciclophylidea*, Familia: *Taeniidae*, Género: *Taenia*

Especie: *Taenia solium* (7)

## Ciclo biológico

*Taenia solium* es un gusano plano, dioico y parásito obligado. Carece de aparato digestivo y circulatorio, en su ciclo de vida participan dos hospederos, el hombre, como huésped definitivo por alojar a la fase adulta y el cerdo, o huésped intermediario, por albergar a la fase larvaria (8).

La forma adulta se conoce comúnmente como tenia o solitaria, mide de 3-7 metros y se encuentra alojada en el yeyuno del hombre, único portador de la forma adulta, ocasionándole la enfermedad denominada teniosis (9, 10). El hombre desarrolla la teniosis cuando ingiere las larvas vivas del parásito presentes en los tejidos musculares del cerdo. La tenia consta de tres partes: escólex, cuello y estróbilo. El escólex del parásito evagina estimulado por la bilis y enzimas digestivas; sus ventosas se adhieren a la pared intestinal e inducen la expulsión de los ganchos que se sostienen en la mucosa. El parásito comienza a crecer por un proceso conocido como estrobilación (11), el cuello presenta múltiples células madre que permiten el desarrollo de los segmentos formando el cuerpo o estróbilo de la tenia; los cuales, se encuentran en diferentes etapas de maduración. Los segmentos cercanos al cuello son indiferenciados, los intermedios presentan órganos sexuales y los terminales están grávidos, éstos últimos se observan aproximadamente en un tiempo de 3 a 4 meses de implantación de la tenia. Cada proglótido grávido contiene miles de huevos que son arrojados al ambiente junto con las heces del portador (12).

El cerdo ingiere materia fecal contaminada con los huevos del parásito (9). Los huevos al pasar por el tracto digestivo son activados por las enzimas proteolíticas digestivas y el jugo biliar (13), ahí se transforman en las oncosferas o embriones liberados. Éstos al llegar al intestino delgado cruzan la mucosa y escapan al sistema circulatorio y linfático. Estos sistemas les permiten distribuirse en las masas musculares y en el sistema nervioso central principalmente (9). En estos tejidos, los parásitos se convierten en metacestodos o cisticercos (14). Se han encontrado con poca frecuencia metacestodos en hígado (15), ojos, ganglios linfáticos y en el tejido subcutáneo (8, 17).

También en escasas ocasiones se han observado larvas de *T. solium* en jabalíes, perros, gatos, ratas, monos, ovejas y ciervos (17).

La importancia clínica para el hombre en relación con este parásito, es que puede ser su hospedero accidental al alojar las larvas de *T. solium* en sus tejidos, desarrollando la enfermedad llamada cisticercosis. Si los parásitos se encuentran

en el sistema nervioso central (SNC) ocasionan la neurocisticercosis (NC) (18), que puede ser la forma más grave de esta parasitosis.

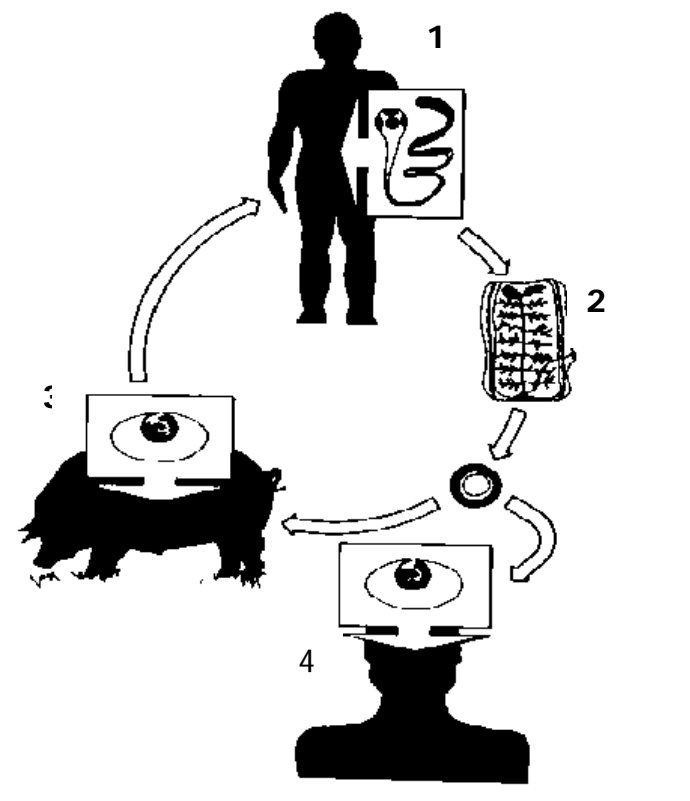


Figura 1. Ciclo biológico de *Taenia solium* (7)

(1) El humano es el huésped definitivo de la forma adulta de *T. solium*. (2) Cada segmento o proglótido contiene miles de huevos que son liberados al ambiente junto con las heces del portador. (3) El cerdo consume la materia fecal junto con los huevos del parásito y éstos son activados por las sales biliares y jugos gástricos. La oncosfera o embrión hexacanto, viaja vía linfática y/o sanguínea a los diferentes órganos y tejidos del cerdo y en ellos se desarrollan en metacestodos. El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere la carne cruda o mal cocida del cerdo parasitado. (4) El hombre puede ser hospedero accidental de la forma larvaria.

### **Morfología del metacestodo de *Taenia solium***

Morfológicamente los metacestodos de *T. solium* tienen en promedio una dimensión de 1 a 1.5 cm. Su forma es vesiculosa y monocefálica, constituida por un escólex invaginado, rodeado de un líquido semitransparente (8). El pequeño escólex del metacestodo al igual que el de la tenia, esta armado con una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. El escólex larvario se encuentra rodeado por

tejido conectivo y muscular, formando el canal espiral y el canal de entrada, que darán origen al cuello y al estróbilo de la tenia (7). La membrana que separa al metacestodo del hospedero es un tegumento citoplásmico y sincicial, presenta prolongaciones digitiformes llamadas microticas o microvilli que permiten la absorción de diversas moléculas como los nutrientes (19). Ultraestructuralmente el tegumento sincicial se encuentra organizado por una banda protoplásmica de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de espesor o citoplasma distal, constituido de numerosas mitocondrias, vesículas de pequeño tamaño, cuerpos densos, retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Se continúa con una zona fibrosa de finas cadenas conectivas, músculo circular y músculo longitudinal que interconectan a células nucleadas de gran tamaño mediante prolongaciones citoplásmicas con la zona distal. Estas células presentan en su citoplasma perinuclear abundantes ribosomas, retículo endoplásmico rugoso y usualmente vesículas elaboradas por Golgi, muchos de los citones contienen gotas de glicógeno (19, 20).

### **Retículo endoplásmico**

El retículo endoplásmico, es una red de membranas interconectadas que forman cisternas, tubos aplanados y sáculos comunicados entre sí, intervienen en funciones relacionadas con la síntesis proteica, metabolismo de lípidos y algunos esteroides, así como el transporte intracelular. Se puede diferenciar en retículo endoplásmico rugoso y liso.

El retículo endoplásmico rugoso, tiene esa apariencia debido a los numerosos ribosomas adheridos a su membrana. Sus membranas forman sáculos en cuyo interior (lumen) se encuentran las proteínas recién sintetizadas por él. Se observa muy desarrollado en las células que por su función deben realizar una labor activa de síntesis, como las células hepáticas o las células del páncreas.

El retículo endoplásmico liso no tiene ribosomas, entre sus principales funciones se encuentra la síntesis y metabolismo de lípidos de membranas, así como la síntesis de colesterol y derivados de éste (ácidos biliares y hormonas esteroideas).

El proceso de detoxificación, el cual se lleva a cabo en células del hígado y consiste en la inactivación de productos tóxicos como drogas, medicamentos o los propios productos del metabolismo celular por ser liposolubles y la glucosilación, es decir, reacciones de transferencia de un oligosacárido a las proteínas sintetizadas, las cuales se transforman en una proteína periférica externa del glucocáliz (21). En los metacestodos de *T. solium* el retículo endoplásmico se encuentra distribuido, tanto en sus células como en su sincicio.

Los microsomas son orgánulos esféricos o semiesféricos de retículo endoplásmico (RE) formados artificialmente, es decir, cuando las membranas del RE son segmentadas y se encuentran en solución, los fosfolípidos tienden a formar estructuras semejantes a micelas, al encapsular sus cadenas hidrocarbonadas y exponer sus grupos fosfatos.

### **Enfermedad en el hombre**

La NC en humanos es una enfermedad compleja (22), puede ser asintomática (12) o presentar una gran variedad de signos y síntomas, los cuales dependen de diversos factores, tanto del individuo (genéticos, respuesta inflamatoria) como del parásito (número, localización, estadio y tipo) (23). Entre los síntomas más frecuentes están las crisis convulsivas en un 70 % de los casos; la epilepsia de aparición tardía ha sido reportada en la India en un 58% y en México en un 50% en los pacientes. En el 23% de los casos de NC existe hipertensión endocraneal, además se reportan cefaleas, trastorno mental y demencia (24).

En México, las recientes estadísticas oficiales, informan de un promedio anual de 500 nuevos casos de cisticercosis con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100 mil habitantes. En estos datos no se registran diferencias por sexo y los grupos de edad de los pacientes más afectados van desde los 15 a los 44 años (25); sin embargo, las estadísticas de la Secretaría de Salud no capturan todos los casos debido a que muchos de ellos no son diagnosticados. En el período de 1946 a 1979, de 21,597 autopsias realizadas en el Hospital General de México, la NC se presentó en un 2.9% (12).

## **Distribución geográfica**

El complejo teniosis-cisticercosis presenta una distribución cosmopolita. Se reporta alta predominancia en zonas de Brasil (26, 27), Colombia, Ecuador, Guatemala, México (14), Perú, India, China, Corea, Nueva Guinea, África del Sur, África Occidental, Zimbabwe y Madagascar (28) que presentan una inadecuada infraestructura sanitaria e incipiente educación para la salud. Sin embargo, se han reportado casos en Estados Unidos, Honduras, Panamá, Portugal, España y el Reino Unido (29); países que no presentaban esta problemática, considerándola como una parasitosis emergente, siendo la principal causa de transmisión los inmigrantes y turistas (29, 30).

## **Evasión Inmune**

En forma contrastante a los casos de NC sintomática, existen los asintomáticos. En estos los cisticercos pueden sobrevivir en sus huéspedes inmunológicamente competentes, por décadas sin ocasionarles síntomas clínicos (6). Dixon y Lipscomb en 1961 describieron un estudio realizado con 450 soldados ingleses que migraron a la India y ahí adquirieron la cisticercosis. Al regresar a Inglaterra desarrollaron síntomas clínicos neurológicos relacionados con *T. solium*. Cuatro años fue el tiempo promedio en la aparición de los síntomas clínicos en estos individuos. El primero de los casos en aparecer, fue aproximadamente a los 4 meses y los últimos hasta 30 años después del inicio de la infección (31). Este estudio permite sugerir que *T. solium* puede permanecer en el hospedero durante períodos prolongados sin causar sintomatología y sin ser dañado.

Dentro de la parasitología se han documentado diversos mecanismos de evasión inmune. Los agentes infecciosos se han adaptado de la manera más conveniente para su propia supervivencia, desarrollando sofisticados sistemas de evasión de las respuestas protectoras del hospedero. Así, ciertos parásitos intracelulares facultativos, especialmente protozoos y bacterias, están protegidos de gran parte de los sistemas efectores inmunes, debido a su localización intracelular y aunque la



célula hospedera puede expresar antígenos del parásito en su membrana, éstos, no suelen desencadenar una respuesta inmune protectora frente a las células infectadas, a diferencia de lo que ocurre con infecciones virales (32). Algunos ejemplos de los mecanismos de evasión inmune se comentarán a continuación.

*Variación antigénica.* Se manifiesta como un mecanismo de adaptación del huésped. Este fenómeno sucede en tripanosomas, bacterias y virus. Es la capacidad cíclica, por parte de los parásitos, de poder cambiar de antígenos presentes en su superficie celular. *Trypanosoma brucei* presenta los genes que codifican la glucoproteína de superficie variable (VSG). Este parásito puede expresar diferentes versiones de la proteína aparentemente estimulando la respuesta inmune del hospedero. *T. brucei* posee un repertorio de más de mil genes para VSG (33).

*Mimetismo molecular.* Este mecanismo se refiere a la capacidad de los parásitos para evitar el reconocimiento antigénico por parte del sistema inmune del hospedero, mediante la absorción de proteínas del hospedero por parte del parásito o imitación de proteínas de superficie. (34)

*Inhibición del complemento.* Muchos microorganismos evitan la lisis mediada por el complemento, a través de la inhibición de la cascada molecular o la inhibición de algún componente en particular. La inhibición de la activación se puede conseguir por la síntesis o adquisición de moléculas reguladoras del complemento, o la inhibición del complejo C5b-9 (35).

*Sistemas microbicidas.* Ciertos microorganismos intracelulares facultativos son capaces de evadir los sistemas microbicidas de los fagocitos en tres diferentes etapas: a) Inhibición de la fusión entre el fagosoma y el lisosoma. b) Escape de la vacuola fagocítica al citoplasma c) Resistencia a los sistemas de degradación de los lisosomas (36).

*Supresión de la respuesta inmune.* Para evitar ser eliminados por el sistema inmune los parásitos inducen generalmente una supresión de la respuesta inmune. Los mecanismos son muy variados e incluyen la inducción de células supresoras, la alteración de las funciones de las citocinas o la inducción preferencial de la subpoblación celular Th no protectora. A veces la inmunosupresión causada por una infección conduce a estados de inmunosupresión severa (37).

*Inhibición del estrés oxidativo.* Este fenómeno se refiere, a la inhibición de especies reactivas de oxígeno (EROs). Las EROs originadas por diferentes mecanismos, tales como el estallido respiratorio de células inflamatorias, reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria, o productos de reacciones metabólicas normales en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico, membrana plasmática y los peroxisomas (38). Se sabe que los parásitos cuentan con enzimas antioxidantes que bloquean a estas EROs (39) como son la catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). La glutatión S-transferasa (GST), glutatión S-transferasa microsomal (MGST) y la GPx inhiben la peroxidación lipídica de las membranas, también estas enzimas junto con la aldehído reductasa, aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa combaten la formación de carbonilos citotóxicos que llevarían a la muerte del parásito (39).

### **Estrés Oxidativo**

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las moléculas con alto potencial oxidante derivadas del oxígeno, EROs y los sistemas antioxidantes (40). Una consecuencia por activar a las células inflamatorias con antígenos es que éstas desarrollen la “estallido respiratorio” (ER). La ER de las células inflamatorias, consiste en un consumo elevado de oxígeno por parte de la célula y que utiliza para producir estrés oxidativo por medio de los EROs (41). Estas moléculas, provenientes del oxígeno presentan uno o más electrones sin aparear, siendo altamente reactivas dada su afinidad al aparearse con electrones de los átomos de

otras moléculas. Las EROs causan daño a toda clase de moléculas biológicas conduciendo a la oxidación, despolimerización de polisacáridos, modificaciones de DNA mediante la ruptura de cadenas, daño a las membranas, procesos de mutagénesis, carcinogénesis, peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, fragmentación y daño a carbohidratos (42).

Las EROs formadas en el organismo pueden iniciar una serie de reacciones en cadena, que continúan hasta que éstos son eliminados tras diversas reacciones con otros radicales libres o por la acción del sistema antioxidante, el cual protege a los tejidos de los efectos que ellos producen. Éstos previenen la formación de nuevos radicales libres, convirtiéndolos en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de EROs a partir de otras moléculas (41).

Los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección del daño producido por los EROs (43). Esta protección contra el daño oxidativo puede ser por prevención, intercepción y reparación.

La prevención es la primera línea de defensa contra los EROs y es la protección contra su formación.

La intercepción de los EROs, este es el proceso de desactivación, lo podemos dividir en dos clases enzimáticos y no enzimáticos.

1.- Sistemas no enzimáticos los cuales a su vez podemos subdividir en dos subclases: a) Sustancias eliminadoras o secuestradoras que son pequeñas moléculas que limpian el plasma de oxiradicales, un ejemplo de esto son el  $\alpha$ -tocoferol ácido ascórbico, carotenos y glutatión. b) Sustancias proteicas que son capaces de secuestrar metales de transición sobre todo el hierro como la lactoferrina, la ceruloplasmina y la transferrina.

2.-Sistemas enzimáticos, las tres principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa.

La protección de los efectos antioxidantes puede ser por reparación del daño una vez efectuado, este se refiere al daño en el DNA ocurrido como una variedad de productos de la oxidación de fosfolípidos, proteínas y otros compuestos (44).

Los sistemas enzimáticos están conformados por una serie de enzimas antioxidantes esenciales en los parásitos para defenderse contra los EROs generadas por macrófagos neutrófilos y eosinófilos del hospedero (45), por algunos fármacos antiparasitarios, la reducción incompleta del oxígeno durante la respiración en la mitocondria y como productos de reacciones metabólicas normales en la membrana citoplasmática, retículo endoplásmico, membrana plasmática y los peroxisomas (46).

Estas enzimas pueden ser particularmente importantes para la larga vida de los parásitos que están involucrados en infecciones crónicas. Las principales familias de enzimas antioxidantes en organismos eucariontes son las catalasas (CATs), las glutatión peroxidasa (GPXs) con actividad catalítica para descomponer  $H_2O_2$  para producir  $H_2O$  y  $O_2$ . También las GPXs y las GSTs que utilizan al glutatión, pueden reducir hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos. Las superóxido dismutasas (SODs) son una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a  $H_2O_2$  y oxígeno. El  $H_2O_2$  puede causar daño por si mismo, pero puede originar a una especie mas tóxica el  $OH^{\cdot}$ . Recientemente otra familia de enzimas antioxidantes que utilizan al  $H_2O_2$  e hidroperóxidos, descritas como peroxiredoxinas (PRXs) han sido identificadas en organismos de todos los reinos, incluyendo a los nemátodos y tremátodos (47). El descubrimiento de este sistema enzimático representa un avance para el entendimiento de cómo los parásitos se defienden del estrés oxidativo externo e interno, puesto que carecen de GPXs y CATs.

### **Glutatión S-Transferasas**

Las enzimas glutatión S-transferasas (GST) catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido sobre componentes no polares que contienen átomos electrofílicos como el carbón, nitrógeno o grupos sulfuros, siendo sus principales sustratos los halogenonitrobenzenos, las quinonas y los carbonilos  $\alpha, \beta$ -insaturados (48). La mayoría de las GST catalizan la conjugación del sustrato

electrofílico 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) al GSH mediante la siguiente reacción (49).

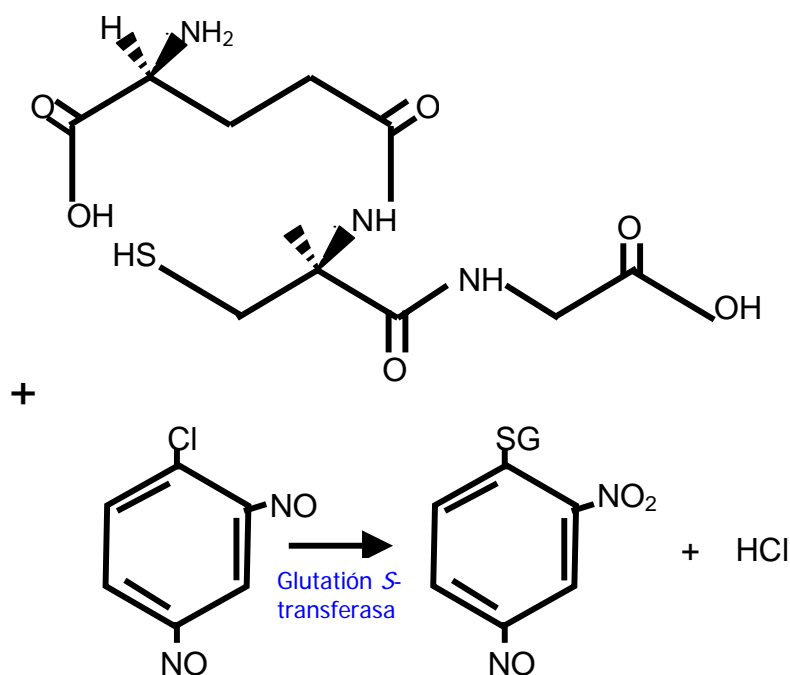


Figura 2. Conjugación del Glutathión (GSH) con el compuesto electrofílico 1-cloro-2,4 dinitrobenzono (CDNB) catalizado por la enzima GST

Actualmente se han descrito tres grandes familias enzimáticas que presentan actividad de GST; una de naturaleza citosólica, se encuentra soluble en el citoplasma (50), otra mitocondrial (51) y una tercera que comprende a las GSTs microsomales (52). Esta última se agrupa dentro de las proteínas asociadas a membranas y relacionadas con el metabolismo de eicosanoides y glutatión, de las siglas en inglés (MAPEG) que indistintamente llamaremos GSTs microsomales o MAPEG.

Las GSTs solubles mantienen entre si, una estrecha similitud en su estructura tridimensional a diferencia de las GSTs microsomales. Las GSTs solubles son dímeros con subunidades de 19.9 a 24.4 KDa. De acuerdo a su secuencia se conocen siete clases designadas como Alfa, Mu, Pi, Sigma, Teta, Omega y Zeta; otras clases conocidas como Beta, Delta, Epsilon, Lambda, Phi, Tau, y U han sido identificadas en especies no mamíferos (48).

Las GSTs clase Kappa son dimeros con subunidades de 22.6 KDa (51), presentan una alta actividad para los haluros de arilo, tales como el CDNB y pueden reducir CuOOH, metabolizando hidrocarburos aromáticos, tales como el naftaleno. Originalmente fue aislada de mitocondrias y recientemente se ha encontrado en los peroxisomas (53).

Los miembros de las MAPEG constituyen la única rama de estas familias proteicas involucradas en la producción de eicosanoides. La gran mayoría de la información sobre las GST microsomales ha sido obtenida en mamíferos (52). Inicialmente se describió a una enzima microsomal que conjugaba CDNB, la MGST1. Esta enzima, a diferencia de las citosólicas, se propuso que podían exhibir propiedades catalíticas cuando se le trata con agentes sulfidrílicos como *N*-etilmaleimida o iodoacetamida. Esta fue considerada una característica peculiar de las MGSTs, que ha sido utilizada para diferenciar las GSTs microsomales de las citoplásmicas (54, 55). Sin embargo, recientemente un estudio de mapeo genético de organismos invertebrados y bacterias mostró que los productos de expresión de los genes GSTs microsomales no son activados por los agentes sulfidrílicos, concluyendo que la activación con éstos agentes no son ya una característica de GSTs microsomales (56).

La superfamilia de las proteínas denominadas MAPEG, han sido definidas de acuerdo con actividad enzimática, secuencia y propiedades estructurales. Este grupo consiste en seis proteínas de humano que incluyen a la FLAP, LTC<sub>4</sub>S, MGST1, MGST2, MGST3 y MGST1-L-1 (PGES). En el descubrimiento de estas enzimas, se observó que presentaban un papel en la síntesis de eicosanoides. Por ejemplo, la leucotrieno C<sub>4</sub> sintasa (LTC<sub>4</sub>S), transferasa microsomal conjugaba al leucotrieno A<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) con GSH; la proteína activadora 5-lipoxigenasa (FLAP) exhibe la actividad de unir ácido araquidónico requerido por la 5-lipoxigenasa. La prostaglandina E<sub>2</sub> sintasa, cataliza la isomerización dependiente de GSH de la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) a la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (48).

Existen evidencias que sugieren que MGST1 posee la capacidad de detoxificación y también es capaz de conjugar GSH a la prostaglandina J2 (PGJ2) y conferirle de esta forma la propiedad de inhibir la proliferación celular (57), en contraste con la MGST2 y MGST3 de humanos que son capaces de detoxificar componentes extraños y sintetizar LTC<sub>4</sub> (58), este leucotrieno tiene amplias funciones proinflamatorias y espasmogénicas (59). En ratas la MGST3 es incapaz de sintetizar LTC<sub>4</sub>. FLAP no presenta actividad catalítica pero liga ácido araquidónico a 5-lipoxigenasa, que es esencial para la síntesis de todos los leucotrienos formados en la cascada de 5-lipoxigenasa. El leucotrieno C<sub>4</sub> sintasa (LTC<sub>4</sub>S) y la Prostaglandina E sintasa 1 (PGES1) no tienen un papel detoxificante, su acción catalítica se restringe a la síntesis de LTC<sub>4</sub> y PGE<sub>2</sub>, respectivamente (52).

Recientemente, mediante alineamientos de múltiples secuencias y análisis de bioinformática, se aislaron cDNAs para MGSTs, basados en la secuencia de las MAPEG y se subdividieron en cuatro subgrupos. La primera subfamilia contiene a FLAP, LTC<sub>4</sub>S y MGST2, la segunda subfamilia está constituida por MGST3 junto con los miembros encontrados en plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, y *Ricinus communis*) y hongos (*Aspergillus nidulans*). La tercer y cuarta subfamilias están formadas por las proteínas identificadas en bacterias (*Synechocystis* sp. SynMGST, *Escherichia coli*, y *Vibrio cholerae*) y MGST1 y MGST1-L1, respectivamente (48, 56).

En *Schistosoma mansoni* se ha demostrado que la producción de la prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) se debe a la enzima GST del parásito y que la PGD<sub>2</sub> está directamente relacionada con la falta de migración de las células de Langerhans a los órganos linfoides secundarios. Esta última observación podría ser una estrategia parasitaria para evadir la respuesta inmune, al quedar bloqueada la actividad de las células de Langerhans (60).

Estructura de las GST microsomales

El grado de pureza con que se ha obtenido a la MGST1, ha sido posible la cristalización de la molécula y el estudio de la conformación a través de estudios de rayos X (61).

El análisis de la MGST1 con una resolución de 6 Å muestra la estructura cuaternaria homotrimérica de la enzima, similar a la estructura cuaternaria observada en la PGES1. Las MAPEG del subgrupo I presentan estructuras triméricas formadas por monómeros o complejos agregados. Por ejemplo FLAP, puede existir monoméricamente o en forma de dímero o trímero, LTC4S forma complejos multiméricos. FLAP y LTC4S también pueden formar heterodímeros y heterotrímeros (45).

En cisticercos de *T. solium* hemos observamos la actividad enzimática de GST en sus fracciones microsomales. También hemos descartado que esta actividad se deba a la contaminación de alguna GST citosólica. El obtener en forma pura a la enzima microsomal parasitaria permitirá profundizar en los estudios de protección y fisiológicos de *T. solium* además de demostrar la presencia de este tipo de enzima microsomal por primera vez en organismos parásitos

### **Cinética Enzimática**

La cinética enzimática permite conocer las diversas características de una enzima. Esta información es fundamental para conocer su mecanismo de reacción, especificidad por el sustrato o sustratos, incluyendo las diversas etapas y las secuencias de las mismas (60). 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 y fuerza iónica. Se pueden tener 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 reacción



( $V_{max}$ ), constante de inhibición ( $K_i$ ), que son datos numéricos que facilitan las comparaciones entre enzimas (61).

La actividad de algunas enzimas depende de uno o más componentes no proteicos llamados cofactores, los cuales pueden ser iones metálicos (Zn, Mg, K, etc.), o moléculas orgánicas llamadas coenzimas. Las enzimas son altamente específicas con sus sustratos y se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan en:

1. Oxido–reductasas. Desarrollan reacciones de oxido–reducción.
2. Transferasas. Transfieren grupos funcionales.
3. Hidrolasas. Transfieren grupos funcionales de agua, reacciones de hidrólisis.
4. Liasas. Adicionan dobles enlaces a diversos grupos.
5. Isomerasas. Llevan a cabo reacciones de isomerización.
6. Ligasas. Forman enlaces de escisión en presencia de ATP.

Los principios generales de las reacciones químicas son aplicables a las reacciones catalizadas por las enzimas. Sin embargo, éstas se caracterizan porque aunque se aumente la concentración de sustrato, la velocidad no continua aumentando. Esto es debido a un efecto de saturación por parte de la enzima con el sustrato, porque todos los sitios activos, finitos, de la enzima están ocupados. La velocidad de reacción depende de la cantidad de enzima en complejo con su sustrato. A concentraciones bajas de sustrato, la velocidad inicial de la reacción ( $V_0$ ) es casi proporcional a la concentración del sustrato; a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad inicial de la reacción deja de ser proporcional a la concentración de sustrato. A muy altas concentraciones del sustrato, la velocidad de la reacción llega a ser independiente de dicha concentración y se aproxima asintóticamente a una velocidad constante (figura 3a).

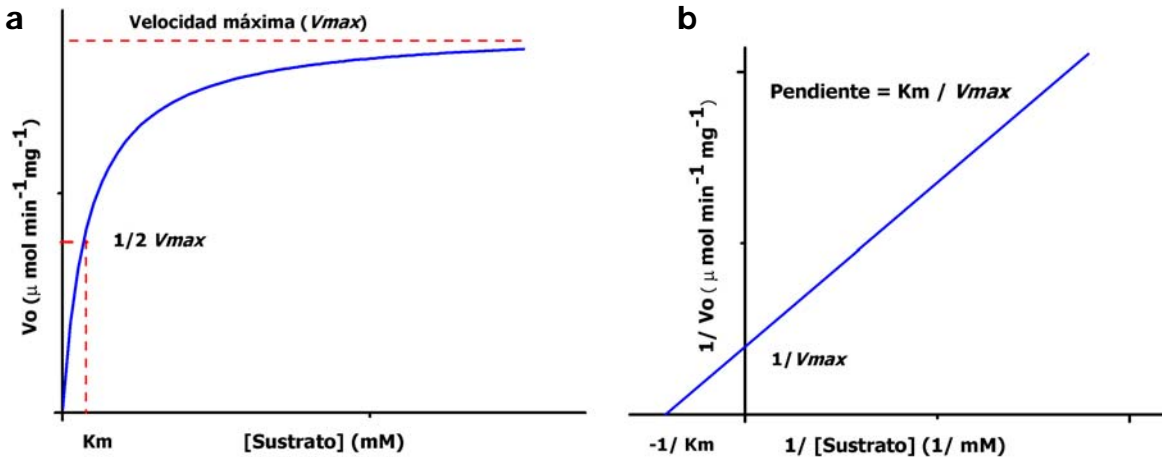


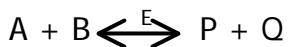
Figura 3. a) Modelo de Michaelis – Menten, efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. b) Modelo de Lineweaver – Burk, doble recíproca.

Esta forma de saturación permitió formular la hipótesis de que la enzima y el sustrato reaccionan reversiblemente para formar un complejo, ES.

La teoría de Michaelis–Menten, supone que la enzima E se combina con el sustrato S, formando el complejo ES, el cual se disocia dando lugar a enzima libre y producto P, siendo todos estos pasos reversibles.



Muchas enzimas catalizan reacciones con dos sustratos que se influyen mutuamente, el análisis cinético de estas reacciones se simboliza por la ecuación



Donde pueden existir varios complejos enzima – sustrato (EA, EB, EP, EQ, EAB, EPQ, EAQ y EPB). La determinación de Km y Vmax es semejante al sistema utilizado en las reacciones con un solo sustrato, manteniendo un de los sustrato a concentración constante y saturante (B), mientras que el otro sustrato (A) se emplea a concentraciones variables para determinar su efecto sobre la velocidad inicial de la reacción y obtener así la constante de MM para el sustrato (A).

La constante de Michaelis es una magnitud cuantificable experimentalmente y definida operativamente, siendo la concentración del sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la velocidad máxima. Para una enzima particular, constituye una característica útil en la determinación cuantitativa de la actividad enzimática en los tejidos y la purificación de la enzima. La velocidad máxima es un parámetro de utilidad para el análisis de algunos mecanismos de regulación enzimática.

Si se parte de la ecuación de Michaelis – Menten, la ecuación de la velocidad  $V = V_{max} [S] / K_m + [S]$ , se deriva una relación numérica importante en el caso especial en que la velocidad inicial de reacción sea exactamente la mitad de la velocidad máxima, es decir cuando  $V_o = \frac{1}{2} V_{max}$ , se tiene  $V_{max}/2 = V_{max} [S] / K_m + [S]$ , que al ser dividido por  $V_{max}$  se obtiene  $\frac{1}{2} = [S] / K_m + [S]$ , que al transformarse da  $K_m = [S]$ .

Existen factores físicos y químicos que afectan a la actividad máxima de las enzimas, entre ellos el pH y la temperatura. La mayoría de las enzimas presentan un pH característico al cual su actividad es máxima. Esta relación depende del comportamiento ácido–base de la enzima y del sustrato. El pH óptimo de catálisis de una enzima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular, sugiriendo que la relación pH–actividad de una enzima puede constituir un factor en el control intracelular de su actividad.

La temperatura, al igual que en las reacciones químicas, aumenta la velocidad de la reacción dentro del intervalo en que la enzima es estable y permanece totalmente activa. La forma que presenta la dependencia de la actividad enzimática respecto de la temperatura es la resultante de dos procesos: 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción con la temperatura y 2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la enzima al sobrepasar una temperatura crítica.

## Inhibición enzimática

El efecto de un inhibidor enzimático es disminuir la velocidad de la reacción catalítica al unirse a la enzima. El estudio de la acción de los inhibidores ha permitido dilucidar el mecanismo y los caminos de la catálisis enzimática, la especificidad de los sustratos, la naturaleza de los grupos funcionales en el sitio activo y la participación de ciertos grupos funcionales en el mantenimiento de la conformación activa de la enzima.

Existen diferentes tipos de inhibición:

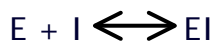
Inhibición irreversible.

El inhibidor se une a la enzima por enlaces covalentes y provoca una modificación química a sus grupos catalíticos.

Inhibición reversible.

La unión del inhibidor con la enzima es reversible, al quitar el inhibidor del medio se recupera la actividad. Los tipos de inhibición de esta clase son:

Competitiva. El inhibidor se une a la enzima de tal manera que interfiere con la unión del sustrato normal. Un inhibidor competitivo reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima–inhibidor (EI) análogo al complejo enzima–sustrato.



La molécula del inhibidor no resulta químicamente alterada por la enzima. Se puede definir la *constante del inhibidor*  $K_i$ , como la constante de disociación del complejo enzima–inhibidor:

$$K_i = [E] \cdot [I] / [EI]$$

Para atenuar la inhibición (y aumentar la velocidad) se aumenta la concentración del sustrato, que lo desplazará. La  $V_{max}$  no se afecta porque  $V_{max} = K_{CAT} [E_T]$ , aunque se necesita una concentración de sustrato más alta que en ausencia del inhibidor para obtener dicho valor. Cinéticamente se puede distinguir el tipo de inhibidor. La  $K_m$  determina la afinidad de la enzima por el sustrato

(concentración de enzima y velocidad constantes). Un inhibidor competitivo actúa bajando la afinidad, por lo tanto la  $K_m$  será mayor. Un inhibidor competitivo se caracteriza por no afectar el valor de  $V_{max}$ , por lo tanto no interfiere con la velocidad de ruptura del complejo enzima–sustrato (figura 4).

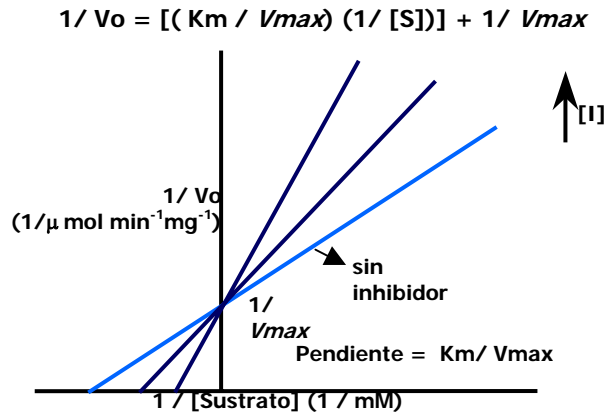


Figura 4. Tipo de inhibición competitiva. El inhibidor compite por el sitio activo del enzima, modificando la  $K_m$  pero no la  $V_{max}$ . Gráfica de doble recíproca.

Inhibición acompetitiva. El inhibidor no se combina directamente con la enzima, ni afecta su reacción con el sustrato. El inhibidor se combina con el complejo ES para formar un complejo inactivo ESI, provocando que no exista la transformación hacia los productos  $ES + I \rightleftharpoons ESI$ , disminuyendo la velocidad de reacción. El inhibidor no se une al centro activo si no a cualquier otro sitio, lo que hace que cambie la conformación y la enzima ya no sea tan efectiva, su  $K_i$  es:

$$K_i = [ES] \cdot [I] / [ESI]$$

El grado de inhibición aumenta cuando la concentración del sustrato aumenta. En este caso no se puede superar la inhibición aumentando la concentración de sustrato (figura 5).

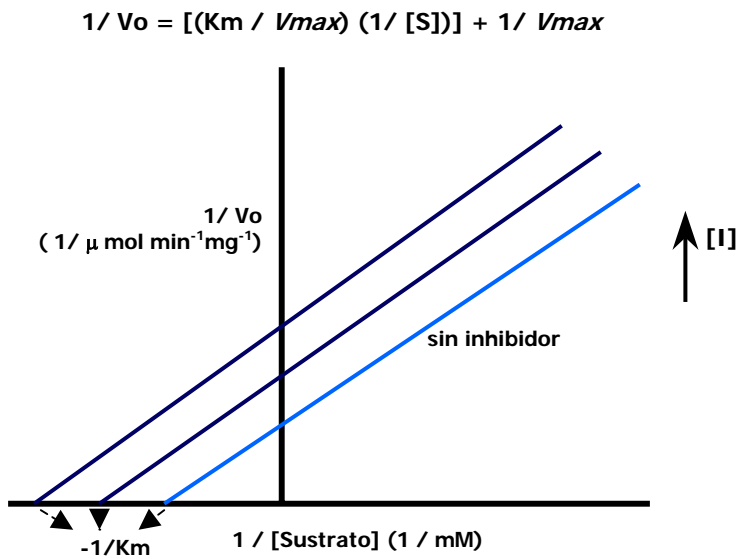


Figura 5. Tipo de inhibición acompetitivo. El inhibidor no compite por el sitio activo del enzima, se une al complejo ES y modifica tanto la  $K_m$  como la  $V_{max}$ . Gráfica de doble recíproca.

#### Inhibición no competitiva.

Los inhibidores no competitivos se unen en un lugar del enzima, distinto del sitio activo. Esto origina un cambio conformacional en la estructura de la enzima y evita la formación del complejo ES a su velocidad normal y que una vez formado no se descomponga a su velocidad habitual para liberar los productos de reacción. Sus efectos no se anulan al aumentar la concentración del sustrato. En este tipo de inhibición, la reacción con el inhibidor produce dos formas inactivas de la enzima: EI y ESI. Por lo tanto existen dos constantes del inhibidor (62, 63, 64, 65).

$K^{EI} = [E][I]/[EI]$  y  $K^{ESI} = [ES][I]/[ESI]$  (figura 6).

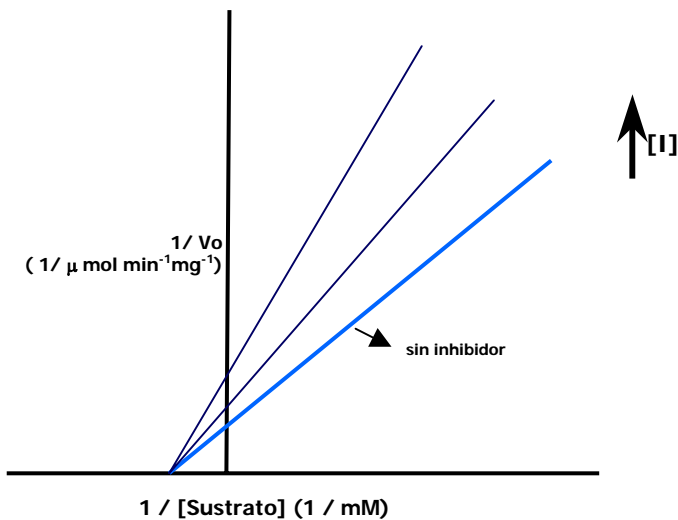


Figura 6. Tipo de inhibición no competitiva. El inhibidor se une a un sitio distinto del activo, provocando un cambio conformacional en la estructura de la enzima, evitando la formación del complejo ES, no modifica la  $K_m$  pero sí la  $V_{max}$ . Gráfica de doble recíproca.

## 2. Antecedentes

### Enzimas detoxificantes encontradas en *Taenia solium*

Dentro de los estudios bioquímicos, moleculares y celulares que se han realizado en *T. solium* se han descrito diversas enzimas. Entre éstas se encuentran las detoxificantes que son particularmente importantes para los parásitos que originan infecciones crónicas. En el estallido respiratorio realizado por las células inflamatorias activadas, las superóxido dismutasas (SODs) son las primeras enzimas que participan en la detoxificación de los radicales libres de oxígeno (RLOs) (66). Si existe la catalasa en estos organismos, el  $H_2O_2$  se transforma en agua y oxígeno, de tal forma que se eliminarían los RLOs primarios, si no el  $H_2O_2$  puede causar daño, pero también puede ser fuente de los radicales secundarios como el anión oxidrilo ( $OH^{\cdot-}$ ). El  $OH^{\cdot-}$  se origina al reaccionar el  $H_2O_2$  con iones  $Fe^{++}$  en la reacción de Fenton. El  $OH^{\cdot-}$  que es más tóxico que los radicales primarios, fácilmente interacciona con los lípidos membranales originando su peroxidación y formación de alquenos y carbonilos, sustancias extramadamente tóxicas para múltiples moléculas biológicas (67).

En el 2002 González *et al*, purificaron una superóxido dismutasa de los cisticercos de *T. solium* (*Ts* SOD) empleando en secuencia una cromatografía de intercambio iónico (etil-amino-cuaternaria, QAE), una cromatografía de interacción hidrofóbica (fenil sefarosa 4B) y un cromatoenfoco (polibuffer 94, PBE). La *Ts* SOD presenta una masa molecular de 30 kDa, es dimérica con monómeros de 15 kDa, y punto isoeléctrico de 6.3. La *Ts* SOD se inhibe un 80% con 10 mM of KCN, sugiriendo que es una enzima de la clase Cu/Zn. Su secuencia de amino ácidos tiene una homología del 76% con la SOD Cu/Zn de *S. mansoni* (68).

Recientemente otra familia de enzimas antioxidantes que utilizan al  $H_2O_2$  e hidroperóxidos, descritas como peroxiredoxinas (PRXs) han sido identificadas en organismos de todos los reinos, incluyendo a los nematodos y trematodos (47). El descubrimiento de este sistema enzimático representa un avance para la comprensión de cómo los parásitos se defienden del estrés oxidativo externo e interno, particularmente los carentes de catalasas y peroxidasas como *T. solium*. Molina *et al*, clonaron y caracterizaron a la 2-cis peroxiredoxina a partir del cDNA de la forma adulta de *T. solium*, que codifica a una cadena polipeptídica de 197 aminoácidos con un peso molecular de aproximado de 21.8 KDa. Esta secuencia contiene dos dominios clásicos de las 2-cis peroxiredoxinas y presenta una alta homología con la 2-cis peroxiredoxina de *Echinococcus ssp*. Al haber sido expresada en *Escherichia coli* y purificada por cromatografía de intercambio aniónico, el análisis bioquímico mostró a la Ts2-CysPrx como un dímero compuesto por monómeros de 22 kDa, presentando actividad con el peróxido de hidrógeno e hidroperóxido de cumeno (69). Así mismo, Rendón y col (2004) purificaron a homogeneidad y caracterizaron una tioredoxina glutatión reductasa de cisticercos de *T. crassiceps* (TGRTc). La TGRTc presenta una actividad de 17.7 y 4.7 U  $mg^{-1}$  para tioredoxin y glutatión respectivamente y una Km de 17, 15 y 3  $\mu M$  para tioredoxin, glutatión y NADPH correspondientemente (70).

### **Glutatión S-Transferasa en *T. solium***



De un extracto crudo de cisticercos de *T. solium*, Vibanco-Pérez *et al* (1999) obtuvieron una GST de 28 KDa, usando cromatografía de afinidad con una columna de sefarosa Glutación reducido, la cual presentó una actividad específica de 2.8 mmol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> para el 1-cloro- 2,4-dinitrobenceno (CDNB) y tuvo actividad de glutación peroxidasa de 0.22 mM min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>. Su caracterización sugiere, en base a su secuencia, que es una GST de la clase mu de mamífero. En estudios inmunológicos (inmunolectrotransferencia) observaron que reacciona en forma cruzada con antígenos de *T. saginata*, *T. taeniaeformis* y *T. crassiceps*, pero no contra *S. mansoni* (71).

La GST de 28 KDa publicada originalmente, resultó ser una mezcla de dos isoformas con masas moleculares de 25.5 y 26.5 KDa. La GST de 25.5 kDa se clonó a partir de cDNA en el sistema de *E. coli* y con esta información se produjo la proteína recombinante (72). La GST de 26.5 kDa se purificó en forma nativa y se describirá mas adelante. Las secuencias de aminoácidos de ambas GSTs demostraron homología de 86% y 85% con *E. granulosus* y *E. multilocularis*, respectivamente y 45–47% de identidad con la GST de clase mu de mamíferos y pollos reportados en el GenBank.

En el 2004, Plancarte *et al*/reportaron la purificación y caracterización cinética de la isoforma de Glutación S-transferasa de 26.5 kDa (SGST26.5). La SGST26.5 tiene un pI de 7.07 y un peso nativo de 60 kDa con dos monómeros de 26.5 kDa. Su actividad óptima se registró a pH 6.5-7.0 y desde 10 a 42 °C se mantuvo estable. La SGST 26.5 presentó una actividad específica de 78, 7.1, 6.6, y 0.7 mM min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> con los sustratos 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), 1,2-dicloro-4-nitrobenceno, 2,4-hexadienal y trans-2-nonenal, respectivamente. Su Vmax para el GSH y CDBN fueron de 74 y 77 mM min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>, respectivamente. La enzima se inhibió de forma no competitiva por el azul de cibacrón, la bromosulfaleína y el cloruro de trifeniltin (73).

### **Actividad de GST en los microsomas de *T. solium*.**

La existencia de varias GSTs citoplásmicas en *T. solium* sugieren que este sistema es importante en sus procesos detoxificantes y pudieran no limitarse solamente al citoplasma. Con el interés de conocer la participación de este sistema dependiente de GSH en los microsomas de *T. solium* se desarrolló este trabajo de investigación.

### 3. Hipótesis

En los microsomas de los cisticercos de *T. solium* se encuentra una proteína integral de membrana con actividad catalítica de glutatión *S* Transferasa, diferente de las glutatión *S* Transferasa citosólicas del parásito.

### 4. Objetivos

- ❖ Demostrar la existencia de la Glutatión *S* – Transferasa microsomal (frGSTMTs) en los cisticercos de *Taenia solium*.
- ❖ Caracterizar las principales propiedades bioquímicas y cinéticas de la frGSTMTs.

### Metas

- Establecer los procedimientos de purificación de la frGSTMTs.
- Desarrollar los estudios de microscopia electrónica en las fracciones subcelulares del parásito.
- Desarrollar diversas técnicas de marcadores enzimáticos subcelulares.
- Demostrar la correlación entre la velocidad de reacción y cantidad de frGSTMTs.
- Demostrar que es una proteína integral de las membranas microsomales.
- Encontrar la concentración óptima de solubilización con Tritón X – 100.
- Determinar la  $appK_m$  y  $appV_{max}$  para sus sustratos GSH y CDNB. Determinar las dosis  $I_{50}$ , tipos de inhibición y  $K_i$  de diferentes moléculas sobre la frGSTMTs.
- Determinar la actividad específica de la frGSTMTs por diversos sustratos.

### 5. Material y métodos

### **Obtención de cisticercos**

A cerdos de indistinta edad, sexo y origen, infectados naturalmente con las larvas de *T. solium*, se les practicó la eutanasia. De sus músculos esqueléticos se extrajeron de forma completa los cisticercos libres de tejido del hospedero. Los cisticercos se lavaron exhaustivamente con PBS pH 7.2, se secaron en papel filtro y se mantuvieron congelados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Obtención de la fracción microsomal de *Taenia solium* (frGSTMTs)**

Se utilizó la técnica de Ernest *et al*, 1962 (74) con algunas modificaciones. Brevemente, cincuenta gramos de cisticercos se mezclaron en una relación de 1:3 (m:v) en amortiguador de fosfatos 10 mM, sacarosa 0.25 M, EDTA 0.3 mM pH 7.0, fenil metil sulfonil fluoruro 1 mM (inhibidor de proteasas). Esta mezcla (150 ml) se homogenizó, con la ayuda de un polytron (Brinkmann Instruments), a 1500 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a intervalos de  $\sim 30$  seg descanso-homogenización. El homogenado se centrifugó por 10 min a  $600\text{ g}$  a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se recuperó el sobrenadante (sn1) y se volvió a centrifugar a  $10,000\text{ g}$  por 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el sobrenadante resultante (sn2) se ultracentrifugó a  $105,000\text{ g}$  por 1 hora a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y el precipitado (pp3) se resuspendió en 150 ml de amortiguador de fosfatos con pH 7.0. El pp3 resuspendido se ultracentrifugó nuevamente a  $105,000\text{ g}$  por 1 hora a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para obtener el precipitado 4 (pp4), el cual se resuspendió en Tris 0.15 M y sacarosa 0.25 M. El pp4 resuspendido se volvió a ultracentrifugar en las mismas condiciones en dos ocasiones mas, lavando de esta forma la fracción microsomal para evitar cualquier tipo de contaminación citosólica. Al final del proceso se obtuvo el precipitado 6 (pp6) al cual llamaremos en adelante frGSTMTs (Figura 7).

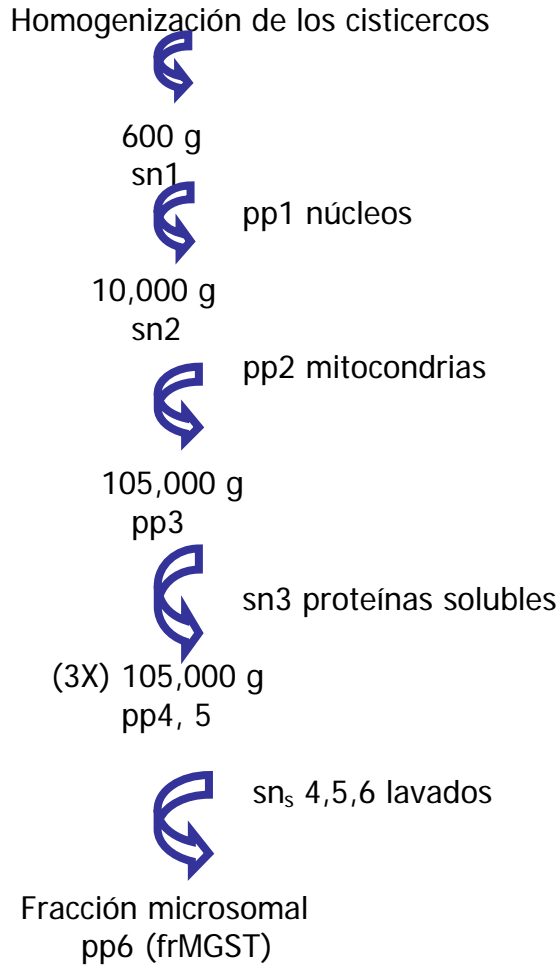


Figura 7. Secuencia del proceso de ultracentrifugación diferencial. Fraccionamiento subcelular de los cisticercos de *T. solium* para la obtención de la fracción microsomal frGSTMTs (pp6).

### **Demostración de la pureza de las fracciones subcelulares**

Para comprobar que la fracción microsomal se encontraba libre de contaminantes citosólicos, se realizaron diferentes preparaciones de las subfracciones para visualizarlas por técnicas de microscopía electrónica y marcadores enzimáticos específicos.

### **Microscopía electrónica de transmisión**

La preparación de las muestras para el análisis de microscopía electrónica consistió en tomar una alícuota de 100 µl de cada uno de los precipitados obtenidos en el proceso de purificación de los microsomas por centrifugación diferencial y

adicionarles 900  $\mu$ l de solución fijadora de Karnovsky en 0.1 M de amortiguador de cacodilatos pH 7.2. Posteriormente las muestras se post-fijaron en tetraóxido de osmio al 1% en presencia de cianuro ferroso de potasio al 1.5% durante 2 horas a 4°C. Las muestras fueron deshidratadas en alcohol y embebidas en resina de baja viscosidad según el método de Suprr, 1969 (75). Todas las muestras fueron cortadas y seccionadas cerca de su superficie, cerca de su región central y cerca de su base para asegurarse de obtener cortes representativos de cada una de ellas. Se realizaron cortes de 40 a 80 nm de espesor y fueron contrastados con acetato de uranilo al 5% y examinados en un microscopio electrónico JEOL 1200 EXII.

### **Marcadores enzimáticos**

Para demostrar la pureza de las diferentes fracciones subcelulares por procedimientos bioquímicos, se realizaron diversos ensayos enzimáticos que identificaron diversas enzimas utilizadas como marcadores clásicos de organelos subcelulares.

Para determinar la Glucosa-6-fosfatasa (marcador microsomal) se utilizó el método de Swanson MA, 1955 (76). El ensayo se desarrolló a 37°C en un volumen total de 1 ml, conteniendo glucosa-6-fosfato 0.04M a pH 6.5. La reacción se paró con ácido tricloroacético al 10 % (m/v). Las muestras se centrifugaron a 30,000 g por 10 min, a una alícuota de 100  $\mu$ l de los sobrenadantes se les determinó la concentración de fosfato inorgánico con ácido ascórbico y molibdato de amonio (Fiske-SubbaRow, 1955) (77).

También se utilizó como marcador (citoplasma) a la enzima lactato deshidrogenasa, mediante la oxidación del NADH en presencia de piruvato como sustrato. La reacción se siguió en un espectrofotómetro a 340 nm durante 3 min a intervalos de 15 seg (78).

Otra enzima estudiada fue la succinato deshidrogenasa (mitocondrias) que permitió medir la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) a 600 nm después de adicionar succinato en presencia de metosulfato fenacina (79).

Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

### **Ensayo enzimático para GSTs en la frGSTM7s**

La fracción microsomal llamada frGSTM7s (pp6) se solubilizó con 0.05 % de Tritón X-100, se realizaron ensayos de actividad catalítica para GSTs, según el método de Habig WH *et al* (49), utilizando como sustratos GSH 3 mM, y CDNB 1 mM. El ensayo consistió en tomar 20 µg de frGSTM7s, y disolverla en amortiguador de ensayo (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6.5) que incluía, GSH 3mM, la reacción se inició con CDNB 1 mM en un volumen final de 1 ml, a 20 °C. Se registró el cambio de absorbancia a 340 nm durante tres minutos utilizando un espectrofotómetro Pharmacia Biotch modelo Ultrospec 1000.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo de investigación fueron analizados con el programa Origin Pro (Scientific Graphing and Analysis Software) de Origin ® 7SR2 Origin Lab Corporation.

### **Demostración del carácter catalítico de la frGSTM7s**

Para este experimento se tomaron 77, 154, 231, 308 y 385 µg de la frGSTM7s y se solubilizaron con Tritón X-100 al 0.05% se determinó la actividad de GST, manteniendo constantes las concentraciones de los sustratos (CDNB 1mM y GSH 3 mM) con la finalidad de aumentar la velocidad inicial al aumentar la concentración proteica de la frGSTM7s. El experimento testigo consistió en utilizar a una GST citosólica del mismo parásito en diferentes concentraciones (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 µg) con las mismas condiciones experimentales.

### **Purificación de la frGSTM7s**

Resina de afinidad (Sef – GSH)

Esta actividad se desarrollo siguiendo el método de Morgenstern et al (80, 81).

El pp6 obtenido mediante la técnica de centrifugación diferencial se dializó exhaustivamente contra PBS pH 7.4 para pasarse por una columna de Sefarosa – Glutación (1.5 X 20 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 con PBS, empleando un volumen de cinco veces al de la columna. Posteriormente fueron eluidas de la resina con una solución de glutatión reducido (GSH) 5 mM en PBS pH 7.4, siendo el excluido (proteínas no absorbidas) la frGSTM7s. Tanto el desempeño cromatográfico de las proteínas como la actividad enzimática para la GST se registraron espectrofotométricamente a 280 y 340 nm, respectivamente.

#### Resina de Hidroxiapatita

Esta fracción excluida (frGSTM7s) se concentró a su concentración original (30 – 40 mg/ml) utilizando un sistema de concentración negativa con nitrógeno gaseoso Amicon (Amicon Millipore) con la ayuda de una membrana de ultrafiltración YM-5 (Amicon Millipore). Posteriormente esta fracción se solubilizó con Tritón X – 100 al 2.5 % en presencia de N-etilmaleimida 2.5 mM y GSH 2.5 mM, se dializó exhaustivamente contra  $K_2HPO_4$  10 mM, Tritón X – 100 al 1%, GSH 1 mM, pH 7.0, con la finalidad de pasar a la fracción por una columna (2.5 X 5 cm) de Hidroxiapatita Tipo I (HTP) (Bio – Rad Laboratories, Inc), equilibrada con el mismo amortiguador de diálisis. La velocidad del flujo se estableció aprox. en 20 ml/ h y se colectaron fracciones de 5.5 ml. Las proteínas no absorbidas a la resina se lavaron con cinco veces el volumen de la columna usando la solución de equilibrio. Las proteínas absorbidas a la resina se eluyeron con un gradiente de 0.01M a 0.3 M de  $K_2HPO_4$ , empleando el mismo amortiguador de equilibrio acelerando la velocidad del flujo a 100 ml/ h. Por la presencia del Tritón X – 100 (valor máximo de absorbancia 280 nm) no se pudo seguir el desempeño cromatográfico de las proteínas y sólo se realizó la actividad enzimática para GST espectrofotométricamente a 340 nm.

#### Resinas de Intercambio Iónico (CM- Sef y Sef Q)

Las fracciones que presentaron actividad de GST se concentraron lo más posible nuevamente en Amicon, se dializaron exhaustivamente contra acetato de sodio 0.5 M y Tritón X – 100 al 0.1%, pH 6.0 y se cromatografiaron en una columna (1.5 X 12 cm) de CM–Sefarosa fast flow (intercambiador catiónico) (Amersham Pharmacia

Biotech), lavada con acetato de sodio 0.5 M, pH 6.0 y con acetato de sodio 0.05 M, pH 6.0. Equilibrada con acetato de sodio 0.5 M y Tritón X – 100 al 0.1%, pH 6.0. Se colectaron fracciones de 1.5 ml a una velocidad de flujo de 18 ml/ h, siguiendo el mismo método de lavado descrito. Las proteínas absorbidas se eluyeron usando un gradiente salino de 0 a 0.2 M de NaCl, empleando el amortiguador de equilibrio. El desempeño cromatográfico se siguió espectrofotométricamente mediante la actividad de GST a 340 nm.

Nuevamente las fracciones con actividad de GST se concentraron en Amicon y se dializaron contra Tris (hidroximetilaminometano) – HCl 0.05M pH 8.0 y Tritón X – 100 al 0.1 %, para cromatografiarlas por una columna (1.5 X 8.5 cm) de resina Sefarosa Q (intercambiador aniónico) (Amersham Pharmacia Biotech), lavada con Tris 0.5M, pH 8.0 y posteriormente equilibrada con Tris – HCl 0.05M pH 8.0 y Tritón X – 100 al 0.1 %, siguiendo las mismas condiciones descritas para la cromatografía de CM-Sef.

### **Demostración de la frGSTMTs como una proteína integral de membrana del RE.**

Para comprobar que la actividad de GST detectada en los microsomas se debía a una proteína integral de membrana y no a una proteína asociada, se utilizaron los siguientes procesos sobre la frGSTMTs (Tabla I).

Se tomaron alícuotas del pp6 (aproximadamente 6 mg / 150  $\mu$ l) y se incubaron por media hora con 450  $\mu$ l de cada uno de los tratamientos descritos en agitación lenta; otra alícuota con las mismas características se diluyó en 450  $\mu$ l de  $K_2HPO_4$  10 mM y fue sonicada a intervalos de 15 segundos hasta llegar a 1 minuto. Como experimento testigo se tomó una alícuota sin ningún tratamiento, se diluyó en 450 $\mu$ l de  $K_2HPO_4$  10 mM. Se centrifugaron a 105,000 g durante 1 hora. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en 150 $\mu$ l  $K_2HPO_4$  10 mM y se colocaron los sobrenadantes. Se realizaron por triplicado ensayos de actividad catalítica a los sobrenadantes y a los precipitados en presencia de 0.05% de Tritón X – 100.



Tabla I. Procesos efectuados en la frGSTMTs para demostrar su integridad  
membranal

Procesos
Glicina 1M pH 9.0
GSH 5 mM pH 8.0
DTT 5mM pH 8.0
EDTA 10 mM pH 7.4
NaCl 0.1 M
pH 10.4, 9.2, 8.0, 6.6
KCl 3M pH 7.0
Urea 1M pH 7.0
Sonicación

### **Ensayos de activación de la frGSTMTs con agentes sulfidrílicos (*N* – etilmaleimida e Iodacetamida)**

Las proteínas MAPEG de mamíferos incrementan de 7 a 10 veces su catálisis de GST cuando se activan con agentes sulfidrílicos, tales como la *N* – etilmaleimida (NEM) y la Iodacetamida (IAA) (82). Para corroborar que la frGSTMTs se activa con estos compuestos, se decidió tratar alícuotas de dicha fracción (4 mg/ 100  $\mu$ l) con cada uno de los reactivos que se describen en el trabajo de Morgenstern *et al*, 1982 (82), de forma separada y en sus diversas combinaciones, como se describe a continuación:

frGSTMTs + Tritón X - 100 al 10%

frGSTMTs + Tritón X - 100 al 10% + GSH 0.1M

frGSTMTs + Tritón X - 100 al 10% + DTT 0.1M

frGSTMTs + GSH 0.1M

frGSTMTs + GSH 0.1M + NEM 10 mM

frGSTMTs + DTT 0.1M

frGSTMTs + DTT 0.1 M + NEM 10 mM

frGSTMTs + NEM 10 mM

frGSTMTs + Tritón X - 100 al 10% + NEM 10 mM

frGSTMTs + Tritón X - 100 al 10% + DTT 0.1M + NEM 10 mM

frGSTMTs + Tritón X - 100 al 10% + GSH 0.1M + NEM 10 mM

Estos tratamientos se repitieron por triplicado y los ensayos testigos consistieron en realizar los mismos experimentos, pero en ausencia de la frGSTMTs.

También se realizaron ensayos catalíticos de GST a la frGSTMTs tratándola con diferentes concentraciones de NEM e IAA (Tabla II) en presencia de Tritón X-100 al 0.05 %, con la finalidad de observar si existía un efecto de dosis respuesta de los compuestos sulfidrílicos sobre la fracción microsomal.

Tabla II. Concentraciones de agentes sulfidrílicos empleados en la activación de la frGSTMTs.

Tratamiento	Concentración (mM)
<i>N</i> - etilmaleimida (NEM) Tritón X – 100 al 0.05%	0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1 y 2
Iodacetamida (IAA) Tritón X – 100 al 0.05%	0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2

### **Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad catalítica de frGSTMTs**

Con la finalidad de encontrar el grado de solubilidad óptimo para la frGSTMTs, diversas alícuotas de la fracción (aproximadamente 2 mg / 50 µl) se mezclaron con Tritón X-100 en concentraciones porcentuales de 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 y 0.001. Al menos 10 minutos después de solubilizarlas se desarrolló el ensayo enzimático en ellas para determinar su actividad de GST.

Posteriormente, se analizó el efecto del tiempo en la solubilización de la frGSTMTs. Para este fin se incubó la frGSTMTs con Tritón X-100 (0.05%) en

diferentes tiempos (1, 10, 30, 60, 120 y 180 minutos) e inmediatamente se determinó la actividad de GST, también se realizaron ensayos enzimáticos a muestras guardadas por cuatro semanas a -20°C.

### **Determinación de la estabilidad de la frGSTM7s en función del pH.**

Diversas alícuotas de 4 mg/ 100 µl de la frGSTM7s solubilizadas con Tritón X-100 se dializaron exhaustivamente en amortiguadores con un rango de valores de pH de 3 a 12 (Tabla III). Inmediatamente después cada alícuota se agregó al amortiguador de ensayo (siempre a pH 6.5) y se continuó con el procedimiento de Habig y col (49) para obtener las velocidades iniciales de reacción y graficarlas contra los valores de pH.

### **Determinación del pH óptimo de reacción para la frGSTM7s**

La determinación del pH óptimo de la reacción se llevo a cabo siguiendo el método de Habig *et al* (49) y empleando al CDNB como substrato y diversas soluciones de ensayo que variaron en su pH como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla III. Amortiguadores con diferentes rangos de pH

<b>Amortiguador</b>	<b>pH</b>
50 mM Citrato de Sodio – 50 mM ácido cítrico	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0
50 mM fosfato de sodio monobásico – dibásico	6.5, 7.0, 7.5, 8.0
50 mM Tris – HCl	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12

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 frGSTM7s a diferentes temperaturas**

La estabilidad de la frGSTM7s a diferentes temperaturas se determinó por estudios de cinética enzimática (49). Diversas alícuotas de 0.2 mg de la frGSTM7s se solubilizaron con Tritón X-100 al 0.05% e 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 0-90°C y en el análisis se consideraron intervalos de 10 °C. Inmediatamente después de transcurrido el tiempo de incubación se realizaron las cinéticas, adicionando el sustrato CDNB (1 mM) y registrando el cambio de absorbancia durante tres minutos. Los ensayos controles consistieron en realizar el mismo procedimiento pero en ausencia de la frGSTM7s. Con los datos se obtuvieron las velocidades iniciales ( $V_0$ ) de cada reacción catalítica.

### **Obtención de los parámetros cinéticos aparentes de la frGSTM7s.**

Con la finalidad de confirmar que la actividad catalítica detectada en los microsomas es debido a una enzima, se determinaron las constantes cinéticas aparentes para los sustratos GSH y CDNB desarrollados por la frGSTM7s.

### **Obtención de $K_m$ y $V_{max}$**

Para obtener estos valores se realizaron diversos ensayos de la velocidad inicial catalizados por la frGSTM7s en presencia de Tritón X-100 al 0.05% y evaluados espectrofotométricamente a 340 nm (49). Para este fin, se mantuvo fija la concentración de la frGSTM7s (200 µg) y a saturación la del CDNB (3mM) mientras que la concentración del GSH se varió en un intervalo de 0.025 - 5 mM (Tabla IV), Para determinar las constantes correspondientes para el CDNB, se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración del CDNB en un intervalo de 0.1 a 5 mM y manteniendo a saturación la del GSH (3mM) (Tabla IV).

Tabla IV. Concentraciones del GSH y CDNB para determinar  $V_{max}$  y  $K_m$

Sustrato	Concentración (mM)
Glutación reducido (GSH)	0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 4.5 y 5 CDNB 1 mM constante
1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB)	0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 GSH 3 mM constante

Para determinar los valores de las constantes cinéticas se utilizó la ecuación de Michaelis – Menten y se construyeron gráficas de 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  $-1 / K_m$ .

### Ensayos de inhibición de la actividad catalítica de la frGSTM7s

Los estudios de inhibición se desarrollaron para determinar los valores de  $I_{50}$  de diversos compuestos por el procedimiento descrito por Tahir MK y Mannervik B (83). La  $I_{50}$  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 (84), empleando al CDNB como el sustrato secundario.

Se realizaron experimentos de inhibición utilizando rosa de bengala, azul de cibacrón, bromosulfaleína, indometacina y cloruro de trifeniltin. De cada uno de estos reactivos se obtuvo la  $I_{50}$ ,  $K_i$  y el tipo de inhibición.

La fracción microsomal en presencia de Tritón X – 100 al 0.05% se trató con los inhibidores descritos en la Tabla V, utilizando diferentes concentraciones de cada uno de ellos.

Tabla V. Concentraciones de diferentes reactivos inhibidores de la actividad de GST en la frGSTM7s

<b>Tipo de inhibidor</b>	<b>Concentraciones (<math>\mu</math> M)</b>
Azul de cibacrón	0.1, 1, 10, 100, 1000
Bromosulftaleína	0.1, 1, 10, 100, 1000
Rosa de Bengala	0.1, 1, 10, 100, 1000
Indometacina	0.1, 1, 10, 100, 1000
Cloruro de Trifeniltin	0.1, 1, 10, 50, 100

Los ensayos enzimáticos se realizaron siguiendo el método de Tahir MK y Mannervik B (84), pero antes de iniciar la reacción con el CDNB se agregó el inhibidor, agitando rápidamente la mezcla. Los datos obtenidos permitieron determinar la  $I_{50}$  de cada uno de los reactivos empleados.

### **Tipo de Inhibición y constantes inhibitorias ( $K_i$ )**

El tipo de inhibición que cada inhibidor (RB, CT, AC, BTS) efectuó sobre la frGSTM7s se estudió por medio de sistemas de inhibición simple. 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 RB se mezclaron la frGSTM7s (200  $\mu$ g), GSH (3 mM), RB (5  $\mu$ M) en el amortiguador de ensayo, después de 5 minutos se inició la reacción enzimática al añadir una de las siguientes concentraciones de de CDNB 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.5 mM, el volumen final de la mezcla de 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 permitió construir una recta en un sistema de Lineweaver – Burk, donde se graficó el inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración del CDNB, de tal forma que la recta representa el inverso de la velocidad inicial de la frGSTM7s para la concentración de 5  $\mu$ M de RB. Se

construyó otra recta de este tipo para el RB pero con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  y otra más en ausencia de inhibidor.

Para conocer el tipo de inhibición que ejerció el CT sobre la frGSTM7s, se repitió todo el procedimiento anterior, pero empleando las concentraciones de 4 y 10 mM para el CT y las de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 mM para el CDNB. De forma similar para la BTS sus concentraciones fueron 10 y 100  $\mu\text{M}$  y las del CDNB las mismas descritas anteriormente y finalmente para el AC se utilizaron las concentraciones de 10 y 30  $\mu\text{M}$  con las mismas concentraciones de CDNB previamente mencionadas.

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 RB, CT, BTS y AC se calcularon al re-graficar los valores de los interceptos en el eje de las ordenadas, originados de la primera gráfica de Lineweaver-Burk frente a la concentración del inhibidor correspondiente.

### **Especificidad de la frGSTM7s por diversos sustratos electrofílicos**

Con la finalidad de evaluar el rango de especificidad por diversos sustratos electrofílicos por parte de la frGSTM7s, se realizaron ensayos catalíticos siguiendo el método de Habig y col, sustituyendo al CDNB por los sustratos descritos en la tabla VI. El cambio de absorbancia se registró durante tres minutos en la longitud de onda de máxima absorción para cada de los sustratos (49).

**Tabla VI. Sustratos electrofílicos empleados en la especificidad de la frGSTM7s**

Sustrato	[Sustrato] mM	pH	$\lambda$ max nm	$\Delta\epsilon$ mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
1 – cloro -2,4 – dinitrobenceno	1.0	6.5	340	9.6
1,2 – dicloro – 4- nitrobenceno *	1.0	6.5 7.5	345	8.5
p – nitrobencil clorido	1.0	6.5	310	1.9
1,2–epoxy–3 (p-nitrofenoxi) propano	5.0	6.5	360	0.5
Bromosulfaleína	0.03 0.6	7.5	330	4.5
Trans–4– fenil – 3– butano – 2 – one	0.05	6.5	290	24.8
Ácido etacrínico	0.2	6.5	270	5.0

Condiciones para ensayos enzimático espectrofotométricos en 50 mM fosfato de sodio y \* 50 mM fosfato de potasio, en presencia de 3 mM GSH.

◇ Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en el apéndice

### **Especificidad de la frGSTM7s por la N-acetil-cisteína (NAC)**

La N-acetil-cisteína es un sustrato único y eficiente para las GTS microsomales de mamíferos (85) fue por ello que se decidió probar este reactivo en lugar del Glutación reducido, siguiendo el mismo ensayo catalítico descrito. También se probó con los diferentes sustratos electrofílicos anteriormente mencionados con las mismas condiciones.

## **6. Resultados**

### **Purificación de la fracción microsomal de cisticercos de *T. solium***

La fracción microsomal de los cisticercos de *T. solium*, se obtuvo en el primer precipitado de la ultracentrifugación a 105,000 g (pp4). Con la finalidad de eliminar a las proteínas citosólicas que normalmente están presentes en esta fracción, pp4



se sometió a 2 lavados adicionales por ultracentrifugación. De esta forma la fracción pp6, que denominamos también frGSTMTs, es una fracción prácticamente libre de proteínas solubles, Figura 7.

## **Demostración de la pureza de las fracciones subcelulares**

### **Microscopia electrónica de transmisión**

Para verificar la pureza de las fracciones pp1 (núcleos), pp2 (mitocondrias, lisosomas) frGSTMTs (microsomas), diversas muestras de estos precipitados se analizaron por microscopía electrónica de transmisión. La figura 8 muestra la fracción pp1 formada principalmente de núcleos, detritus y vesículas de gran tamaño, propias de un precipitado celular originado por una fuerza centrífuga baja (600 g). La figura 9 corresponde a la fracción pp2. En ella se pueden distinguir diversas mitocondrias, vesículas de tamaño medio con glucógeno y peroxisomas. La figura 10 indica que la fracción pp6 presenta prácticamente cuerpos formados por membranas del retículo endoplásmico (microsomas) y algunos gránulos de glucógeno.

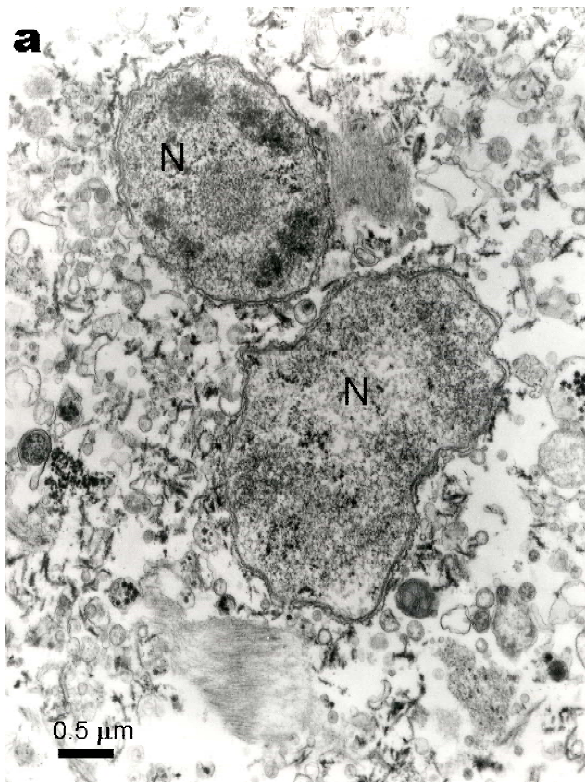


Figura 8 (a). Microscopia electrónica de transmisión de la fracción pp1, formada por núcleos, detritus y vesículas de gran tamaño.

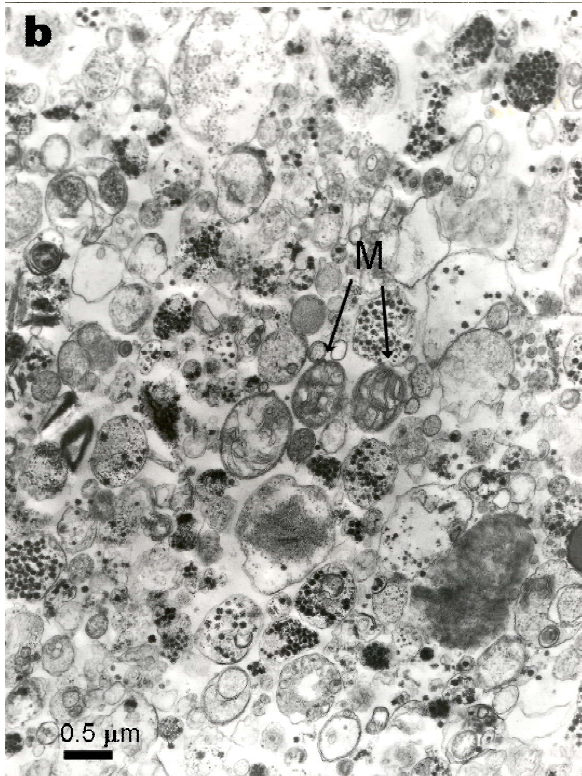


Figura 9 (b).Microscopia electrónica de transmisión de la fracción pp2. Mitochondrias, vesículas de mediano tamaño con glucógeno y peroxisomas se muestran con claridad.

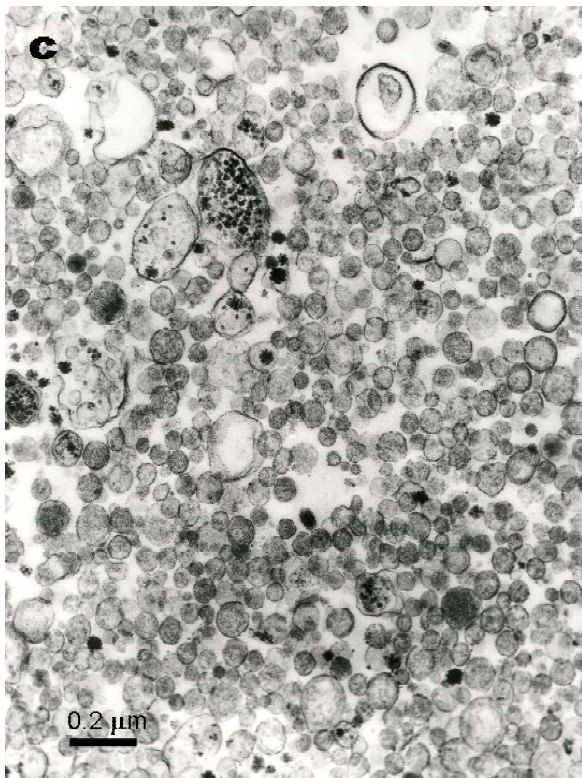


Figura 5 (c).Microscopía electrónica de transmisión de la fracción pp6 con abundantes microsomas y escasos gránulos de glucógeno.

## **Marcadores enzimáticos**

La figura 11 muestra la distribución de la actividad catalítica de los diferentes marcadores enzimáticos en las diversas fracciones parasitarias. Se observa una correlación entre los componentes celulares de cada fracción purificada y la actividad específica de la enzima marcadora para ese organelo. Por ejemplo, la mayor actividad para la enzima succinato deshidrogenasa, se encontró en la fracción pp2. Esta fracción presenta numerosas mitocondrias, en las cuales se sabe de la presencia de esta enzima en abundante concentración. También se puede observar actividad de esta enzima en las fracciones correspondientes a los núcleos y los microsomas pero en muy bajas concentraciones y prácticamente nada en la fracción citoplásmica. Con respecto a la enzima glucosa-6-fosfatasa su mayor actividad se observó en la fracción pp6, esta es una enzima característica de las membranas del retículo endoplásmico. La actividad enzimática de lactato deshidrogenasa se encontró en la fracción citosólica, y poca contaminación en el resto de las fracciones.

Estos datos junto con los estudios de microscopía electrónica demuestran que la técnica de ultracentrifugación diferencial fue efectiva para obtener microsomas de los cisticercos de *T. solium*.

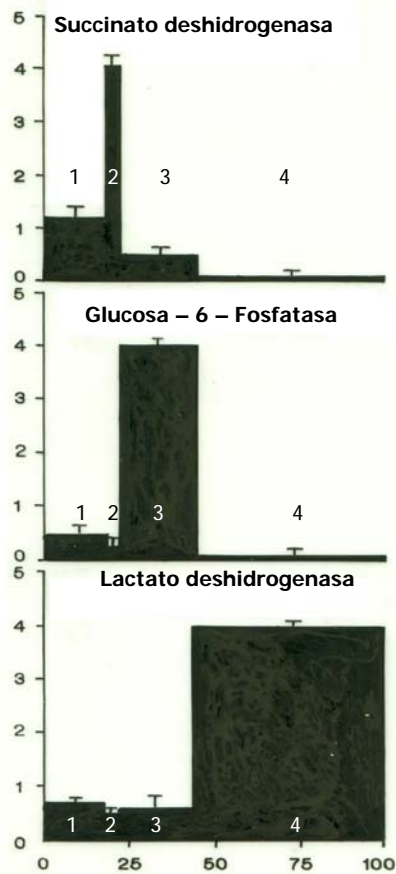


Figura 11. Gráficas que muestran las actividades específicas relativas de las diferentes enzimas utilizadas como marcadores específicos en las subfracciones celulares obtenidas en purificación diferencial de microsomas de cisticercos de *Taenia solium*. 1) 600 g, 2) 10 000 g, 3) 105 000 y 4) sn.

### Actividad catalítica de GST en la fracción microsomal de *T. solium* (frGSTMTs)

La frGSTMTs solubilizada con Tritón X-100 fue capaz de conjugar GSH y CDNB (49). Esta característica de las enzimas GSTs se reforzó en la frGSTMTs al correlacionar el incremento de la velocidad de la reacción catalítica con la cantidad de la enzima empleada (figuras 12 y 13). En la Tabla VII se comparan los valores reales de las velocidades iniciales obtenidos en cada reacción catalítica con los valores esperados. Se puede observar, que ambos valores son muy semejantes entre si.

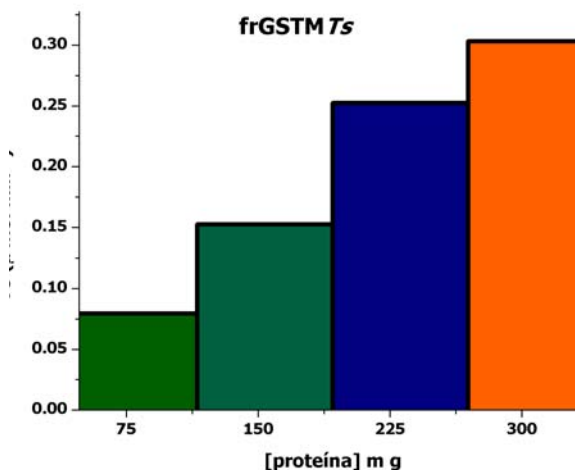
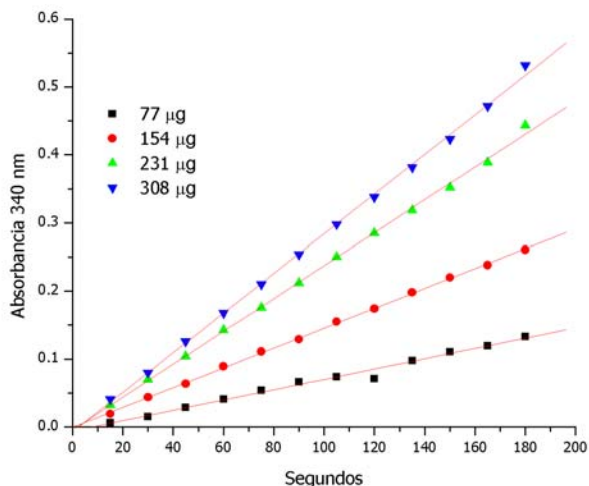


Figura 13. Gráfica de la absorbancia a 340 nm en función del tiempo de las reacciones catalíticas de GST con GSH 3 mM y CDNB 1mM, usando diferentes concentraciones de la frGSTM7s

Figura 13. Gráfica de velocidades iniciales de las reacciones catalíticas empleando concentraciones fijas de sustrato y aumentando proporcionalmente la concentración de la frGSTM7s.

Tabla VII. Comparación de las  $V_0$  observadas vs las esperadas de la frGSTM7s

[frGSTM7s] µg	Valores obtenidos µmol min <sup>-1</sup>	Valores esperados µmol min <sup>-1</sup>
<b>77 (1X)</b>	0.079	<b>0.079</b>
<b>154 (2X)</b>	0.152	<b>0.158</b>
<b>231 (3X)</b>	0.252	<b>0.237</b>
<b>308 (4X)</b>	0.303	<b>0.316</b>

Como experimento control de los resultados antes descritos, se utilizó a la enzima GST citosólica de 26.5 kDa de *T. solium* (73). La finalidad fue comparar el carácter catalítico de esta enzima soluble con la actividad de GST detectada en los microsomas. En las figuras 14 y 15 se observa el aumento proporcional de la velocidad inicial ( $V_0$ ) en relación al aumento de la concentración de las enzimas tanto en la frGSTM7s como en la GST<sub>26.5</sub> respectivamente. La Tabla VIII muestra

los valores de las velocidades iniciales ( $V_o$ ) obtenidas frente a las  $V_o$  esperadas. Estas observaciones están de acuerdo con el principio básico enzimológico, que a mayor concentración de una enzima mayor es su velocidad de reacción.

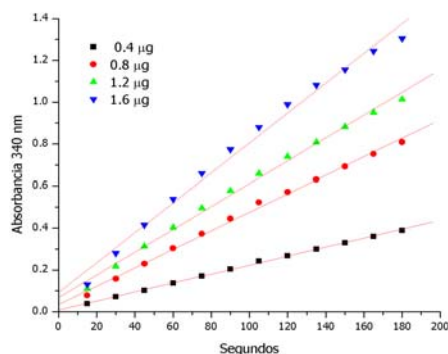


Figura 14. Gráfica de la absorbancia a 340 nm en función del tiempo de las reacciones catalíticas de GST con GSH 3 mM y CDNB 1mM, usando diferentes concentraciones de la fracción GST soluble de *Taenia solium*.

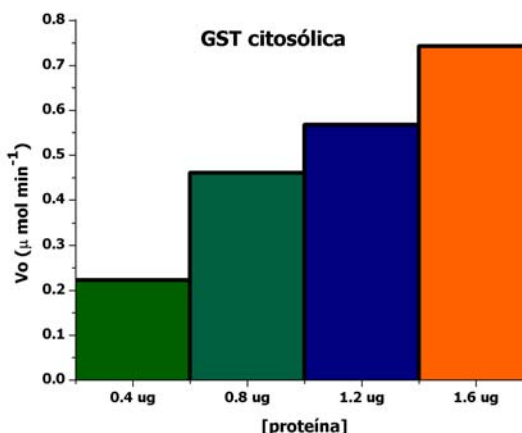


Figura 15. Gráfica de velocidades iniciales de las reacciones catalíticas, empleando concentraciones fijas de sustrato y aumentando proporcionalmente la concentración de la GST soluble.

Tabla VIII. Comparación de las  $V_o$  observadas vs las esperadas

[GST] cit µg	Valores obtenidos $\mu\text{ mol min}^{-1}$	Valores esperados $\mu\text{ mol min}^{-1}$
0.4 (1X)	0.223	0.223
0.8 (2X)	0.46	0.446
1.2 (3X)	0.567	0.669
1.6 (4X)	0.743	0.892

### Purificación de la frGSTM7s

Resina de afinidad (Sef – GSH)

En el primer paso de purificación empleado (resina de afinidad) demostró que la frGSTM7s no presenta una interacción con las moléculas del GSH, creemos que es

debido a que los sitios de afinidad al GSH no están expuestos, ni en forma soluble (en presencia de Tritón X – 100) ni en estado insoluble. Debido a que se realizaron varias cromatografías (n= 4) de la fracción microsomal en esta resina y en todos los casos se excluyó totalmente la frGSTM7s. Sin embargo, se recuperó a las fracciones eluidas que al ser concentradas por un sistema Amicon (Amicon Millipore) en geles de de acrilamida al 12 % (tinción en plata) se visualizó una banda de aprox 27 KDa sugerente a una GST soluble asociada a microsomas, dicha fracción presentó actividad catalítica para GST (49) con una actividad específica de  $43 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , valor diferente a los anteriormente reportados para GSTs solubles en *T. solium* (68, 69, 70) (figura 16). A partir de esta primera cromatografía se obtuvieron diversos datos útiles para elaborar una tabla de purificación (Tabla IX).

#### Resina de Hidroxiapatita

La fracción no unida a la resina de afinidad se aplicó a una columna de hidroxiapatita, la parte eluida con el gradiente 0.01M a 0.3 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  presentó actividad de GST, éstas fracciones se colectaron y se concentraron en Amicon para ser observadas en un gel de acrilamida al 12 % teñido con azul de Coomassie, siendo prácticamente idénticos, la fracción eluida y la frGSTM7s antes de entrar a la resina (figura 17) no existiendo proteínas en las fracciones correspondientes al excluido de la cromatografía. En la Tabla IX se observa que esta resina sólo purificó a la frGSTM7s 1.125 veces con un rendimiento bajo, del 9%.

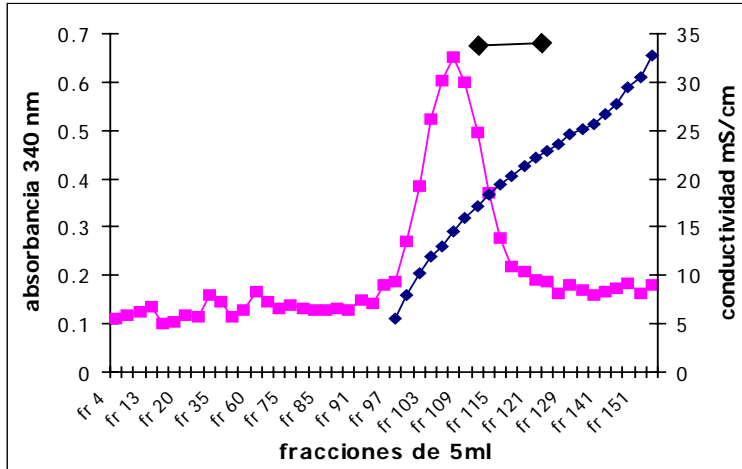


Figura 16. Cromatografía en HTP de la frMGSTM7s, se muestra la actividad de GST ( $\lambda$  340 nm) y el incremento de la fuerza iónica ( $\bullet$  conductividad mS/cm).

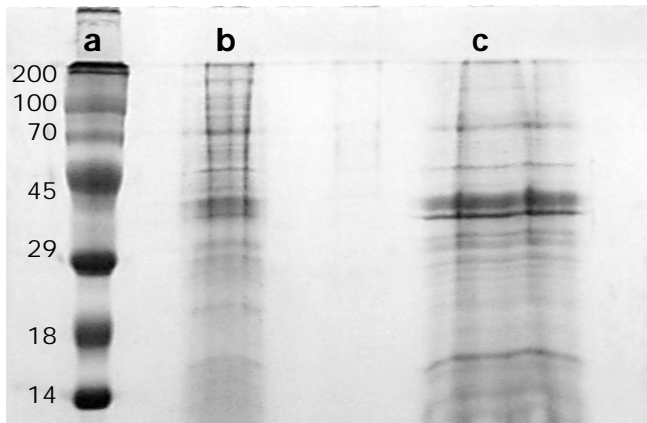


Figura 17. SDS - Page acrilamida 12 %, tinción en azul de Coomassie. Análisis de la frGSTM7s en la columna de Hidroxiapatita. a) marcadores moleculares estándar, b) frGSTM7s antes de entrar a HTP, c) frGSTM7s eluída de HTP con un gradiente de 0.01M a 0.3 M de  $K_2HPO_4$ .

#### Resinas de Intercambio iónico (CM – Sef y Sef – Q)

Nuevamente las fracciones con actividad de GST se incluyeron en una cromatografía de intercambio catiónico (CM – Sef), observando que la frGSTM7s no interactuaba con la resina (fracción excluída); sin embargo, en la Tabla IX se observa que existe una purificación de aprox. 152 veces y un rendimiento del 82%. Al ver que la frGSTM7s no interactuaba con la resina catiónica se optó por utilizar una cromatografía de intercambio aniónico (Sef – Q), las fracciones eluídas con un gradiente de 0 a 0.2 M de NaCl, presentaron alta actividad de GST (figura 18). En la figura 19 se muestra el análisis en SDS - Page de la fracción eluída de esta columna, observándose tan solo un patrón de 5 bandas. En la tabla IX se describe que existió una purificación aproximadamente de 160 veces pero su rendimiento decayó al 5.7%. En base a estos resultados, consideramos que estas



formas de cromatografías no eran las adecuadas para obtener una GST microsomal homogénea de las larvas de *T. solium*.

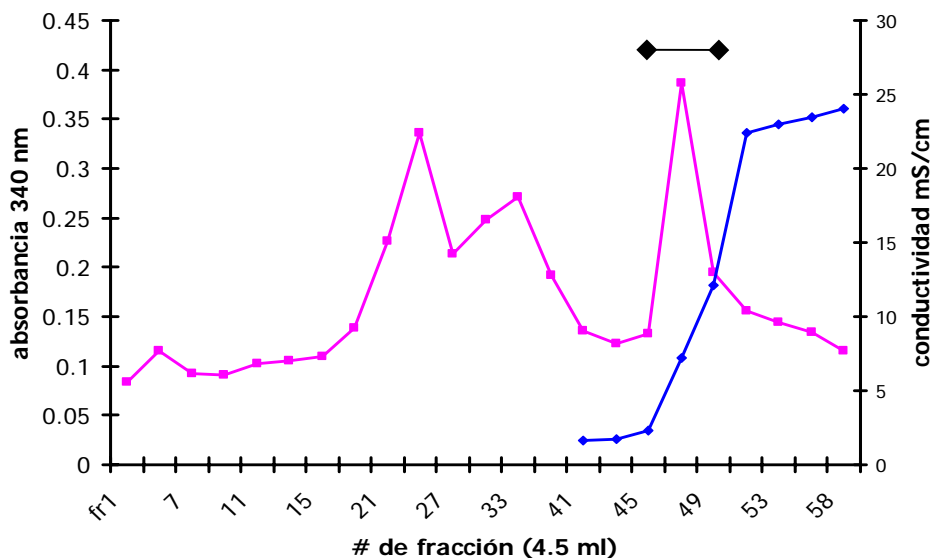


Figura 18. Cromatografía en Sef – Q del excluido de CM – Sef, se muestra la actividad de GST  $\lambda$  340 nm) y el incremento de la fuerza iónica ( $\bullet$  conductividad mS/cm).

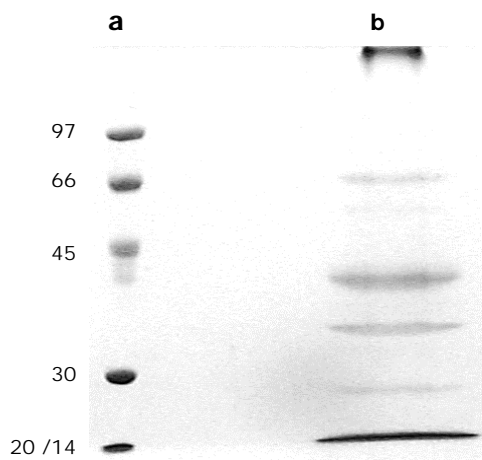


Figura 19. SDS - Page acrilamida 12 %, tinción en plata. Análisis de la frGSTM7s en la columna de Sef - Q. a) marcadores moleculares estándar, b) frGSTM7s eluída de Sef – Q de 0 a 0.2 M de NaCl.

Tabla IX. Resumen de los pasos de purificación de la frGSTM7s

Etapa	Vol Total (ml)	Proteína Total (mg)	Act Esp (U/mg)	Act Total (mU)	% de rendimiento	# de purificaciones
frGSTM7s	16.5	742.5	0.0031	2.3		
frGSTM7s excluido de Sef- GSH	15	500	0	0		
frGSTM7s Tritón X – 100	65	500	0.04	20	100	1
frGSTM7s excluido de HTP	100	40	0.045	1.8	9	1.125
frGSTM7s excluido de CM – Sef	100	2.7	6.07	16.4	82	151.75
frGSTM7s eluido de Sef - Q	4.5	0.18	6.38	1.14	5.7	159.5

### **Evidencias que demuestran que la actividad de GST en la frGSTM7s es de una proteína integral de membrana**

Con la finalidad de demostrar que la actividad de GST en los microsomas de *T. solium* (frGSTM7s) es debida por una enzima integral de membrana y no por una GST unida superficialmente al retículo endoplásmico y/o contaminación por GSTs citosólicas, se realizaron diversos tratamientos físicos y químicos sobre los microsomas parasitarios.

La figura 20 muestra los cambios de absorbancia en función del tiempo de las cinéticas desarrolladas por diferentes alícuotas de la frGSTM7s sometidas a diversos tratamientos; de forma similar en la figura 21 se observan comparativamente los valores de las actividades específicas. Esta serie de datos nos muestra que la actividad de GST en los microsomas parasitarios prácticamente no fue modificada por ningún tratamiento. Adicionalmente, en los sobrenadantes de las diferentes alícuotas de la frGSTM7s tratadas no se registró ninguna

actividad de GST. En la tabla X se observan los valores de las actividades específicas obtenidas en los diferentes tratamientos, además del porcentaje de actividad residual. Al comparar el efecto de los tratamientos empleados, la mayor pérdida de actividad correspondió al tratamiento con EDTA 10 mM pH 7.4 con un porcentaje residual del 80 %; sin embargo, en los tratamientos con urea 1 M (114 %), KCl 3 M (106 %) y DTT 5 mM (108 %) se observó un incremento y en el resto de los tratamientos, la actividad residual se mantuvo casi constante (sonicado 100%), en un rango del 86 al 95 % de actividad (NaCl con diferentes pHs, glicina 1M y GSH 5 mM). Todos los tratamientos se repitieron dos veces y las reacciones enzimáticas se realizaron por triplicado, sugiriendo que el porcentaje de variación entre los diferentes tratamientos se debe a variación inespecífica por parte de cada uno de éstos. Utilizando una *prueba de t* (Origin Pro), donde la media de la actividad específica es de  $0.8193 \mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  y la media del porcentaje es de 96.34% a un nivel de 0.05 no se encontraron diferencias significativas dentro de la población. Estas observaciones sugieren que la actividad enzimática está dada por una enzima integral de membrana y no por una asociada, debido a que la actividad solo se registró en las fracciones no solubles, es decir en los microsomas y no en las fracciones solubles (sobrenadantes de cada uno de los tratamientos).

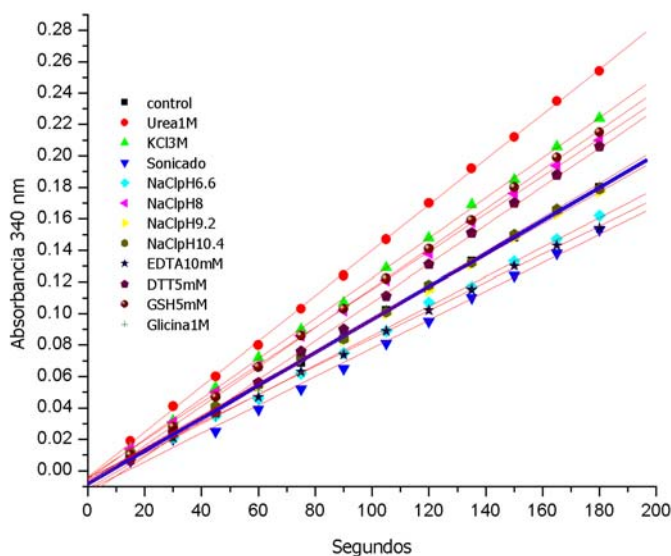


Figura 20. Absorbancia en función del tiempo de la frGSTM1s en presencia de GSH 3 mM y CDNB 1mM. La frGSTM1s se sometió a los tratamientos descritos en la figura.

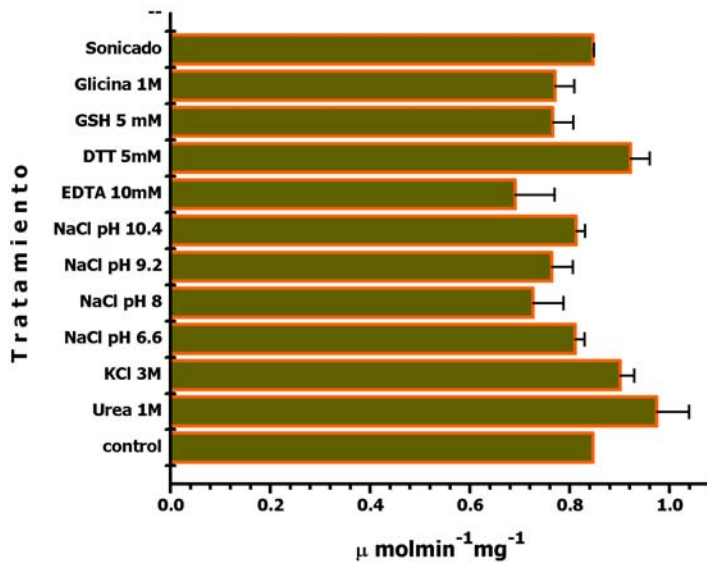


Figura 21. Actividades específicas para GST de diferentes alícuotas de la frGSTM7s frente a diversos tratamientos. Prácticamente todos los valores fueron muy similares al del control que no recibió ningún tratamiento. Barras error estándar. Prueba de t a 0.05, la media ( $0.8193 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) de la población no son significativamente diferentes

Tabla X. Actividad específica y residual para GST desarrollada por la frGSTM7s en función de diversos tratamientos.

Tratamiento	$V_o$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	% de actividad residual
Sonicado	0.85	100
Glicina 1 M pH 9	0.77	90.6
GSH 5 mM pH 8	0.77	90.6
DTT 5 mM pH 8	0.92	108
EDTA 10 mM pH 7.4	0.69	81
NaCl pH 10.4	0.81	95.3
NaCl pH 9.2	0.76	89.4
NaCl pH 8	0.73	85.9
NaCl pH 6.6	0.81	95.3
KCl 3M pH 7	0.9	106
Urea 1M pH 7	0.97	114
<b>Testigo pH 7</b>	<b>0.85</b>	<b>100</b>

## Efecto de agentes sulfidrílicos (*N* - etilmaleimida e Iodacetamida) sobre la frGSTM7s

La figura 22 muestra los histogramas de las actividades específicas de la frGSTM7s frente a diversos tratamientos a que fue sometida. Son notorios los datos en donde la ausencia del Triton X-100 en la frGSTM7s correlacionó con la ausencia de actividad para GST. Esta observación sugiere que para poder detectar la actividad de GST en los microsomas de cisticercos de *T. solium* es necesario que éstos se encuentren en estado soluble. También muestra que ninguno de los agentes químicos pudo activar a la frGSTM7s.

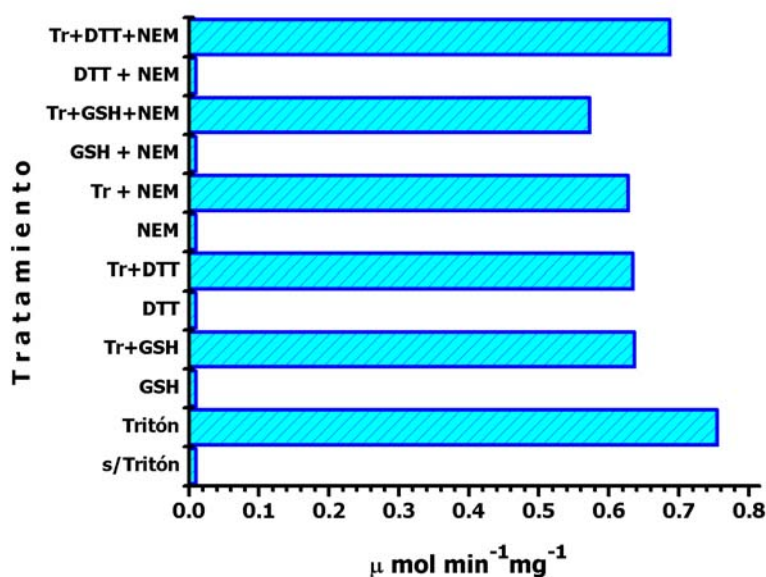


Figura 22. Gráfica de las actividades específicas para GST, usando a la frGSTM7s con los diferentes reactivos empleados en la técnica de activación de MGSTs (Morgenstern, et al 1982).

Adicionalmente, se realizaron otra serie de experimentos con la finalidad de observar si existía algún efecto de activación con el NEM e IAA a diferentes concentraciones. Los datos se muestran en las figuras 23 y 24, e indican que no existió ningún efecto dosis-respuesta.

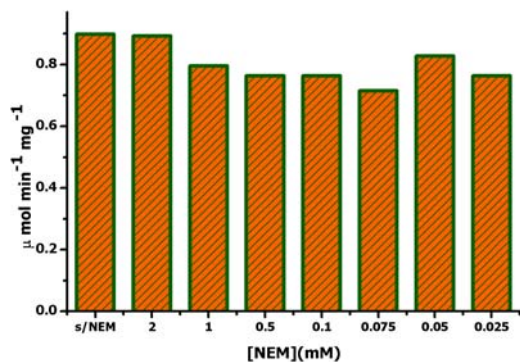


Figura 23. Gráfica de las actividades específicas para GSTs incubando la frGSTM7s con diferentes concentraciones de NEM en presencia de Tritón X - 100

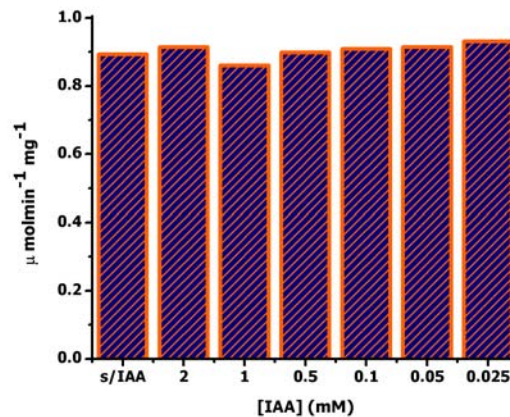


Figura 24. Gráfica de las actividades específicas para GSTs incubando a la frGSTM7s con diferentes concentraciones de IAA en presencia de Tritón X - 100

### Efecto de la concentración del detergente Tritón X-100 en la solubilización de la frGSTM7s

Al observar que la frGSTM7s no presentaba actividad catalítica de GST en ausencia del detergente Tritón X-100, se optó por determinar la concentración óptima de este para solubilizarla. La figura 25 muestra que la mayor actividad de GST para la frGSTM7s fue en presencia de Tritón x - 100 al 0.05%. En la tabla XI se dan los valores cuantitativos de estas cinéticas mediante las actividades específicas obtenidas y el porcentaje de actividad, considerando al 100% de actividad a la concentración de Tritón X - 100 que dio mayor actividad para GST. De esta forma 0.05% de Tritón X-100 se empleó en todos los ensayos cinéticos.

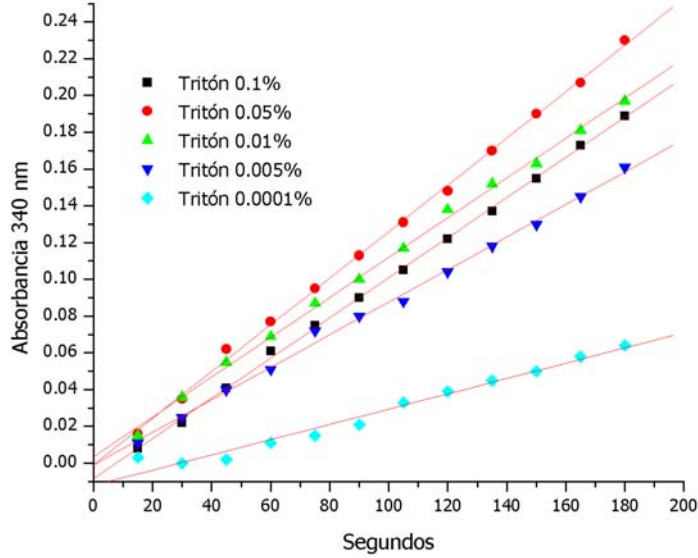


Figura 25. Gráfica de las velocidades de reacción para GST desarrolladas por la frGSTM7s en presencia de diferentes concentraciones de Tritón x-100

Tabla XI. Actividades específicas para GST y su porcentaje desarrollado por la frGSTM7s en presencia de diferentes concentraciones de Tritón X-100

% de Concentración de Tritón X -100	$\mu \text{ mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	% de actividad catalítica
0.1	0.6	85.8
0.05	0.7	100
0.01	0.59	85
0.005	0.49	69.7
0.001	0.23	32.7

### Determinación de la estabilidad de la frGSTM7s en función del pH

En la figura 26 se observa la estabilidad de la frGSTM7s por el efecto del pH a la que estuvo sometida durante 14 horas. La figura indica que la fracción microsomal del parásito fue estable en el intervalo de pH 6-7, en este rango la frGSTM7s logra

conservar sus grupos ionizables en una forma apropiada para mantener la conformación activa.

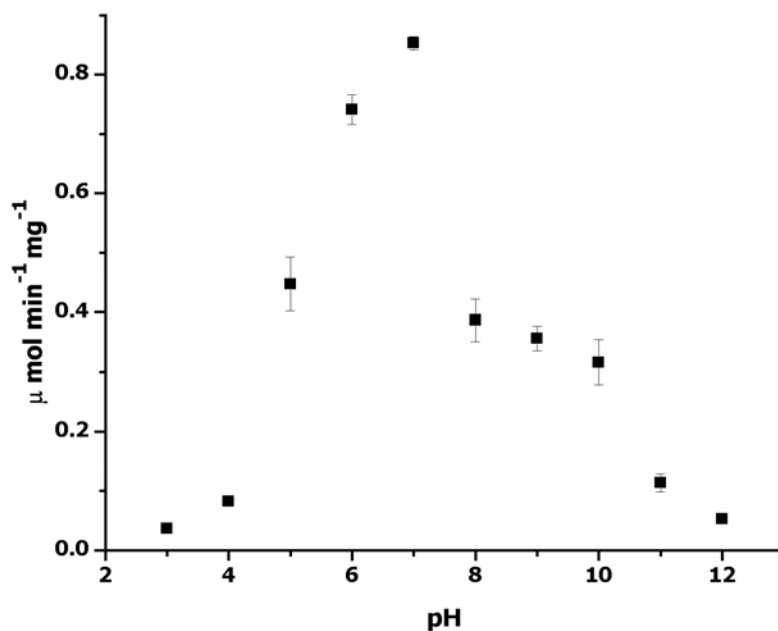


Figura 26. Gráfica que muestra el valor de el rango de pH = 6-7 donde la frGSTM7s fue más estable. La figura y los datos se obtuvieron mediante el programa Origin Pro 7 para determinar el pH óptimo de estabilidad.

### **Determinación del pH óptimo de reacción para la cinética de GST con la frGSTM7s**

La figura 27 presenta el comportamiento de la actividad enzimática de frGSTM7s en función del pH. El pH óptimo de la reacción catalítica fue de pH 8.0 y decrece rápidamente en ambos lados del máximo.



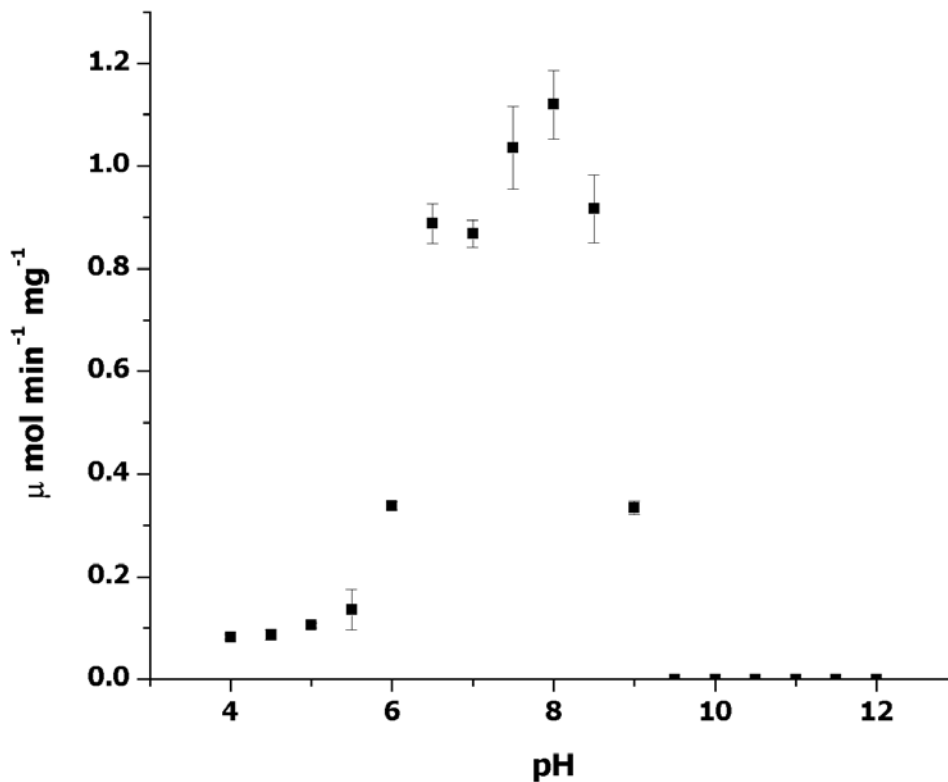


Figura 27. Gráfica que muestra el valor de pH 8.0 como el óptimo de la reacción catalítica para la frGSTM7s. La figura y los datos se obtuvieron, procesando las velocidades de reacción a diferentes pH, con el programa Origin Pro 7.

### Efecto de la temperatura sobre la frGSTM7s

La gráfica 28 muestra la actividad enzimática de la frGSTM7s en función de la temperatura. La máxima actividad se desarrolló a 30 °C y la enzima permaneció estable entre 10 a 50 °C. Sin embargo, a partir de los 55 °C empieza a perder su actividad catalítica hasta inactivarse totalmente a los 70 °C.

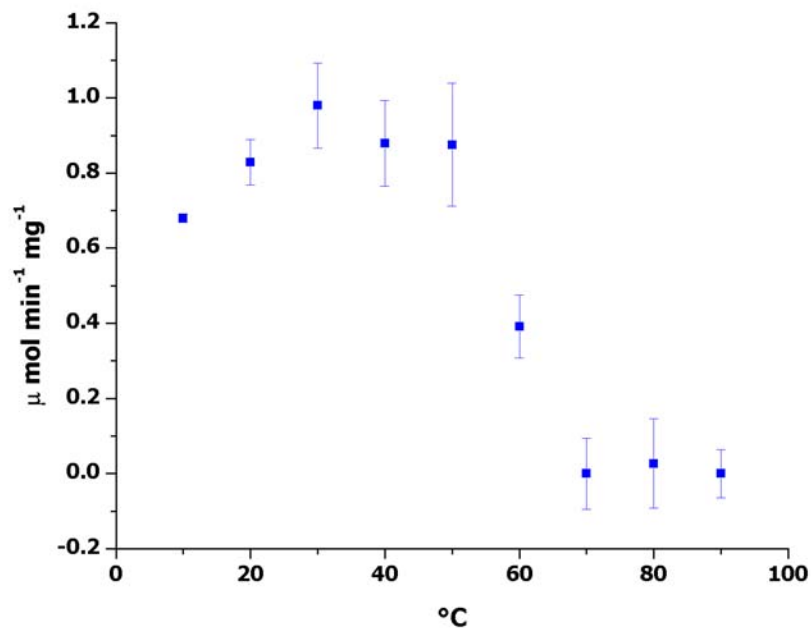


Figura 28. Gráfica que muestra que a 30 °C, es la temperatura óptima para que la frGSTM7s desarrolle su máxima actividad catalítica. La figura y los datos se obtuvieron, procesando las velocidades de reacción a diferentes temperaturas, con el programa Origin Pro 7.

### Determinación de las constantes catalíticas

Con la finalidad de apoyar los datos hasta aquí presentados sobre el carácter enzimático de la frGSTM7s, se decidió determinar sus constantes de velocidad máxima aparente ( $appV_{max}$ ) y de Michaelis aparente ( $appK_m$ ).

La figura 29 presenta los resultados de la evaluación del cambio de absorbancia en función del tiempo de las reacciones enzimáticas de la frGSTM7s, utilizando diversas concentraciones de GSH y una concentración estable de CDNB (1 mM). La pendiente de las rectas se fué incrementando conforme se aumentó la concentración del GSH, hasta no presentar cambios a concentraciones elevadas del GSH. De manera similar, la figura 32 presenta los resultados de las reacciones de la frGSTM7s con diversas concentraciones de CDNB y la del GSH a saturación (3mM). En ambas gráficas se observa un comportamiento semejante. Todos los cambios de absorbancia a 340 nm, registrados para cada experimento durante tres

minutos, se graficaron en el programa Origin Pro7 y se obtuvieron las pendientes de cada reacción, con las cuales se determinaron las velocidades iniciales ( $V_0$ ) y finalmente la actividad específica, en unidades de micromol por minuto por miligramo ( $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ).

Al analizar los datos de las figuras 29 y 32 de la  $V_0$  frente a la concentración de sustrato, se obtuvieron las figuras 30 y 33 para el GSH y el CDNB, respectivamente. Ambas gráficas mostraron una hipérbola rectangular características de enzimas que se ajustan a la cinética de Michaelis – Menten (MM). Para evaluar las constantes cinéticas se construyeron gráficas de Lineweaver – Burk (LB) con los datos de las figuras 29 y 32. La figura 31 muestra la doble recíproca para la frGSTM7s 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  $\text{app}V_{\text{max}} = 0.952 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , mientras que el intercepto de la misma línea en el eje de las abscisas permite calcular un valor de  $\text{app}K_m = 0.167 \text{ mM}$ . La figura 34 corresponde a la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en función de las concentraciones empleadas con CDNB. De esta forma se aprecia la  $\text{app}V_{\text{max}} = 3.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  y la  $\text{app}K_m = 1.2 \text{ mM}$ .

Estos parámetros nos indican que la frGSTM7s tiene una alta afinidad para el GSH, ya que su  $\text{app}K_m$  es relativamente bajo, en el orden de micromolas; además la concentración de saturación del sitio activo para el GSH es a partir de  $0.5 \text{ mM}$ . Y aproximadamente de  $1.2 \text{ mM}$  para el CDNB.

En la tabla XII se muestran algunos parámetros obtenidos de GSTs microsomales de mamíferos con la finalidad de comparar los obtenidos en el presente trabajo

Tabla XII. Valores de Km y Vmax para isoformas DE GSTs microsomales

Isoforma	Km <sub>CDNB</sub>	Km <sub>GSH</sub>	Vmax <sub>CDNB</sub>
MGST hígado de rata Valores aparentes	6 μM inactivada	0.6 mM inactivada	80 nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
	30 μM activada IAA	2 mM activada	80 nmo lmin <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
MGST1 hígado de rata	0.01 mM inactivada	0.8 mM inactivada	-
	0.8 mM activada	1.9 mM activada	-
frGSTMTs	1.2 mM	0.167 mM	3.4 μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>

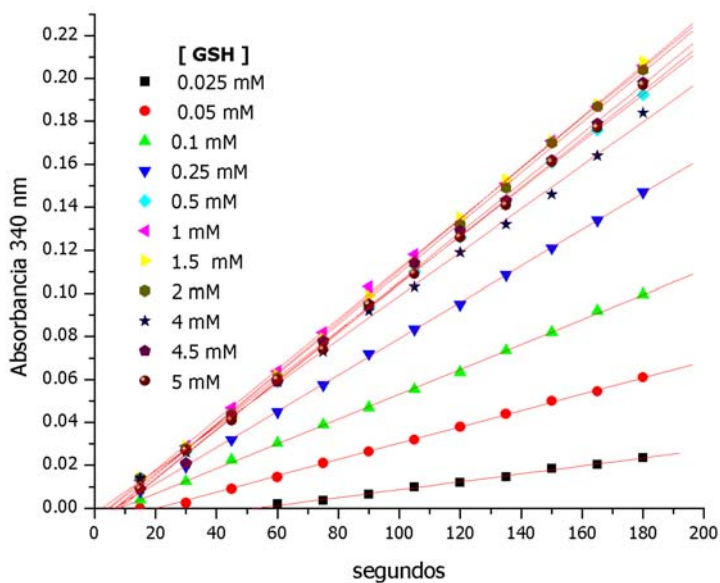


Figura 29. Gráfica de la absorbancia en función del tiempo correspondiente a ensayos catalíticos para GST con una concentración fija de frGSTMTs (200 μg) y de CDNB (1 mM), variando la concentración de GSH (0.025 mM a 5 mM).

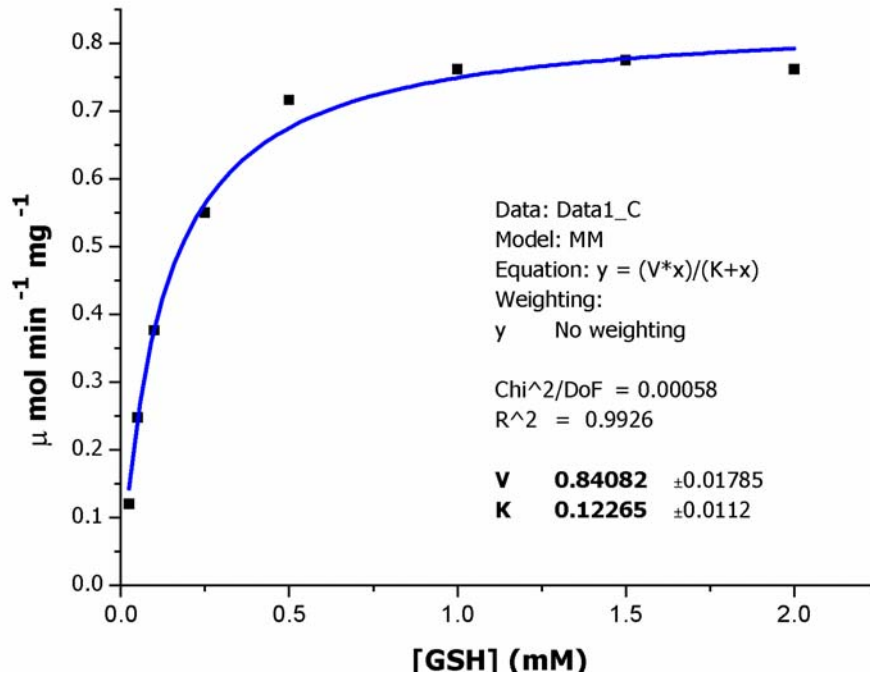


Figura 30. Gráfica de Michaelis – Menten, para obtener los parámetros cinéticos aparentes de Vmax y Km para el GSH con la frGSTM 7s.

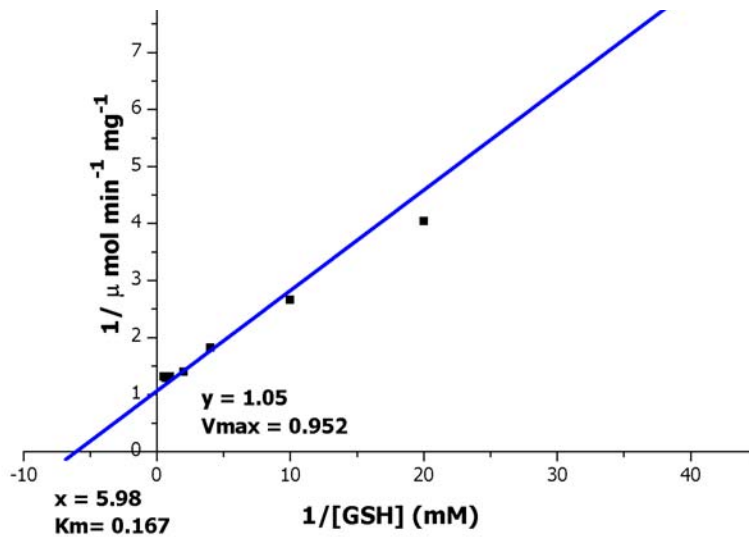


Figura 31. Gráfica de Lineweaver – Burk, dobles inversas, para obtener los parámetros cinéticos aparentes de Vmax y Km para el GSH con la frGSTM 7s.

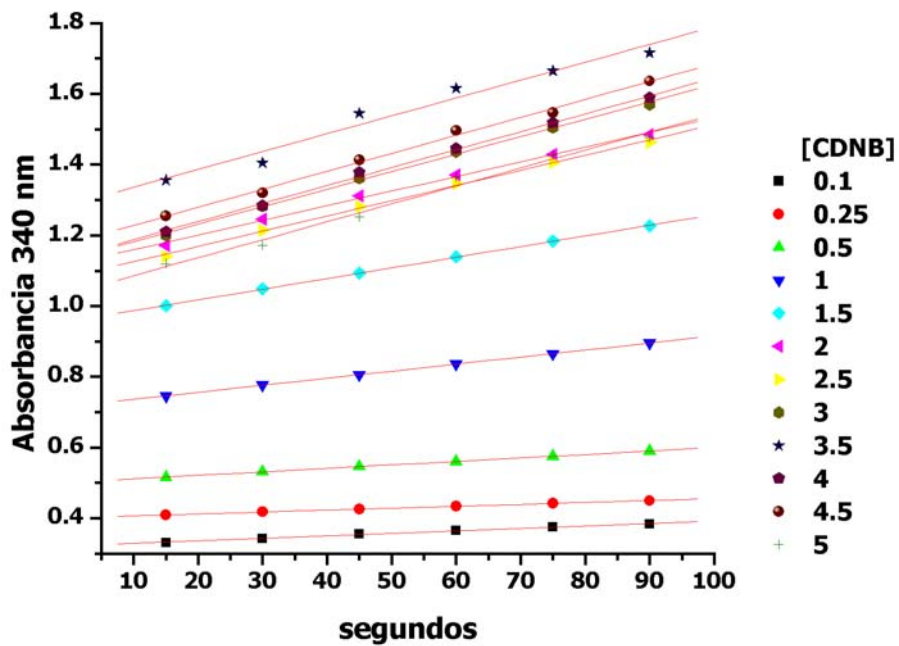


Figura 32. Gráfica del cambio de absorción en función del tiempo correspondiente a ensayos catalíticos para GST con una concentración fija de frGSTM7s (200  $\mu\text{g}$ ), y de GSH (3 mM), variando la concentración de CDNB (0.1 mM a 5 mM).

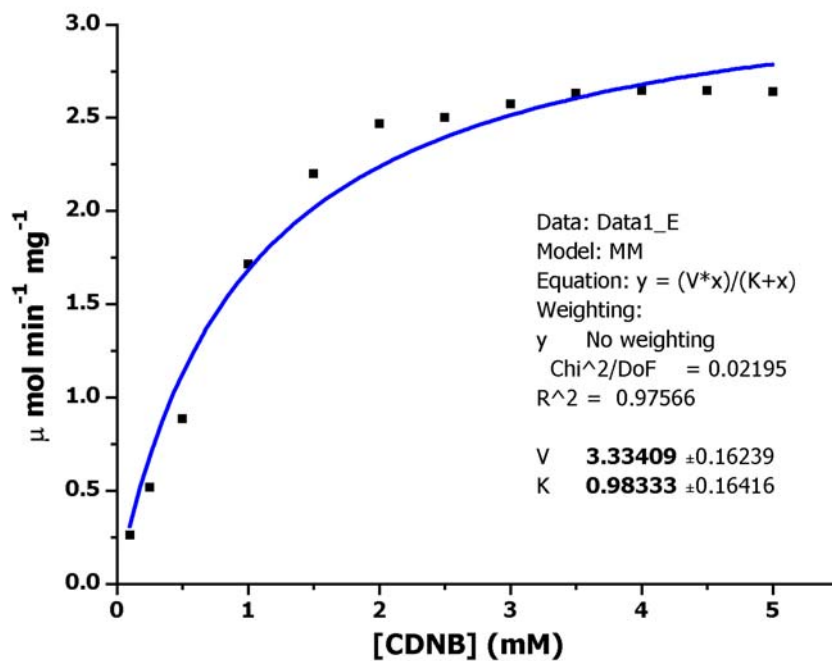


Figura 33. Gráfica de Michaelis – Menten, para obtener los parámetros cinéticos aparentes de  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  para el CDNB con la frGSTM7s.

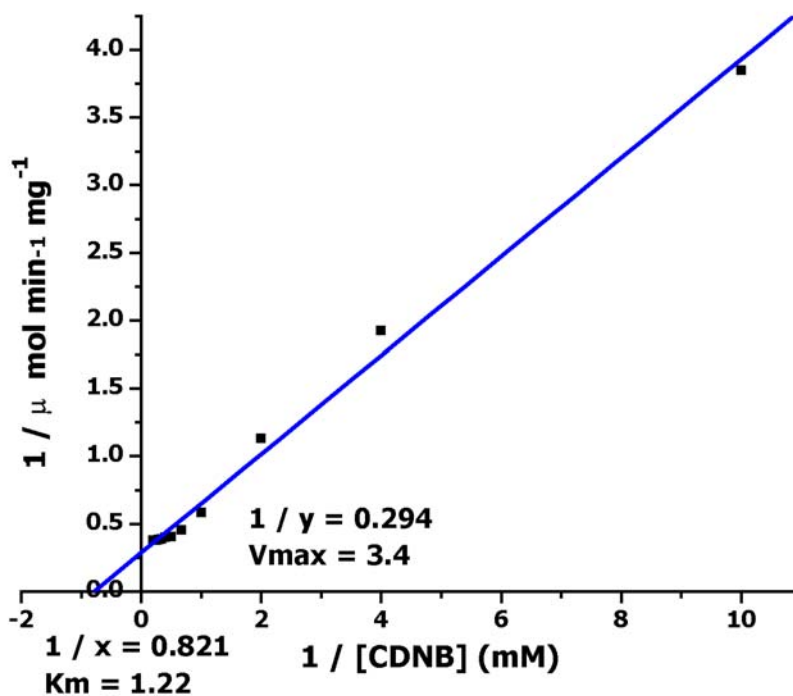


Figura 34. Gráfica de Lineweaver – Burk, dobles inversas, para obtener los parámetros cinéticos aparentes de  $V_{max}$  y  $K_m$  para el CDNB con la frGSTM7s.

## Estudios de inhibición

La figura 35 muestra las gráficas de las velocidades de reacción de la frGSTM7s en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores Azul de Cibacrón (AC), Bromosulfaleína (BTS), Rosa de Bengala (RB) y Cloruro de Trifeniltin (CT) (descritas en la misma gráfica). Se observa que a mayor concentración del inhibidor la velocidad de reacción disminuye, como se refleja en el descenso de las pendientes.

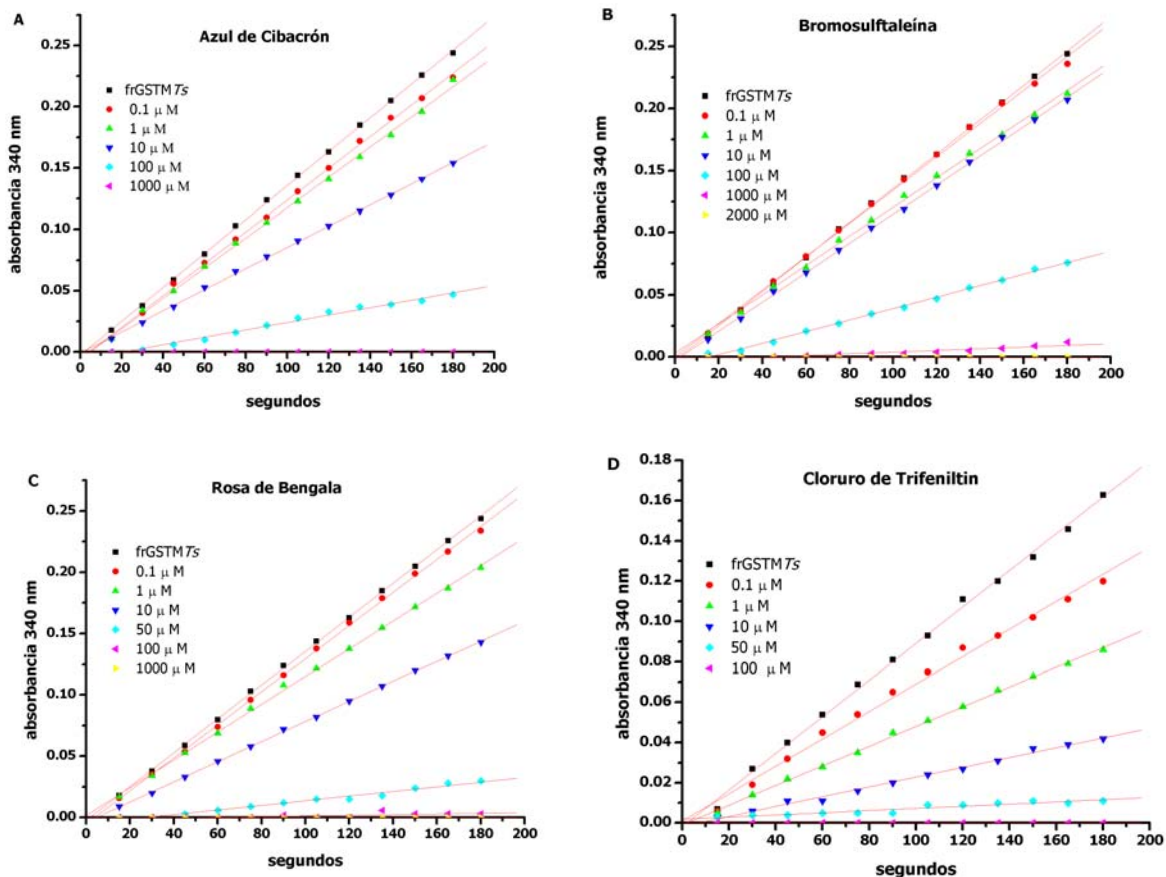


Figura 35. Cambio de absorbancia a 340 nm en función del tiempo de la frGSTM7s frente a diferentes concentraciones de los inhibidores: A) Azul de Cibacrón, B) Bromosulfaleína, C) Rosa de Bengala, D) Cloruro de Trifeniltin.

Los datos de las velocidades de reacción en presencia de cada uno de los inhibidores (figura 35) se emplearon para determinar la concentración a la que cada inhibidor inhibe en un 50 % ( $I_{50}$ ). La figura 36 muestra las gráficas del porcentaje de la actividad residual (% de actividad) de la frGSTM7s frente a las concentraciones de A) azul de cibacrón y B) rosa de bengala, de igual forma la figura 37 indica el porcentaje de actividad residual de los inhibidores A) bromosulfaleína y B) cloruro de trifeniltin. Los valores de las  $I_{50}$  fueron: para el AC 26.5  $\mu$ M, BTS 53.5  $\mu$ M, RB 14.3  $\mu$ M y CT 8.02  $\mu$ M (Tabla XII).



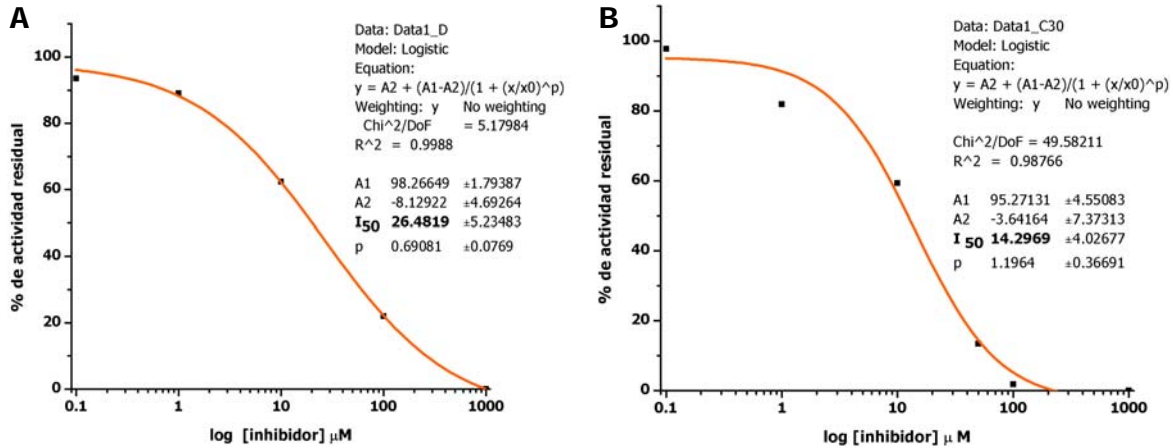


Figura 36. Se observa el porcentaje de inhibición residual provocada por la concentración creciente de los inhibidores azul de cibacrón (A) y rosa de bengala (B) en la frGSTM7s, así como la I<sub>50</sub> obtenida para cada uno de ellos.

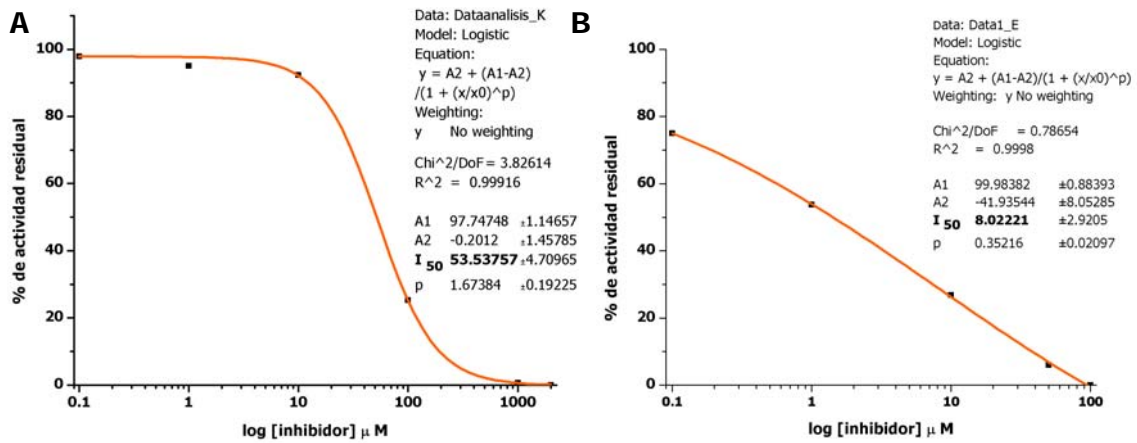


Figura 37. Se observa el porcentaje de inhibición residual provocada por la concentración creciente de los inhibidores bromosulfaleína (A) y cloruro de trifeniltin (B) en la frGSTM7s, así como la I<sub>50</sub> obtenida para cada uno de ellos.

### Tipos de Inhibición y constantes inhibitorias (K)

El tipo y la constante de inhibición (K) para los distintos inhibidores se determinaron utilizando al CDNB como sustrato variable en cada uno de los ensayos de inhibición. En la figura 38 se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk, donde el AC originó el tipo de inhibición acompetitiva, produciendo una

disminución en la  $V_{max}$  de las reacciones y afectando a la  $K_m$ . Al graficar los valores de los interceptos sobre el eje de las ordenadas de la figura 28 frente a las concentraciones del inhibidor, se obtuvo el valor de la  $K_i = 185 \mu\text{M}$  (figura 39) (Tabla XII).

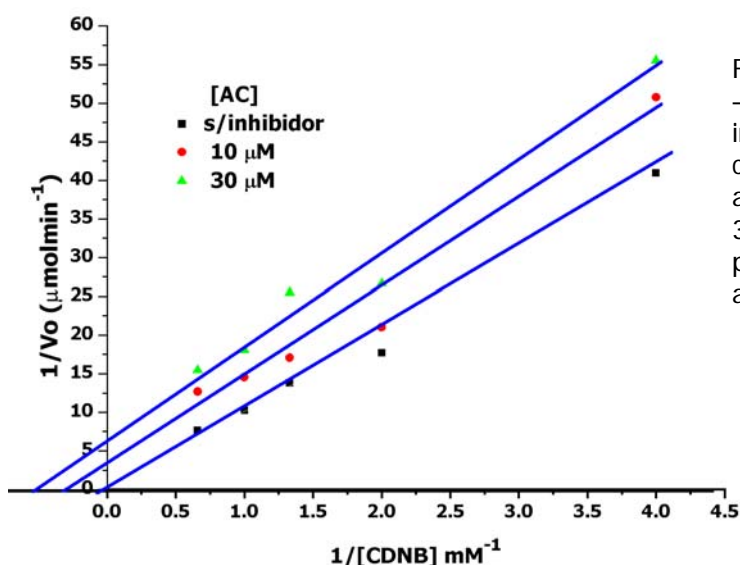
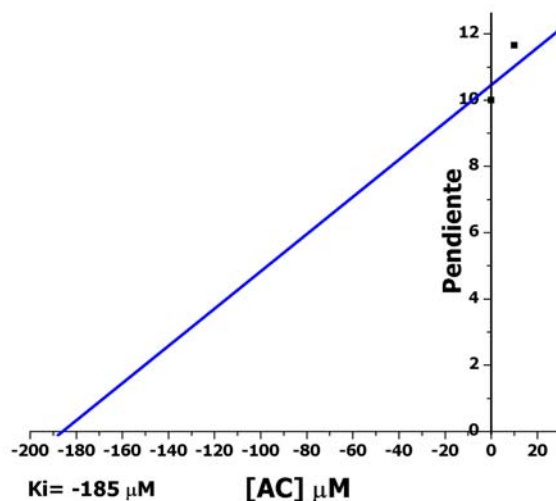


Figura 38. Gráfica de Lineweaver -Burk (inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de CDNB) en ausencia ■ o presencia de 10 ● y 30 ▲  $\mu\text{M}$  del AC. La gráfica presenta una inhibición de tipo acompetitivo.

Figura 39. Gráfica de los valores interceptos en el eje  $1/v$  de la figura 28 frente a la concentración del AC, indicando una  $K_i = 185 \mu\text{M}$ .



En la figura 40 se muestra la gráfica de Lineweaver-Burk correspondiente al Rosa de Bengala. El tipo de inhibición fue acompetitiva, produciendo una disminución en la  $V_{max}$  y afectando la  $K_m$ . Los valores de los interceptos sobre el eje de las ordenadas frente a las concentraciones del inhibidor, determinaron el valor de  $K_i = 66 \mu\text{M}$  (figura 36).

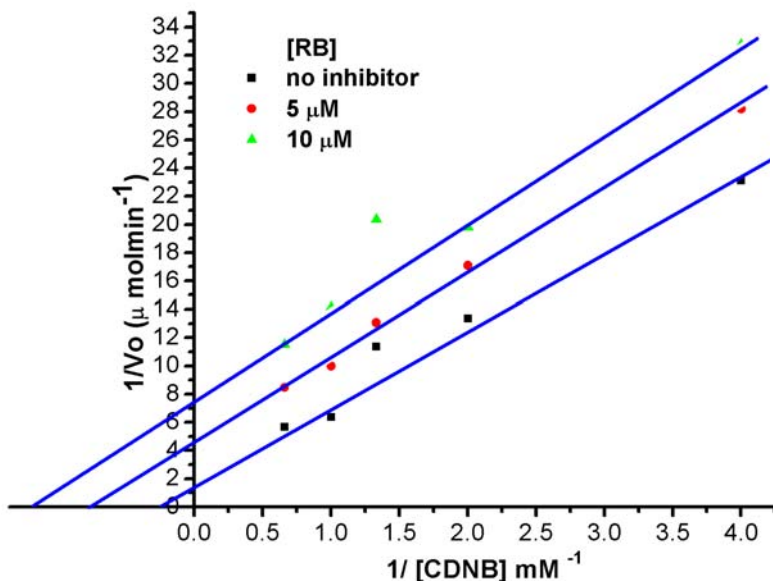
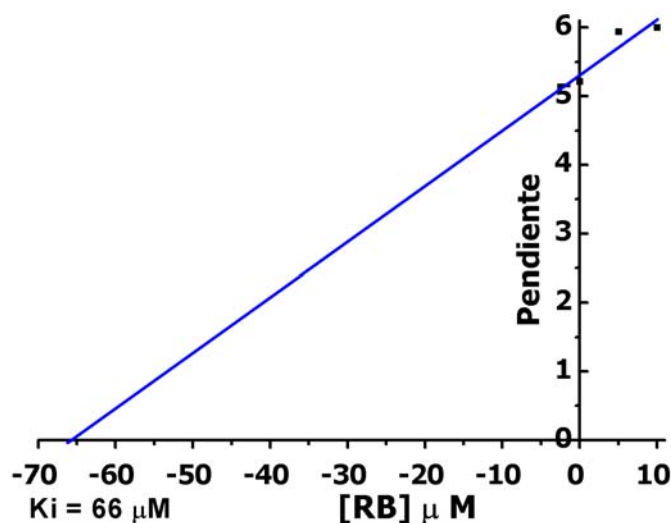


Figura 40. Gráfica de Lineweaver –Burk (inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de CDNB) en ausencia ■ y presencia del RB 5● y 10▲  $\mu\text{M}$ . La gráfica presenta una inhibición de tipo acompetitivo

Figura 41. Gráfica de los valores de los interceptos frente a la concentración del RB, obtenidas de la figura 30, indicando una  $K_i = 66 \mu\text{M}$ .



El cloruro de Trifeniltin (CT) inhibió a la frGSTMTs de manera no competitiva, (figura 42). La  $V_{max}$  disminuye pero la  $K_m$  no se afecta, comportamiento característico de este tipo de inhibición. El valor de la  $K_i$  del CT fue de 5.5  $\mu\text{M}$  (figura 43).

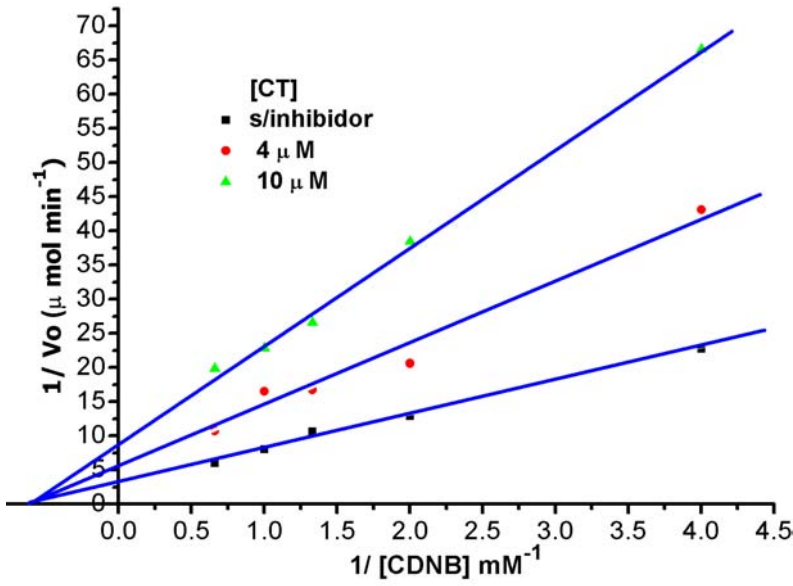
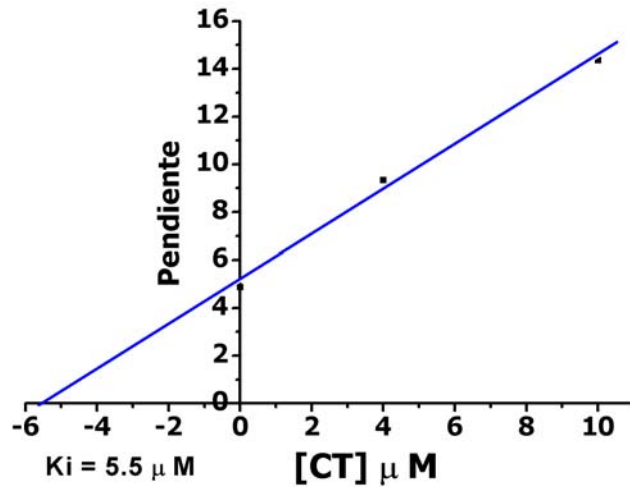


Figura 42. Gráfica de Lineweaver-Burk (inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de CDNB) en ausencia ■ y presencia de 4 ● y 10 ▲  $\mu\text{M}$  de TPT. La gráfica presenta una inhibición de tipo no competitivo

Figura 43. Gráfica de los valores de los interceptos frente a la concentración del CT, obtenidas de la gráfica 32, indicando una  $K_i = 5.5 \mu\text{M}$ .



La BTS presentó un tipo de inhibición no competitivo, (figura 44), en donde la  $V_{max}$  disminuye mientras la  $K_m$  no se modifica. Su valor de la  $K_i = 41.04 \mu\text{M}$  (figura 45).

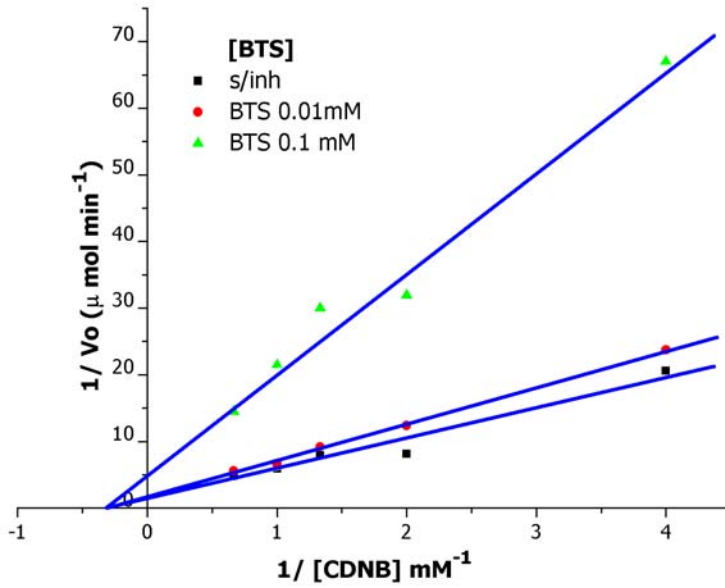


Figura 44. Gráfica de Lineweaver –Burk (inverso de la velocidad inicial frente al inverso de concentración de CDNB) en ausencia ■ y presencia de inhibidor 0.01 ● y 100mM ▲. La gráfica presenta un tipo de inhibición no competitiva.

Figura 45. Grafica de los valores de los interceptos frente a la concentración del BTS, obtenidas de la gráfica 34, indicando una  $K_i = 41.04 \mu\text{M}$

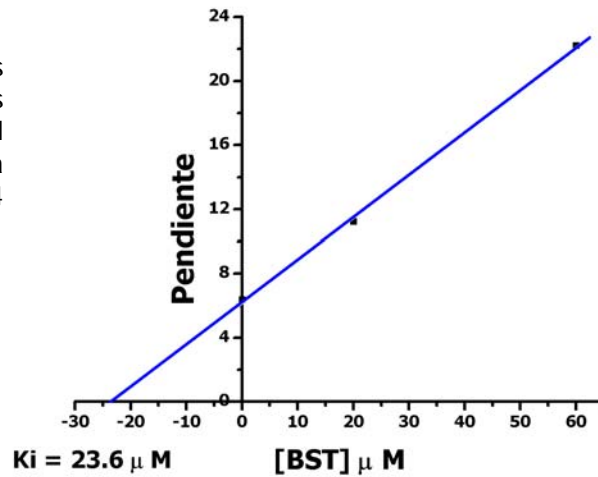


Tabla XIII. Resumen del efecto de los inhibidores AC, RB, BTS y CT sobre la frGSTM7s

Inhibidor	Inhibición al 100% (mM)	I <sub>50</sub> (mM)	K <sub>i</sub> (mM)	Tipo de inhibición
Azul de Cibacrón	1	26.5	185	Acompetitivo
Rosa de Bengala	1	14.3	66	Acompetitivo
Cloruro de Trifeniltín	0.1	8.02	5.5	No competitivo
Bromosulfaleína	1	53.5	41	No competitivo

### Otros sustratos electrofílicos y el *N*- acetil - L - cisteína

Los estudios realizados con los sustratos electrofílicos, 1,2 - dicloro - 4-nitrobenceno, *p* - nitrobencil clorido, 1,2-epoxy-3 (p-nitrofenoxi) propano, bromosulfaleína, trans-4- fenil - 3- butano - 2 - one, ácido etacrínico y el NAC, no mostraron actividad catalítica con la fracción frGSTM7s.

## 7. Discusión

Las glutatión *S*-transferasas (GST) (EC 2.5.1.18) son enzimas que catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutatión sobre los grupos electrofílicos de sus sustratos secundarios. Estas enzimas existen en forma abundante en muchos seres vivos y participan principalmente en los procesos de detoxificación de compuestos mutágenicos, carcinógenos y muchas sustancias químicas nocivas. Las GSTs se presentan en el citoplasma como enzimas solubles, mitocondriales asociadas a sus membranas y en el retículo endoplasmico como proteínas integrales (86). En *T. solium* se han demostrado varias GSTs citosólicas, sin embargo en los cisticercos de este parásito, además de encontrar al retículo endoplásmico ampliamente distribuido en sus células, como sucede normalmente en los eucariontes, también se observa distribuido en diversas partes de su sincicio. Probablemente en el retículo endoplásmico de *T. solium* se lleven a cabo múltiples reacciones metabólicas generadoras de compuestos tóxicos, así como recibir otros tantos provenientes de manera extracelular, los cuales podrían afectar

a diversos sitios subcelulares. De ser así la presencia de una enzima microsomal con actividad de GST en *T. solium* sería útil para detoxificar esta estructura subcelular (87, 88).

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian por primera vez, la presencia de una actividad catalítica de GST en los microsomas de los cisticercos de *T. solium*. Al no existir estudios sobre enzimas microsomales con actividad de GST en invertebrados, especialmente en parásitos, se decidió extrapolar a *T. solium* la metodología utilizada en el estudio de estas proteínas de mamíferos. Los estudios de ultraestructura (microscopía electrónica de transmisión) y marcadores enzimáticos específicos de las fracciones subcelulares, demostraron la pureza de la fracción microsomal frGSTM7s obtenida por centrifugación diferencial.

El primer concepto, desde el punto de vista enzimológico, que se analizó en la frGSTM7s fue el de demostrar la relación entre su actividad de GST y su incremento proporcional en función a la masa de la enzima. Mediante ensayos cinéticos donde se aumentó la concentración de la frGSTM7s y se mantuvieron constantes las concentraciones de los sustratos, el comportamiento de la frGSTM7s fue el esperado para una enzima, el aumento del doble o triple de su concentración, aumentó proporcionalmente su velocidad inicial ( $V_0$ ).

Un siguiente concepto de estudio sobre la frGSTM7s fue el de certificar que se trataba de una enzima integral del retículo endoplásmico. Las proteínas integrales no son extraídas de sus membranas por repetidos lavados o procedimientos que emplean altas concentraciones de sales, o con reactivos que liberan proteínas unidas a las membranas de forma superficial. La actividad enzimática de frGSTM7s fue similar entre las alícuotas no procesadas y procesadas bajo las condiciones antes mencionadas. Tampoco se encontró actividad catalítica en los sobrenadantes de todas las alícuotas anteriormente descritas, de haberse encontrado sería por una GST soluble. Adicionalmente, la frGSTM7s no pudo ser extraída de las membranas por sonicación, proceso que libera proteínas atrapadas en las vesículas microsomales. Así, estas evidencias sugieren que la frGSTM7s está integrada a los microsomas.

También se sabe que todas las GST microsomales reportadas hasta el momento, deben de estar solubilizadas, al menos con 0.05 % de Triton X-100, para efectuar su actividad catalítica. Cuando se elimina el detergente de estas enzimas se inactivan. En nuestra experiencia, la frGSTM7s se comportó como una GST microsomal al requerir del Triton X-100 para conjugar glutatión con CDNB.

La frGSTM7s no fue activada con agentes sulfidrílicos. Por un tiempo, esta capacidad de las GSTs microsomales de mamíferos de elevar su actividad catalítica de 10-12 veces, se consideró como una de sus propiedades específicas (51, 52, 86). Pero el hecho de que las GSTs microsomales tanto en *Xenopus laevis* (90) como en la cianobacteria *Synechocystis sp* (91), no se activan con agentes sulfidrílicos, hizo reconsiderar esta propiedad (56), probablemente esta capacidad se realice solo en las enzimas GST microsomales de mamíferos.

El principal resultado de este trabajo fue demostrar que en los microsomas de los cisticercos de *T. solium* existe una enzima que puede conjugar glutatión con el compuesto electrofílico CDNB. La determinación contundente de las constantes catalíticas  $appV_{max}$  y  $appK_m$  desarrollada por la frGSTM7s para el glutatión y el CDNB sugieren que estos datos no son resultados aleatorios. Además, estas constantes catalíticas están dentro del rango de valores obtenidos por diversas GSTs. Por ejemplo, para la MGST1 de hígado de rata, la enzima inactivada presenta una  $K_m$  de 0.8 mM para el GSH y una  $K_m$  de 0.01 mM para el CDNB y para la forma activada con los sulfidrílicos sus  $K_m$ s incrementan a 1.9 mM y 0.8 mM, respectivamente (92), también se han reportado  $appK_m$ s de MGST1 activada con sulfidrílicos, siendo para el GSH de 2 mM y para el CNDB de 30  $\mu$ M (93).

Estos valores cinéticos son comúnmente empleados para distinguir isoformas enzimáticas. Así, la frGSTM7s tiene valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  muy diferentes a los encontrados en GST solubles del mismo parásito (72, 73). La frGSTM7s presentó una mayor afinidad para el GSH pero menor para el CDNB y los conjuga mas lentamente que la GST<sub>26.5</sub> soluble de *T. solium*. Probablemente, estas diferencias cinéticas estén relacionadas con el micro ambiente, se sabe que la concentración



“efectiva” de un sustrato en el volumen del sitio activo es mucho más grande que la concentración en la solución final desde la cual el sustrato fue absorbido.

Si una propiedad intrínseca de las enzimas son sus constantes catalíticas, otra igualmente importante es el poder cuantitativamente modificarlas. Así que cualquier sustancia que disminuya la velocidad de reacción catalítica es un inhibidor enzimático y su efecto repercutirá directamente en los valores de las constantes catalíticas de la enzima. La frGSTM7s fue inhibida por cuatro inhibidores clásicos para las GSTs. La capacidad inhibitoria dependió de la sustancia inhibidora. Esta información abre un campo de estudio para la frGSTM7s relacionado sobre sus mecanismos reguladores, especificidad por sustratos, estructura de sus sitios activos y mecanismos cinéticos de reacción.

Los estudios de inhibición realizados sobre la frGSTM7s, fueron más detallados al lograr distinguir el tipo de inhibición que ejercieron sobre la enzima parasitaria los diferentes inhibidores. De esta manera, la claridad con que se obtuvieron las gráficas de Lineweaver - Burk, que definieron tres tipos diferentes de inhibición, sustenta la observación que solamente con una enzima se pudieron obtener.

*Taenia solium* es un parásito que puede permanecer en sus huéspedes en forma crónica. Para que pueda evitar las acciones efectoras del sistema inmunológico es probable que desarrolle mecanismos de evasión inmune. Entre las potenciales estrategias para evitar su destrucción, se ha postulado el empleo de enzimas detoxificantes, como se ha observado en otros parásitos. Al menos en *T. solium* se ha demostrado la presencia de una superóxido dismutasa (SOD) (64), una peroxiredoxina (69, 70), y dos diferentes glutatión *S*-transferasas solubles (71, 72, 73). Estas enzimas podrían contribuir a disminuir los efectos de los radicales libres de oxígeno originados por las células inflamatorias, principalmente en el citoplasma. Sin embargo, estas enzimas solubles tendrían poco efecto en los microsomas por su difícil acceso a ese sitio. En los microsomas se realizan diversas reacciones bioquímicas que generan diversos radicales libres de oxígeno. Adicionalmente, aquellos radicales libres generados fuera de la célula pueden atacar la cara externa de las membranas citoplásmicas provocando su peroxidación

lipídica (94), radicales secundarios derivados de estos sitios podrían ingresar al interior celular, causando la peroxidación lipídica de las membranas internas y originando factores clastogénicos (95, 96). Muchos de estos factores son lipofílicos y por lo tanto pueden unirse con facilidad a los microsomas.

Otro aspecto interesante de las MAPEG es su papel en el metabolismo de los icosanoides, moléculas derivadas del ácido araquidónico. Varios de sus miembros están involucrados en la biosíntesis de leucotrienos (LT) y prostaglandinas (PG). Los eicosanoides regulan muchos procesos fisiológicos, tales como el señalamiento célula– célula y el mantenimiento de la homeostasis tisular, además de modular la respuesta inflamatoria e inmunológica en mamíferos (97). La incapacidad del hospedero para desarrollar una respuesta inmune efectiva durante una infección es un sello característico de los parásitos. Por ejemplo, durante el ingreso de *S. mansoni* por piel en ratones, la prostaglandina (PG)<sub>D</sub><sub>2</sub> producida por el parásito impide la migración de las células de Langerhans del hospedero hacia los nódulos linfáticos (60). La biosíntesis de icosanoides en céstodos ha sido pobremente explorada. Algunos ejemplos son los componentes prostanoides, PGE<sub>2</sub>, prostaciclina, PGI<sub>2</sub>, generados y liberados por el estado larvario de *T. taeniaformis* (98). El papel de los icosanoides en las interacciones hospedero – parásito no ha sido completamente descrita. La hipótesis predominante es que los icosanoides derivados de parásitos evaden la respuesta del hospedero, posiblemente éstas moléculas estén directamente involucradas en la patogénesis y/o estados pato fisiológicos en enfermedades parasitarias, regulando procesos fisiológicos en el tejido del hospedero que permita al parásito diseminarse y migrar para reproducirse y persistir en el cuerpo (99)

El descubrimiento de esta actividad de GST en las membranas del retículo endoplásmico en los cisticercos de *T. solium*, apoya fuertemente la presencia de una enzima integral con funciones potenciales diferentes a las GSTs solubles, es decir proteger en particular esta fracción subcelular parasitaria y/o participar en la biosíntesis de icosanoides. Es probable que estas funciones protectoras y

reguladoras del sistema inmune contribuyan al establecimiento y persistencia de *T. solium* en sus huéspedes.

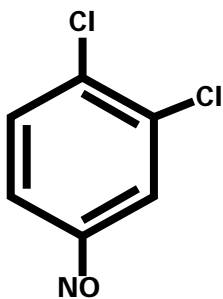
## 8. Glosario de Abreviaturas

AC	Azul de Cibacrón
Act Esp	Actividad específica
Act Total	Actividad total
ATP	Trifosfato de adenosina
BTS	Bromosulfaleína
C5b-9	Complejo proteico del complemento
CAT	Catalasa
cDNAs	Librería de DNA
CDNB	1 – cloro – 2,4 – dinitrobenceno
CM-Sefarosa	Resina de intercambio iónica de sefarosa carboxil – metil
CT	Cloruro de trifeniltin
CuOOH	Hidroperóxido de cumeno
DCPIP	2, 6 diclorofenolindofenol
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. granulosus</i>	<i>Equinococcus granulosus</i>
<i>E. multilocularis</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>
EDTA	Etilanadamina ácido tetra-acético
EI	Complejo enzima – inhibidor
ER	Estallido Respiratorio
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ES	Complejo enzima – sustrato
ESI	Complejo enzima – sustrato – inhibidor
et al	y colaborados
Fe++	Ion de hierro
FLAP	Proteína activadora 5 – lipoxigenasa
frGSTMTs	Glutación S – transferasa microsomal de <i>Taenia solium</i>
GPx	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación reducido

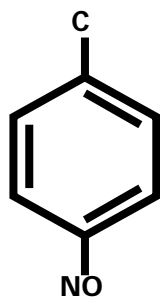
GST	Glutación S – Transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico
http	Resina de hidroxiapatita Tipo I
I <sub>50</sub>	Inhibición al 50 % de actividad enzimática
IAA	Iodoacetamida
K	Potasio
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potasio
KCl	Cloruro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
kDa	Kilodaltons
Ki	Constante de inhibición
Km	Constante de Michaelis – Menten
LB	Lineweaver – Burk
LTC	Leucotrieno
m	Pendiente
MAPEG	Proteínas de membranas asociadas al metabolismo de eicosanoides y glutación
Mg	Magnesio
MGST	Glutación S- transferasa microsomal
MGST1-L-1	MGST1 semejante a la isoforma 1
MM	Michaelis – Menten
NaCl	Cloruro de sodio
NADPH	Nicotiamida Adenina Dinucleótido fosfato
NC	Neurocisticercosis
NEM	N- etilmaleimida
O <sub>2</sub>	Oxígeno
OH <sup>-</sup>	Oxidrilo
P	Producto
PBE	Cromatoenfoque de polibuffer intercambiador
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (phosphates buffer saline)
PG	Prostaglandina
pI	Punto isoelectrico
Pp	Precipitado
PRX	Peroxiredoxina
QAE	Resina de intercambio iónico de etil – amino – cuaternaria

RB	Rosa de bengala
RLO	Radicales libres de oxígeno
<i>S.mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SDS	Sodio dodecil sulfato
Sefarosa Q	Matriz de intercambio iónico, grupo activo $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
SGST26.5	Glutación S – transferasa soluble de 26.5 kDa
Sn	Sobrenadante
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
<i>Ssp</i>	Especie
T. brucei	Tripanosoma brucei
<i>T.saginata</i>	<i>Taenia saginata</i>
TGRTc	Tioredoxina Glutación reductasa de <i>Taenia crassiceps</i>
Th	Células T no protectoras
Tr	Tritón X – 100
Tris	(hidroximetil) aminometano
Ts2CysPrx	2 cis peroxiredoxina de <i>Taenia solium</i>
TsSOD	Superóxido dismutasa de <i>Taenia solium</i>
U	Unidades de actividad enzimática
Vmax	Velocidad máxima
Vo	Velocidad inicial
Vol Total	Volumen total
VSG	Genes de superficie variable
Zn	Zinc

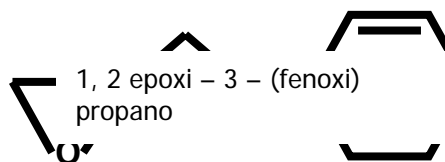
## 9. Apéndice

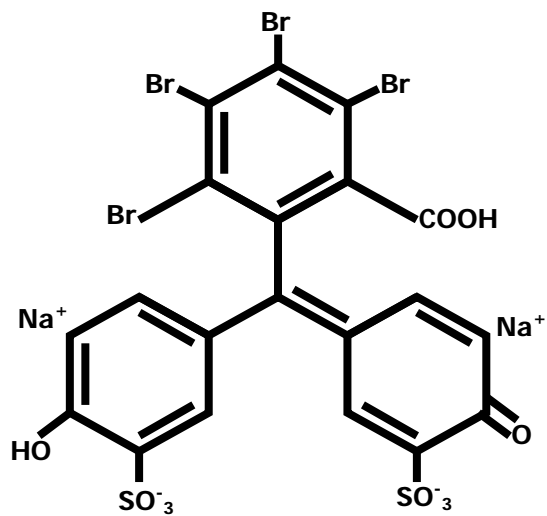


1, 2 dicloro – 4 nitrobenzeno

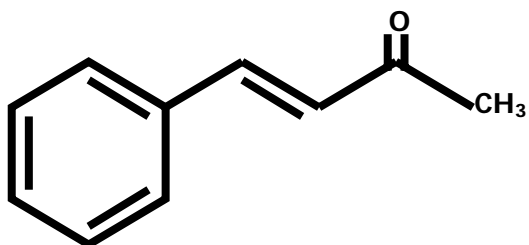


p – nitrobenzil clorido

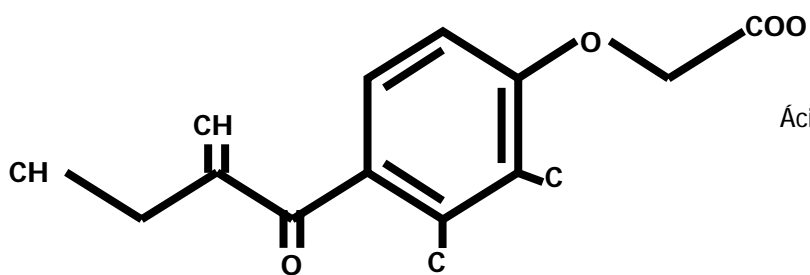




Bromosulfaleína



trans - 4 - fenil - 3 buteno - 2 - one



Ácido etacrínico

# Characterization of *Taenia solium* cysticerci microsomal glutathione *S*-transferase activity

Gabriela Nava · Lilia Robert · Agustín Plancarte

Received: 21 February 2007 / Revised: 20 June 2007 / Accepted: 25 June 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** Glutathione *S*-transferase activity has been shown to be associated with the microsomal fraction of *Taenia solium*. Electron microscopy and subcellular enzyme markers indicate the purity of the microsomal fraction that contains the glutathione *S*-transferase activity. *T. solium* microsomes were solubilized under conditions used to solubilize integral microsomal proteins. This procedure proved necessary to obtain enzymatic activity. To characterize this parasite enzyme activity, several substrates and inhibitors were used. The optimum activity for microsomal glutathione *S*-transferase was found to be pH 6.6, with a specific enzyme activity of 0.9, 0.1, 0.067, 0.03, and 0.05  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  with the substrates 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, 4-hydroxynonenal, 2,4-hexadienal, and *trans*-2-nonenal, respectively. No activity of glutathione peroxidase was observed. *T. solium* microsomes had an  $\text{app}K_m(\text{GSH}) = 0.161 \mu\text{M}$ ,  $\text{app}K_m(\text{CDNB}) = 14.5 \mu\text{M}$ , and  $\text{app}V_{\text{max}}$  of 0.15 and 27.9  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  for GSH and CDNB, respectively. *T. solium* microsomes were inhibited by several glutathione *S*-transferase enzyme inhibitors, and it was possible to establish a simple inhibition system as well as corresponding  $K_i$ 's for each inhibitor. These results indicate that the *T. solium* microsomal glutathione *S*-transferase is different from the parasite cytoplasmic enzymes that catalyze similar reactions.

## Introduction

The pork tapeworm, *Taenia solium*, is a parasite that requires humans and pigs for completion of its cycle. Larvae (cysticerci) in the human central nervous system cause neurocysticercosis (NC). *T. solium* infection is endemic in rural areas of developing countries in Central and South America, Asia, and Africa (Schantz 2002). In the 1990s, it was estimated that a thousand NC cases were diagnosed in the USA each year (Shandera et al. 1994). In NC, the inflammatory reactions found in host capsules surrounding *T. solium* larvae are the cause of clinical symptoms. The capsule contains an inflammatory infiltrate that is compatible with a chronic granulomatous lesion. A large number of degranulated eosinophils and other lysed host cells are found in close proximity of the parasite. This granulomatous lesion may be chronic degenerative and/or result in death (Prabhakar and Singh 2002).

A peculiar aspect of the larvae of this parasite is its capacity to survive in the host tissue for long periods, with no development of clinical symptoms, despite a functional immune system (Dixon and Lipscomb 1961; Fleury et al. 2003). In accordance with the observations of Emerit 1987, Kozumbo et al. (1987), and Weitberg et al. 1983, it was suggested that *T. solium* larvae may remain in the host body in a silent mode because of a cellular defense against lipid peroxidation, involving an inflammatory response with clastogenic consequences.

The polygene family of glutathione *S*-transferase enzymes (GSTs) is mainly associated with the prevention of damage because of cellular lipid peroxidation and is considered one of the major detoxification systems in cestodes (Leid et al. 1987; Brophy and Barret 1990). GSTs catalyze the conjugation of glutathione (GSH) with electrophilic groups that can arise from endogenous and

G. Nava · L. Robert · A. Plancarte (✉)  
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de  
Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
México, DF 04510, México  
e-mail: apc@servidor.unam.mx

exogenous compounds, including epoxide, activated alkene, and hydroperoxy groups. These electrophiles are often cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic (Morgenstern et al. 1988; Josephy et al. 1997).

Recently a 26.5 kDa cytoplasmic GST was identified in *T. solium*. Some substrates were tested with this *T. solium* cytoplasmic enzyme, with lipophilic substrates the least detected or undetected (Plancarte et al. 2004).

A novel family designated MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and GSH metabolism; Morgenstern et al. 1979; Jakobsson et al. 2000) is composed of GSTs that catalyze the conjugation of GSH to electrophilic molecules with hydrophobic properties and thus serve in detoxification. The lipophilic substrates that can be catalyzed by MAPEG would tend to accumulate in the membranes of the cell. Consequently, such substrates may either not be readily available to the cytoplasmic enzymes or they may be unreactive toward them, in which case, activity of a membrane-bound GST may be of particular importance. Some members of this family also catalyze the formation of several eicosanoids, potent compounds of inflammation (Bresell et al. 2005). The eicosanoids are lipid compounds produced by the enzymatic oxygenation of arachidonic acid (AA) and other polyunsaturated fatty acids. Although it is not clear whether AA is produced by helminths, it is well accepted that eicosanoids can be elaborated by the parasites by using host AA (Belley and Chadee 1995; Baset et al. 1995). We have, therefore, investigated the microsomal GST activity in the microsomes of *T. solium* larvae, to establish whether they are integral membrane enzymes.

## Materials and methods

### Chemicals

1-Chloro-2,4-dinitrobenzene, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, 4-hydroxynonenal, 2,4-hexadienal, *trans*-2-nonenal, GSH, bromosulphophthalein (BST), triphenyltin chloride (TPT), Cibacron Blue (CB) F3GA (Color Index 61211), Triton X-100, and 1,4-dithioerythritol, were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). All other chemicals were reagent grade and obtained from common commercial sources.

### Parasites

*T. solium* cysticerci were obtained and processed as previously reported (Gonzalez et al. 2002).

### *T. solium* microsomal fractions (*TsMF*)

Purification of *TsMF* was performed as previously described (Ernster et al. 1962) with some modifications.

Briefly, 50 g of parasites were homogenized in 1:3 w/v 10 mM potassium phosphate (pH 7.0), containing 0.25 M sucrose, 0.3 mM ethylenediamine tetraacetic acid, and 5 mM phenylmethyl-sulfonyl-fluoride, using a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Westbury, NY). The homogenate containing 20 mg/ml was spun 10 min at  $600\times g_{av}$  and then spun a further 15 min at  $10,000\times g_{av}$ . The supernatant thus obtained was spun again for 60 min at  $105,000\times g_{av}$ . The microsomes were then resuspended and washed three times in 0.15 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M sucrose (washing buffer), and centrifuged at  $105,000\times g_{av}$  for 60 min to remove cytoplasmic contamination.

### Electron microscopy

For transmission electron microscopy, samples preparation was as follows. Cysticerci were fixed in 3% (v/v) glutaraldehyde for 2 h and postfixed in 2% (w/v) osmium tetroxide. The fixed preparation was cut and embedded in Epon. Sections were stained in 2% (w/v) uranyl acetate, (pH 4.8) and in lead citrate (Spurr 1969).

### Marker enzymes and their assay methods

Glucose 6-phosphatase activity was assayed by measuring the inorganic phosphate released from glucose 6-phosphate (Swanson 1955). The inorganic phosphate formed was determined as described by Fiske and SubbaRow (1925). Lactate dehydrogenase activity was measured by following the oxidation of NADH in the presence of pyruvate as substrate at 340 nm (Vassault 1983). Succinate dehydrogenase was assayed measuring the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) at 600 nm after the addition of succinate, in the presence of phenazine methosulfate (Arrigoni and Singer 1962).

### Washing, chemical, and mechanical treatments on *TsMF*

To test for the integral protein property for *TsMF*, different aliquots of *TsMF* fraction were treated with different reagents as described in Table 3. For chemical treatment, each *TsMF* aliquot was suspended in 10 mM potassium phosphate (pH 7.0) containing the appropriate agent. The suspensions were stirred gently for 30 min at 4°C and centrifuged for 1 h at  $105,000\times g_{av}$ . The aliquots treated with solutions of high ionic strength were simply washed twice in those solutions, transferred to phosphate buffer, and centrifuged as before. Others aliquots of *TsMF* were sonicated using a Braun-Sonic 300 in 15-s intervals for a total of 3 min. After sonication, the suspension was centrifuged for 1 h at  $105,000\times g_{av}$ . All treated aliquots were assayed for GST activity as described below and compared against untreated *TsMF*.



## Enzyme assay for GST

Microsomal GST activity toward 1-chloro-2, 4- dinitrobenzene and most of the other substrates was assayed following reported procedures (Habig et al. 1974). Assays were routinely performed at 20°C (pH 6.5), in the presence of 0.05% Triton X-100 in the assay buffer. The conjugating of different aldehydes with GSH was as follows: 4-Hydroxynonenal, 2,4-hexadienal, and *trans*-2-nonenal were monitored spectrophotometrically at 224 ( $\epsilon=13.75 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Mosialou et al. 1995), 280 ( $\epsilon=34.2 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), and 225 nm ( $\epsilon=19.2 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), respectively, in a 3-mm pathlength cuvette, including 50  $\mu\text{M}$  4-hydroxynonenal, 0.003  $\mu\text{M}$  2,4-hexadienal, and 0.005  $\mu\text{M}$  *trans*-2-nonenal in the assay buffer but with 0.05% reduced Triton X-100 (this kind of detergent does not produce background at 280 nm). The ability of the *Ts*MF to function as a GSH peroxidase was determined according to Paglia and Valentine 1967. The protein concentration was determined by the Peterson (1977) method.

Inhibition studies ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ , simple inhibition system)

Inhibition studies were performed by the procedure of Tahir and Mannervik 1985. Rose Bengal (RB), CB, BST, and TPT were used as inhibitors. In experiments with CB, variable concentrations of the inhibitor (0.0001–1 mM), were preincubated in the assay buffer with constant concentrations of *Ts*MF (0.16 mg) and GSH (3 mM) in a final volume of 1.0 ml. Identical conditions were used for the evaluation of the other inhibitors, but a different range of concentrations was used: RB (0.0001–1 mM), TPT (0.1–100  $\mu\text{M}$ ), BST (0.1–300  $\mu\text{M}$ ). All measurements were performed at least thrice, and the concentration of inhibitor giving 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) was obtained by plotting the percent of residual activity vs the log of inhibitor concentration. The  $K_i$  values for each *Ts*MF inhibitor were determined by replotting the slopes obtained from the double reciprocal plots as a function of inhibitor concentrations (Segel 1975). To ascertain which type of reversible enzyme inhibition occurs for each of the four inhibitors used on *Ts*MF, initial-velocity enzyme reactions in the presence of the inhibitors were performed. The *Ts*MF was preincubated for a few seconds in the assay buffer with 3 mM GSH and inhibitor at the corresponding concentration (CB, 10, 30  $\mu\text{M}$ ; TPT, 4, 10  $\mu\text{M}$  and BST, 20, 60  $\mu\text{M}$ , RB 5, 10  $\mu\text{M}$ ). The reaction was initiated by addition of one of a range of 0.25 to 1.5 mM of different concentrations of CDNB. A set of reactions under identical conditions was performed for each inhibitor concentration and for the noninhibitor control. The results were measured spectrophotometrically at 340 nm. Data were analyzed by Lineweaver–Burk plots (Segel 1975).

## Chemical structure

Simple inhibition studies in which fractional velocities (FV) were measured as a function of inhibitor concentration were used to distinguish heterologomeric from homologomeric isoenzymes of GST (Tahir and Mannervik 1986). FV developed by the *Ts*MF in the presence of CB, TPT, BST, or RB were determined (Tahir and Mannervik 1986). These FV values were plotted against the log of the inhibitor concentration. The curve generated and its FV value at the maximum slope obtained at  $IC_{50}$  were considered to distinguish between the heterologomeric and homologomeric subunits of *Ts*MF. In theory, a symmetrical graph with a point of inflection at  $\log [I]=\log I_{50}$  and a maximum slope of  $-0.58$  at this point is indicative of a homologomeric enzyme (Tahir and Mannervik 1986).

Determination of the *Ts*MF catalytic constants

To obtain the *Ts*MF  $appK_m$  and  $appV_{max}$  values for GSH and CDNB substrates, initial-velocity assays were performed by following reported procedures (Habig et al. 1974). Briefly, to establish the *Ts*MF catalytic constant for GSH, *Ts*MF concentration was maintained constant (160  $\mu\text{g}$ ), and CDNB at saturation (2 mM) and GSH were varied in a range of 0.01–5 mM. Aliquots of *Ts*MF were preincubated for a few seconds in the assay buffer in the presence of the corresponding concentration of GSH. The reaction was initiated by addition of CDNB. To make an initial velocity plot with that information, at least 11 different concentrations of GSH were assayed each in triplicate. Similar assays were developed for CDNB using a range of 0.1–2 mM of CDNB and GSH at constant concentration (3 mM), where at least seven different concentrations of CDNB were assayed in triplicate. Lineweaver–Burk plots were used to analyze the results of the initial velocity plots.

## Results

To establish that microsomal GST activity is associated with *Ts*MF, the parasite subcellular fractions obtained by differential centrifugation were partially characterized by enzyme markers. Table 1 shows the distribution of various enzyme markers upon subcellular fractionation of cysticerci of *T. solium*. Succinate dehydrogenase was used as a marker for mitochondria ( $10,000 \times g_{av}$  pellet), lactate dehydrogenase for the cytosol ( $105,000 \times g_{av}$ ), and glucose 6-phosphatase for the endoplasmic reticulum ( $105,000 \times g_{av}$  pellet). These markers provide a useful indication of the distribution of these structures. The results obtained are in agreement with those obtained for vertebrate organisms (deDuve et al. 1955). To support the enzyme marker data

**Table 1** Specific activities of subcellular enzyme markers (SEM) in different purified fractions of *T. solium* cysticerci

SEM	Supernatant 105,000× <i>g</i> <sub>av</sub>	Nuclear 600× <i>g</i> <sub>av</sub>	Mitochondrial 10,000× <i>g</i> <sub>av</sub>	Microsomal 105,000× <i>g</i> <sub>av</sub>
Lactate dehydrogenase <sup>a</sup>	370	26	21	23
Succinate dehydrogenase <sup>b</sup>	0.02	0.35	4.87	0.19
Glucose 6-phosphatase <sup>c</sup>	0.1	8	5	94

Values are means of three different experiments. The SD values were less than 10% of the given data.

<sup>a</sup> μmol oxidized NADH min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein

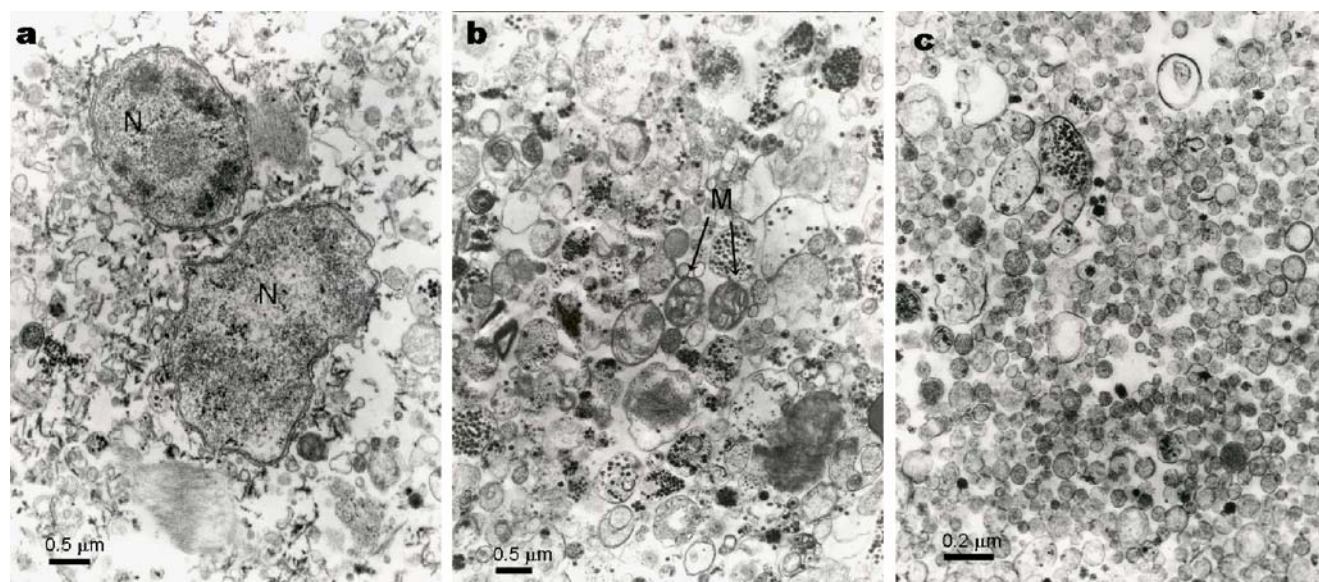
<sup>b</sup> nmol reduced dichlorophenolindophenol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein

<sup>c</sup> nmol Pi formed min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein

further, electron microscopy studies were obtained from different cysticerci subcellular fractionations. Figure 1a showed the 600×*g*<sub>av</sub> pellet fraction with a large number of fibers, whole nuclei, and debris, materials that are usually found in low-speed centrifugation procedures. Figure 1b correspond at the 10,000×*g*<sub>av</sub> pellet fraction, it was an enriched mitochondria fraction that showed the highest succinate dehydrogenase activity. Figure 1c is the 105,000×*g*<sub>av</sub> pellet fraction. It was composed of parasite microsomes and basically the only subcellular fraction that developed the glucose 6-phosphatase activity (classical enzyme marker for endoplasmic reticulum). In the 105,000×*g*<sub>av</sub> supernatant fraction, we found the highest concentration of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase as compared to the other pellet fractions.

To ascertain that microsomal GST activity is not due to cytoplasmic contamination, the activity should remain impervious to washing and to other procedures that release loosely bound material from membranes. The effect of

washing microsomal fractions on GST activity was similar to that reported by Friedberg et al. 1979 and Morgenstern et al. 1980. A single wash with washing buffer removed about 94% of the cytoplasmic contamination from the unwashed microsomal fractions, as estimated from the lactate dehydrogenase activity, but only a 50% decrease in GST activity was observed. After repeated washing, no lactate dehydrogenase activity could be detected, while GST activity remained unchanged (Table 2). Furthermore, the membrane-associated GST activity remained impervious to resuspension of the microsomal fraction in solutions with a high salt concentration, with urea, and at different pH values. There was no effect from the sonication of microsomal fractions. In addition, washing with 1,4-dithioerythritol and GSH, which was performed to rule out the possibility that the GST activity resulted from soluble proteins attached to the microsomes through a disulfide bond, had no effect (Table 3). However, the GST activity was destroyed by heating at 100° C for 5 min, which suggests a protein is involved.



**Fig. 1** Transmission electron micrographs of three subfractions prepared from *T. solium* cysticerci by differential centrifugation. **a** Section of 600×*g*<sub>av</sub> pellet fraction, showing whole nuclei with dense chromatin and pale nucleoli (N), as well as a moderate amount of glycogen in vesicles, and debris including fibers (magnification 10,000×). **b** The

10,000×*g*<sub>av</sub> pellet fraction. Several mitochondria in the center (M), lysosomes (L), and a large number of glycogen containing vesicles (magnification 10,000×). **c** The 105,000×*g*<sub>av</sub> pellet fraction, predominantly microsomal vesicles with an occasional lipid droplet and a lysosome (magnification 10,000×)

**Table 2** Effect of washing glutathione *S*-transferase activity of *Ts*MF

Treatment	Glutathione <i>S</i> -transferase CDNB ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )	Lactate dehydrogenase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )
Unwashed microsomes	2.0	371
First recentrifugation		
Pellet	0.97	22
Supernatant	1.0	346
Second recentrifugation		
Pellet	0.82	11
Supernatant	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>
Third recentrifugation		
Pellet	0.93	nd <sup>a</sup>
Supernatant	nd <sup>a</sup>	nd <sup>a</sup>

Microsomal parasite fractions were washed by resuspension in washing buffer and recentrifuged at  $105,000 \times g_{av}$ . The washed microsomal pellets were resuspended in washing buffer to the original volume (130 ml). The resuspended pellet and supernatant fractions were then measured for glutathione *S*-transferase activity using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate conjugate  $\times \text{min}^{-1} \times (\text{mg microsomal protein})^{-1}$ . Assays were performed in triplicate. Deviations from the mean were never more than 10%.

<sup>a</sup> Not detected

That the GST activity is associated with cysticerci microsomal fractions was supported too by a partial enzymatic characterization in the *Ts*MF as described below.

#### Kinetic properties

The specific activity from several standard substrates for the GST activity was low or negative for the *Ts*MF, except with CDNB, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene, 4-hydroxynonal (the product of AA metabolism; Esterbauer et al. 1986), and the other two alkenals (Table 4).

#### Effect of pH on *Ts*MF activity and stability

*T. solium* microsomal fraction GST activity had an optimum pH at 6.6, but a rapid decrease on either side of this value was observed (data not shown). This result has been reported for other GSTs (Baars et al. 1979; Cochrane et al. 1987; Dierickx 1987). The values for *Ts*MF stability as a function of pH ranged from 6.0 to 7.5.

#### Determination of the *Ts*MF catalytic constants

Lineweaver–Burk plots of the initial velocities catalyzed by *Ts*MF with CDNB at saturated concentration vs the variable

GSH concentrations yielded the values of the  $\text{app}K_m(\text{GSH}) = 0.16 \text{ mM}$  and  $\text{app}V_{\text{max}}(\text{GSH}) = 0.15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . A similar procedure was employed to determine the  $\text{app}K_m(\text{CDNB}) = 14 \text{ mM}$  and  $\text{app}V_{\text{max}}(\text{CDNB}) = 27 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , where GSH was used at a saturation concentration, while the CDNB concentrations were varied.

#### Inhibition studies

##### *IC*<sub>50</sub> and *K*<sub>i</sub>

*IC*<sub>50</sub> results for the *Ts*MF were dependent on the inhibitor used (Tahir and Mannervik 1985) (Table 5). TPT was the most powerful inhibitor, with an *IC*<sub>50</sub> of 8.0  $\mu\text{M}$ . The corresponding *IC*<sub>50</sub> values for CB, BST, and BR were 26.5, 176.5, and 14.3  $\mu\text{M}$ , respectively. An uncompetitive inhibition pattern was observed for RB and CB as inhibitors when CDNB was used as the variable substrate (Fig. 3 shown just for RB). A noncompetitive inhibition pattern was observed for the inhibitors BST and TPT (Fig. 4 shown just for TPT). Plotting of the  $1/v$  ( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) axis intercept against inhibitor concentration (inset of Fig. 3) yielded a *K*<sub>i</sub>

**Table 3** Effect of treatment with various agents upon glutathione *S*-transferase activity of washed microsomal fractions *Ts*MF

Procedure	Glutathione <i>S</i> -transferase ACTIVITY ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Percent residual activity
Washed microsomes	0.85	100
3 M KCl	0.9	106
1 M urea	0.97	114
Washing with		
0.1 M NaCl pH 6.6	0.81	95.3
0.1 M NaCl pH 8.0	0.73	85.9
0.1 M NaCl pH 9.2	0.76	89.4
0.1 M NaCl pH 10.4	0.81	95.3
1.0 M glycine–NaOH, pH 10	0.77	90.6
10 mM EDTA	0.69	81
5 mM DTT	0.92	108
5 mM GSH	0.77	90.6
Sonicated	0.85	100
10 min boiling waterbath	0	0

Microsomal parasite fractions were treated as described under “Materials and methods.” Glutathione *S*-transferase activity was measured with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate conjugated  $\times \text{min}^{-1} \times (\text{mg microsomal protein})^{-1}$ . Assays were performed in triplicate. Deviations from the mean were never more than 10%.

value of 66  $\mu\text{M}$  for RB. The same procedure yielded  $K_i$  values of 5.5  $\mu\text{M}$  for TPT (Fig. 4), 23.6  $\mu\text{M}$  for BST, and 63.5  $\mu\text{M}$  for CB.

### Chemical structure

Figure 2 shows the plot composition of FV for  $T_s\text{MF}$  vs the logarithm of inhibitor concentrations with RB, BST, TPT, and CB. Each straight line for a specific inhibitor indicates the maximal slope expected at  $\text{IC}_{50}$ . The corresponding values were  $-0.82$ ,  $-0.27$ ,  $-0.61$ , and  $-0.42$ , respectively, for BST, TPT, RB, and CB.

### Discussion

The results obtained clearly demonstrate that GST activity is associated with the *T. solium* microsomal fraction ( $T_s\text{MF}$ ). Enzyme markers and microscopy studies show that the  $105,000 \times g_{\text{av}}$  pellet is a microsomal fraction with negligible subcellular organelle contamination. Furthermore, transferase activity was established to be associated with the microsomes, as it could not be removed either by washing with solutions of high ionic strength, of different pH, containing chaotropic agents 1,4-dithioerythritol and GSH, or by sonication.

**Table 4** Substrate specificity of  $T_s\text{MF}$

Substrate	Substrate $\mu\text{M}$	Activity of microsomal glutathione <i>S</i> -transferase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	Activity of glutathione <i>S</i> -transferase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	1,000	0.9	2 <sup>a</sup>
1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	1,000	0.1	0.06 <sup>a</sup>
4-Hydroxynonenal	50	0.067	0.67–6.9 <sup>b</sup>
2,4-Hexadienal	0.003	0.03	
<i>trans</i> -2-Nonenal	0.005	0.05	
Ethacrynic acid	200	n.d. <sup>c</sup>	<0.01 <sup>a</sup>
Cummene hydroperoxide	0.007	n.d. <sup>c</sup>	0.08–0.8 <sup>a,d</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,200	n.d. <sup>c</sup>	

Glutathione *S*-transferase activity were assayed as described in “Materials and methods.”

The values of the microsomal transferase represent the means of at least three determinations. Deviations from the mean were always less than 10%. The last column of values are for rat-liver microsomal (<sup>a</sup>) and cytosolic transferases (<sup>b</sup>) as a comparison (see <sup>a</sup>Morgenstern and DePierre 1983, <sup>b</sup>Danielson and Mannervik 1985).

<sup>c</sup> none detected

<sup>d</sup> With this substrate, the values reported are for glutathione peroxidase, not glutathione transferase activities.

**Table 5** Inhibition of  $T_s\text{MF}$  by various classic glutathione *S*-transferase inhibitors

INHIBITOR	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
Rose Bengal	14.3	66
Cibacron Blue	26.5	63.5
Bromosulphthalein	176.5	23.5
Tripheniltin chloride	8.0	5.5

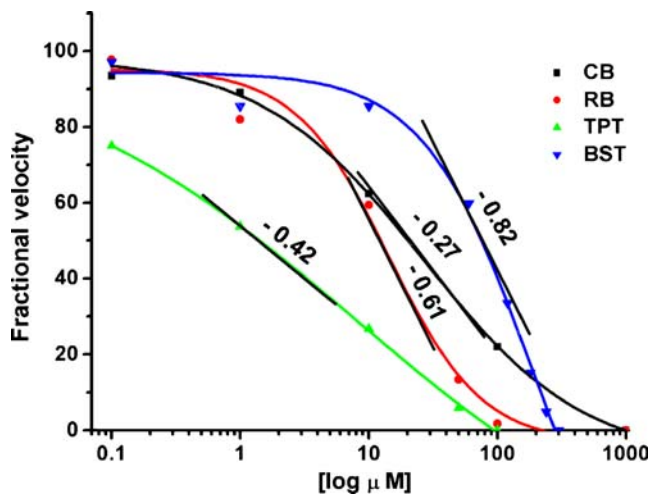
$\text{IC}_{50}$  and  $K_i$  values of  $T_s\text{MF}$  for the inhibitors were determined as described in the “Materials and methods.”

All inhibitors were noncompetitive inhibitors except the uncompetitive Rose Bengal with CDNB as substrate. The inhibition of  $T_s\text{MF}$  by the inhibitors was determined in triplicate, the control assays (no added inhibitor) were conducted in triplicate (SD approx. 5% of mean), and triplicate estimates of percentage inhibition were within 10% of the mean value.

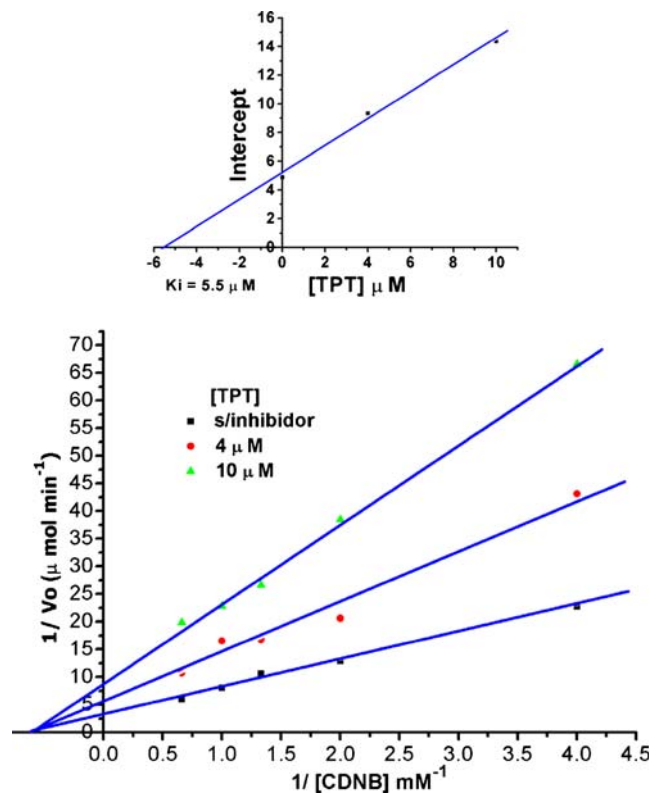
The  $T_s\text{MF}$  apparent  $K_m$  value for GSH (0.164 mM) was lower than that reported for the *T. solium* cytoplasmic GST ( $T_s\text{GST}_{26.5}$ ; Plancarte et al. 2004). In accordance with the pH activity and stability data,  $T_s\text{MF}$  had a lower capacity to maintain the proper conformation of the active site in comparison with the  $T_s\text{GST}_{26.5}$ . Besides, the substrate specificity of the  $T_s\text{MF}$  was different from that of the cytoplasmic *T. solium* and mammalian GSTs (Jakoby 1978).

Enzyme inhibitor assays also support the idea that there is a transferase activity in the microsomal fraction of *T. solium* (Anderson et al. 1988; Mosialou and Morgenstern 1989). The sensitivity of  $T_s\text{MF}$  to four inhibitors for mammalian microsomal GSTs was studied (Mosialou and Morgenstern 1990). The shape of the curves was typical of a simple linear inhibition (data not shown).  $T_s\text{MF}$  was less susceptible to these inhibitors as compared to the enzyme from *Moniezia expansa* (Brophy et al. 1989), *Schistosoma mansoni* (O’Leary et al. 1992), and rSGSTF of *T. solium*, (for BST and TPT; Vibanco-Perez et al. 2002). Double-reciprocal plots showed uncompetitive inhibition for RB and CB and noncompetitive inhibition for the TPT and BST inhibitors employed. The true inhibition constants, obtained by replotting the slopes from the primary plot vs CDNB, were in accordance with the inhibition capacity for each inhibitor. It has been demonstrated for GSTs that simple inhibition studies involving measurements under standard conditions of residual enzyme activity as a function of inhibitor concentrations can be used to distinguish heterologomeric enzymes from the corresponding homologomeric forms. Our  $T_s\text{MF}$  results suggest a heterologomeric form.

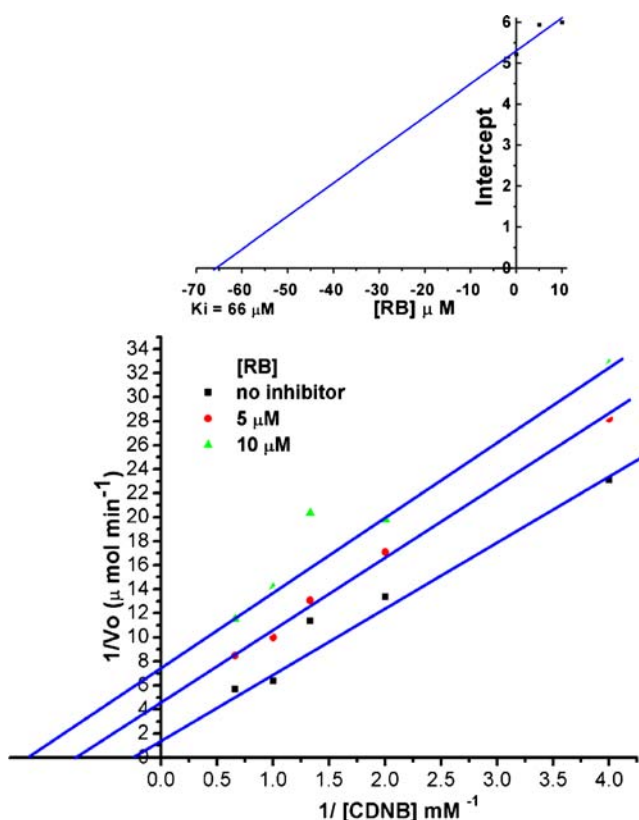
At least two different soluble GSTs have been obtained for *T. solium* as for other helminths (Brophy and Barret 1990; Vibanco-Perez et al. 2002; Plancarte et al. 2004). The current work highlights the importance of this detoxification system in *T. solium* by proving the existence of GST activity in the parasite microsomes and its property to



**Fig. 2** Lineweaver–Burk plot, of typical noncompetitive inhibition, of initial velocities *Ts*MF activity ( $1/v$ ) vs  $1/[\text{CDNB}]$  ( $\text{mM}^{-1}$ ) in the absence (*rectangle*) and presence of 4 (*circle*) and 10  $\mu\text{M}$  (*triangle*) of TPT with variable concentrations of CDNB (0.25–1.5 mM). *Inset* shows secondary plot of the  $1/V_{\max}$  values derived from the primary Lineweaver–Burk plot vs concentration, for the determination of  $K_i$



**Fig. 4** Lineweaver–Burk plot of typical uncompetitive inhibition, of initial velocities *Ts*MF activity ( $1/v$ ) vs  $1/[\text{CDNB}]$  ( $\text{mM}^{-1}$ ) in the absence (*rectangle*) and presence of 5 (*circle*) and 10  $\mu\text{M}$  (*triangle*) of RB with variable concentrations of CDNB (0.25–1.5 mM). *Inset* shows secondary plot of the  $1/V_{\max}$  values derived from the primary Lineweaver–Burk plot vs concentration for the determination of  $K_i$



**Fig. 3** Plot composition of fractional velocities vs  $\log [I]$  for the inhibition of *Ts*MF with bromosulfophthalein (*BST*; *dark triangles*), Cibacron Blue (*CB*; *rectangles*), Rose Bengal (*RB*; *circles*), and triphenyltin chloride (*TPT*; *clear triangles*). The *straight lines* indicate the maximal slope expected at 50% inhibition for a graph consistent with fractional velocity equations

conjugate GSH with alkenals. Such membrane-bound GST may be advantageous for the inactivation of reactive oxygen metabolites formed by the immune response against the parasite. For example, extracellularly generated free radicals can attack the outer surface of the cell membrane leading to lipid peroxidation (Clemens et al. 1991). While these membrane radicals would not likely travel to the internal membranes and nucleus to cause damage, secondary radicals derived from their breakdown products could, through a second message system, cause internal membrane lipid peroxidation and consequently lead to clastogenic activity (Emerit 1987; Kozumbo et al. 1987). Many of these clastogenic factors are lipophilic and thus remain within the membrane rather than diffuse into the cytoplasm. Such compounds would not be expected to be efficiently inactivated by the cytoplasmic GSTs as they would not come into contact with the enzymes.

Another interesting aspect of the MAPEG is their role in the metabolism of eicosanoids. Several of their members are involved in the biosynthesis of leukotriene and prostaglandins (PG) (Fusco et al. 1986; Jakobsson et al. 2000). *S. mansoni* is able to inhibit the migration of activated

Langerhans cells by prostaglandin (PG)<sub>2</sub> possibly as an immune evasion mechanism (Angeli et al. 2001). *Taenia taeniaeformis* also has the ability to generate and release prostanoid compounds, PGE<sub>2</sub>, and prostacyclin, PGI<sub>2</sub> (Leid and McConnell 1983).

Whatever the function of the *Ts*MF GST activity, the evidence gathered in this work may help to understand the *T. solium* ability to evade triggering an immune response in the host.

**Acknowledgments** The authors wish to thank Dr. Gerardo Medina for valuable English corrections. We thank Dra. Irene P. del Arenal, who kindly assisted us during the succinate dehydrogenase measurement. The present study was funded by grant from Universidad Nacional Autónoma de México, DGAPA (PAPIIT-IN201906-3). All the experiments complied with the current laws of the Universidad Nacional Autónoma de México.

## References

- Anderson C, Soderstrom M, Mannervick B (1988) Activation and inhibition of microsomal glutathione *S*-transferase from mouse liver. *Biochem J* 249:819–823
- Angeli V, Faveeuw Ch, Roye O, Fontaine J, Teissier E, Capron A, Wolowczuk I, Capron M, Trottein F (2001) Role of the parasite-derived prostaglandin D<sub>2</sub> in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during Schistosomiasis infection. *J Exp Med* 193:1135–1147
- Arrigoni O, Singer TP (1962) Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenase. *Nature (London)* 193:1256–1258
- 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. *Mutation Res* 62:279–291
- Baset HA, O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW (1995) Characterization of arachidonic-acid-metabolizing enzymes in adult *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 73:31–41
- Belley A, Chadee K (1995) Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? *Parasitol Today* 11:327–334
- Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun T, Balk L, Wiklund R, Ericsson J, Jansson Ch, Peterson B, Jakobsson P (2005) Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *Fed Eur Biochem Soc J* 272:1688–1703
- Brophy PM, Southan C, Barret J (1989) Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem J* 262:939–946
- Brophy PM, Barret J (1990) Glutathione transferase in helminthes. *Parasitology* 100:345–349
- Clemens JA, Ho PP, Panetta JA (1991) LY178002 reduces rat brain damage after transient global forebrain ischemia. *Stroke* 22:1048–1052
- 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
- Danielson PUH, Mannervick B (1985) 4-hydroxyalk-2-enals are substrates for transferase. *FEBS* 179:267–270
- deDuve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60:604–617
- 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 of 450 cases. *Privy Council Med Res Spec Rep Ser Lond* 229:1–58
- Emerit I (1987) Clastogenic factors, a link between chronic inflammation and carcinogenesis. In: Cerutti PA, Nygaard OF, Simic MG (eds) *Anticarcinogenesis and radiation protection*. Plenum, New York, pp 59–62
- Ernster L, Siekevitz P, Palade G (1962) Enzyme–structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat liver. A morphological and biochemical study. *J Cell Biol* 15:541–562
- Esterbauer H, Benedetti S, Lang J, Fulceri R, Fauler G, Comporti M (1986) Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochem Biophys Acta* 876:154–166
- Fiske CH, SubbaRow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400
- Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Carrillo Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciuotto E, Frago G (2003) High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 22:130–145
- Friedberg T, Bentley Ph, Stasiecki P, Glatt HR, Raphael D, Oesch F (1979) The identification, solubilization, and characterization of microsome-associated glutathione *S*-transferases. *J Biol Chem* 254:12028–12033
- Fusco AC, Salafsky B, Delbrook K (1986) *Schistosoma mansoni*. : production of cercarial eicosanoids as correlates of penetration and transformation. *J Parasitol* 72:397–404
- Gonzalez R, Mendoza-Hernandez G, Plancarte A (2002) Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitol Res* 88:881–887
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione *S*-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139
- Jakobsson P, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B (2000) Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism (MAPEG). A widespread protein superfamily. *Am J Res Crit Care Med* 161:S20–S24
- Jakoby WB (1978) The glutathione *S*-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol* 46:383–414
- Joseph PD, Mannervick B, Ortiz de Montellano P (1997) Carcinogenic: the genetic target. In: Joseph PD, Mannervick B, Ortiz de Montellano P (eds) *Molecular toxicology*. University Press, Oxford, UK, pp 309–315
- Kozumbo W, Muehlematter D, Ochi T, Cerutti P (1987) The role of active oxygen and the metabolism of arachidonic acid in the formation of clastogenic factor by human monocytes. In: Cerutti PA, Nygaard OF, Simic MG (eds) *Anticarcinogenesis and radiation protection*. Plenum, New York, pp 51–57
- Leid RW, McConnell LA (1983) PGE<sub>2</sub> generation and release by the larvae stage of the cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Prostaglandins Leukot Med* 11:317–323
- Leid RW, Suquet CM, Taniyoshi L (1987) Parasite defense mechanism for evasion of host attack: a review. *Vet Parasitol* 25:147–162
- Morgenstern R, DePierre W (1983) Purification in unactivated form and further characterization of the activation process, substrate specificity and amino acid composition. *Eur J Biochem* 134:591–597
- Morgenstern R, DePierre JW, Ernster L (1979) Activation of microsomal glutathione *S*-transferase activity by sulfhydryl reagents. *Biochem Biophys Res Commun* 87:657–663

- Morgenstern R, Meijer J, DePierre JW, Ernster L (1980) Characterization of rat-liver microsomal glutathione *S*-transferase activity. *Eur J Biochem* 104:167–174
- Morgenstern R, Lundqvist G, Hancock V, DePierre W (1988) Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione *S*-transferase, in particular with a substrate analogue series. *J Biol Chem* 263:6671–6675
- Mosialou E, Morgenstern R (1989) Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 275:289–294
- Mosialou E, Morgenstern R (1990) Inhibition studies on rat liver microsomal glutathione transferase. *Chem Biol Interact* 74:275–280
- Mosialou E, Piemonte F, Andersson C, Vos REM, van Bladeren P, Morgenstern R (1995) Microsomal glutathione transferase: lipid-derived substrates and lipid dependence. *Arch Biochem Biophys* 320:210–216
- O'Leary KA, Hathaway KM, Tracy JW (1992) *Schistosoma mansoni*: single step purification and characterization of glutathione *S*-transferase isoenzyme 4. *Exp Parasitol* 75:47–55
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158–169
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346–356
- Plancarte A, Rendón JL, Landa A (2004) Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione *S*-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol Res* 93:137–144
- Prabhakar S, Singh G (2002) Neurocysticercosis: an overview of clinical presentation. In: Singh G, Prabhakar S (eds) *Taenia solium* cysticercosis, from basic to clinical science. CABI, Oxford, UK, pp 169–176
- Schantz PM (2002) *Taenia solium* cysticercosis: an overview of global distribution and transmission. In: Singh G, Prabhakar S (eds) *Taenia solium* cysticercosis, from basic to clinical science. CABI, Oxford, UK, pp 63–73
- Segel I (1975) Simple inhibition systems. In: Segel I (ed) *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Wiley, New York, p 957
- Shandera WX, White AC, Chen J, Diaz P, Armstrong R (1994) Cysticercosis in Houston, Texas: a report of 112 cases. *Medicine* 73:37–52
- Spurr AR (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31
- Swanson MA (1955) Glucose-6-phosphatase from liver. *Methods Enzymol* 2:541–543
- Tahir MK, Mannervik B (1985) Inhibitors for distinction of three types of human glutathione transferase. *FEBS Lett* 181:249–252
- Tahir MK, Mannervik B (1986) Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase. *J Biol Chem* 261:1048–1051
- Vassault A (1983) UV-method with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer HUB, Bergmeyer J, Grabe M (eds) *Methods in enzymatic analysis*, vol. III. Academic, New York, pp 118–126
- Vibanco-Perez N, Jiménez L, Mendoza-Hernandez G, Landa A (2002) Characterization of a recombinant mu-class glutathione *S*-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res* 88:398–404
- Weitberg AB, Weitzman SA, Destremps M, Latt SA, Stossel TP (1983) Stimulated human phagocytes produce of cytogenic changes in cultured mammalian cells. *New Eng J Med* 308:26–30

## 10. Referencias

1. Zedillo, G.; Bobadilla Vela, I. Historia de la cisticercosis porcina en México. Archivo de Investigación Médica. México. 1987. Vol 18. No. 2. 77-90.
2. Rodríguez, R.R. Contribución al estudio de la cisticercosis porcina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. 1962. 15-35.
3. Nieto, D. Historial notes on cysticercosis. En Flisser A, Wilmls K, Laclette J P, Larralde C. et al. Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic. Press, New York. 1982; 1 – 7.
4. Gómez Alanís, A. Dos casos de cisticercosis cutáneo – muscular en el hombre. An Inst. Invest, Cientif (Monterrey).1994. 1 (1). 79 – 93 (10)
5. Slais Jaroslav. 1970. The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms. *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences. Czechoslovakia
6. Gómez, J.L. Enfermedad del cisticerco en el puerco. Gaceta Médica de México. Imprenta de Ignacio Escalante. 1889. México. Tomo XXIV. No. 4. 57-64.
7. Cheng, T. General Parasitology. Harcourt Brace Haranovich, Publishers. New York. 1986.
8. Saiz Moreno L.1976. Las zoonosis. Aspectos sanitarios, económicos y sociales. Epidemiología. Diagnostico y Profilaxis. Ed. Aedos. Barcelona.
9. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J P, Larralde C, Madrazo I, Velázquez V, Willms K. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de cultura Económica. México. 1987
10. Abdussalam, M. El problema de la Teniasis – Cisticercosis. VII Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. Organización Panamericana de la salud. 1975. Publicación científica No. 295. 117-129.
11. Cordero del Campillo. Parasitología y Enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed Limusa. México. 1990.



12. Acha, P.N.; Szyfres, B. Teniasis y cisticercosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. 2° Ed. . Publicación científica No. 503. 763-774.
13. Smyth, J. D. The biology of cestode life – cycles. Technical Communication Number 34 of the Commonwealth Bureau of Helminthology, St. Albans, Herts, England. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal, Bucks, England. 1963.
14. Sartí Gutiérrez, E. J.; Gutiérrez Ospina, I. La teniasis y cisticercosis en México. (Revisión bibliográfica). Salud Pública de México. 1986. 28( 5): 556-563.
15. Aluja, A. Manchas de leche (Milk Spots) por metacestodos de *Taenia solium* en hígados de cerdo. Vet. Mex. 1994. Vol. 25. No. 2. p 155
16. Flisser, A. Neurocysticercosis in Mexico. Parasitology Today . 1988. 4 (5): 131 – 137.
17. Thornton, H. Gracey, J. F. Textbook of meat Hygiene. 8th Edition. The University Press, Aberdeen. Great Britain. Baillière Tindall. London. 1976.
18. Escobar Izquierdo A. Patología de la Neurocisticercosis. In Flisser A., Malagón F. Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Ed. Limusa. México. 1989
19. Ramírez – Bon, E., Merchant, M.T., González del Pliego, M., Cañedo, L. Ultraestructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. En Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., et al. In Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York. 1982. 261 – 279
20. Lumsden RD, Voge M, Sogandares – Bernal F. The metacestode tegument: Fine structure, development, topochemistry and interactions with the host. En Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., et al. In Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York. 1982. 307 – 360
21. Alberts B. Biología Molecular de la Célula 4ª Edición. Barcelona. Ediciones Omega. 2004. 84-282-1351-8

22. Escobar, A. The pathology of neurocysticercosis. *Cysticercosis of the Central Nervous System*. Ed by. Palacios E, Rodríguez Carbajal M D. and Taveras J M. Charles C Thomas Publisher. U.S.A. 1983; 27 – 54.
23. Sotelo, J. Clínica y diagnóstico de la cisticercosis humana. Organización Pan-Americana Da Saude. 1996. 122-124.
24. Flisser A, Madrazo I, Delgado H. *Cisticercosis Humana*. Editorial Moderno. México. 2000
25. Sarti, E.; Flisser, A.; Schantz. P.M.; Gleizer, M.; Loya, M.; Plancarte, A.; Avila, G.; Allan, J.; Craig, P.; Bronfman, M.; Wijeyaratne, P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997. Vol. 56, No. 2. 127-132
26. Acha P. N., Aguilar, F. J. Studies on cysticercosis in Central America and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1964; 13: 48 – 53.
27. García – Noval J., Allan J. C., Fletes C., Moreno, E., De Mata, F., Torres – Alvarez, R., Soto de Alfaro, H., Yurrita, P., Higueros – Morales, H., Mencos, F., Craig, P. S. Epidemiology of *Taenia solium* and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 1996; 5 (3): 282 – 289.
28. Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Chavarría, A., Vera, R., Yáñez, O., Carillo Mezo, R., Piña, J., de Aluja S., A., Larralde, C. *Taenia solium* cysticercosis of human and pigs: A review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. *Recent Res. Devel. Infection & Immunity*. 2003 (1):475 – 497.
29. Chatel, G., Gullea, M., Scolari, C., Bombana E., El-Hamad, I., Matteelli A., Carosi, G. Short Report: Neurocysticercosis in an Italian traveler to Latin America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60 (2):255 –256.
30. Schantz, P.M.; Sarti, E.; Plancarte, A.; Wilson, M.; Ciales, J.L.; Roberts, J.; Flisser, A. Community-Based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: Comparison of serological Screening tests and clinical findings

- in two populations in Mexico. *Clinical Infectious Diseases*. 1994. Vol. 18. 879-885.
31. Dixon H., Lipscomb F. 1961. cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. Privy Council Med Res Special Report Ser 229: 1-58.
  32. Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol Lett*. 1987; 16 (3 – 4): 315 – 20.
  33. Lanzar M, Gross U, Moll H. Mechanisms of parasite persistence and immune evasion. *Parasitology Today*. 1997. 13: 1 – 3.
  34. Van Hellemond JJ, Retra K, Brouwers JF, van Balkom BW, Yazdanbakhsh M, Shoemaker CB, Tielens AG. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. *Int J Parasitol*. 2006;36 (6):691-9.
  35. Davis SW, Hammerberg B. *Taenia taeniaeformis*: evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. *Int J Parasitol*. 1990; 20 (5): 587 – 93.
  36. Gruenberg J, van der Goot FG. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7 (7): 495 – 504.
  37. Zang X, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott AL, Walkinshaw MD, Maizels RM. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. *J Biol Chem*. 2002; 277 (46):44261-7.
  38. Cross AR, Jones OT. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1057 (3):281-98.
  39. Brophy P., Pritchard D. 1992. Immunity to helminthes: ready to tip the biochemical balance *Prasitol Today* 8: 419-422.
  40. Rice-Evans C. 1994. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological state. In: *Free radical damage and its control*. Rice-Evans C., Khan R (eds) pp-131-153 Elsevier Sci. London.
  41. Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201: 1203-1209.

42. Seis H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 215: 213 – 219.
43. Callahan, H.L., R.K. Crouch, and E.R. James, *Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?* *Parasitol Today*, 1988. 4(8): 218-25.
44. Rosen, GM, et al. *Free radicals and phagocytic cells.* *Faseb J*, 1995. 9(2): 200-9.
45. James, E.R., *Superoxide dismutase.* *Parasitol Today*, 1994. 10(12): p. 481-4.
46. Henkle-Duhrsen, K. and A. Kampkotter, *Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes.* *Mol Biochem Parasitol*, 2001. 114(2): 129-42.
47. McGonigle, S., G.P. Curley, and J.P. Dalton, *Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite Fasciola hepatica.* *Parasitology*, 1997. 115: 101-4.
48. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2005. 45:51 – 88.
49. Habig W, Pasbt M, Jakoby W. Glutathione S- Transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974. 249: 7130 – 7139.
50. Keen JH, Jakoby WB. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J. Biol. Chem.* 1978. 253: 5654 – 57.
51. Lander JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL, Armstrong RN. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry.* 2004. 43: 352 – 61.
52. Jakobsoon P-J, Morgenstern R, Mancini J, Ford – Hutchinson A, Persson B. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* 1999. 8: 689 – 92.
53. Jowsey IR, Thomson RE, Orton TC, Elcombe CR, Hayes JD. Biochemical and genetic characterization of a murine class Kappa glutathione transferase. *Biochem. J.* 2003. 373: 559 -569.
54. Andersson C, Mosialou E, Weinander R, Morgenstern R. 1994. Enymology of microsomal glutathione S-transferase. *Adv Pharmacol* 27: 19-35.

55. Horbach M E, Sies H, Akerboom T. 1993. Identification of a hepatic plasma membrane glutathione *S*-transferase activated by *N*-ethylmaleimide. *Biochim Biophys Acta* 1148: 61-66.
56. Bresell A, Weinander R, Lundqvist G, Raza H, Shimoji M, Sun TH, Balk L, Wiklund R, Eriksson J, Jansson C, Persson B, Jakobsson PJ, Morgenstern R. Bioinformatic and enzymatic characterization of the MAPEG superfamily. *FEBS Journal*. 2005. 272: 1688 – 1703.
57. Bogaards JJ, Venekamp JC, van Bladeren PJ. 1997. Stereoselective conjugation of prostaglandin A<sub>2</sub> and prostaglandin J<sub>2</sub> with glutathione, catalyzed by the human glutathione *S*-transferase A1-1, A2-2, M1a-1a and P1-J. *Chem Res Toxicol* 10: 310 – 317
58. Wéller P, Longworth D, Jaffe J. 1989. Leucotrine C<sub>4</sub> synthesis catalized by *Dirofilaria immitis* glutathione *S*-transferasa. *Am J Trop Med Hyg* 40:171 – 175.
59. Sjostrom M, Jakobsson PJ, Heimbürger M, Palmblad J, Haeggstom JZ. 2001. Human umbilical vein endothelial cells generate leucotriene C<sub>4</sub> via microsomal glutathione *S*-transferasa type 2 and express the CysLT1 receptor. *Eur J Biochem* 268 (9): 2578 – 2586.
60. Herve M, Angeli V, Pinzar E, Wintjens R, Faveeuw Ch, Narumiya S, Capron A, Urade Y, Capron M, Riveau G, Trottein F. 2003. Pivotal roles of the parasite PGD<sub>2</sub> synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur J Immunol* 33: 2764-2772.
61. Morgenstern R, DePierre W, Jörnvall. Microsomal Glutathione Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985; 260 (26): 13976 – 13983. Holm PJ, Morgenstern R, Hebert H, The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22<sub>1</sub>2<sub>1</sub> crystals. *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. 1594: 276 – 85.
62. Segel I. Simple inhibition systems. In *Enzyme kinetics. Behavior and análisis of rapad equilibrium and steady – state enzyme systems*. Jhon Eiley and Sons, Inc. New York. 1975. pp – 100 – 160.
63. Segel I. *Biochemical calculations*. Jhon Wiley and Sons, Inc, New Cork. 1976.

64. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principios de Bioquímica. 3er. Edición. Omega. España. 2000
65. Voet D, Voet JG. *Bioquímica*. Barcelona: Omega. España. 1992.
66. Fridovich I. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* 1986. 58: 61 -97
67. Gonzalez R, Mendoza-Hernandez G, Plancarte A. Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitol Res.* 2002; 88(10):881-7.
68. Lesoon A, Komuniecki PR, Komuniecki R. Catalase activity during the development of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Comp Biochem Physiol B.* 1990; 95(4):811-5.
69. Molina-Lopez J, Jimenez L, Ochoa-Sanchez A, Landa A. Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*. *J Parasitol.* 2006; 92(4):796-802.
70. Rendon JL, del Arenal P, Guevara-Flores A, Uribe A, Plancarte A, Mendoza-Hernandez G. 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol Biochem Parasitol* 133: 61-69.
71. Vibanco-Perez N, Jiménez L, Merchant M, Landa A. 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol* 85: 448-453.
72. Vibanco-Perez N, Jiménez L, Mendoza – Hernández G, Landa A. 2002. Characterization of a recombinant mu – class glutathione S- transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res.* 88: 398-404.
73. Plancarte A., Rendon J., Landa, A. 2004. Purification characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa *Parasitol Res* 93: 137-144.
74. Ernest L, Siekevitz p, Palade G. Enzyme – structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat liver. A morphological and biochemical study. *Journal Cell Biology.* 1962. 15: 541 -562.
75. Spurr AR. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal Ultrastructure Research.* 1969. 26 : 31.

76. Swasson MA. Glucose - &- phosphatase from liver. *Methods in Enzymology*. 1955. 2: 541 – 543.
77. Fiske CH, Subarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal Biological Chemistry*. 1925. 66: 375 – 400.
78. Vassault A. UV – method with pyruvate and NADH. In *Methods in enzymatic analysis*. Vol. III, HU B Bergmeyer, J Bergmeyer and M GRabe (eds.). Academic Press, New York. 1983. pp 118 – 126.
79. Arrigoni O, Singer TP. Limitations of the phenazine methosulfate assay for succinic and related dehydrogenase. *Nature*. 1962. 193: 1256 – 1258.
80. Morgenstern R, Meijer J, Depierre JW, Ernster L. Characterization of rat-liver microsomal glutathione S-transferase activity. *Eur J Biochem*. 1980. 104 (1): 167 – 74.
81. Morgenstern R, Guthenberg C, Depierre JW. Purification of microsomal glutathione S-transferase. *Acta Chem Scand B*. 1982. 36 (4): 257 – 9.
82. Morgenstern R, Guthenberg C, Depierre JW. Microsomal glutathione S-transferase. Purification, initial characterization and demonstration that it is not identical to the cytosolic glutathione S-transferases A, B and C. *Eur J Biochem*. 1982. 128 (1): 243 – 8.
83. Tahir MK, Mannervik. 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 261(3): 1048 – 1051.
84. Tahir MH, Guthenberg C, Mannervik B. 1985. Inhibitors for distinction of three types of human glutathione transferase. *Federation of European Biochemical Societies*. 181 (2): 249 – 252.
85. Weinander R, Anderson C, Morgenstern R. Identification of N-acetylcysteine as a new substrate for rat liver microsomal glutathione transferase. A study of thiol ligands. *J Biol Chem*. 1994. 7; 269 (1) :71 – 6.
86. Pearson WR. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol*. 2005;401:186-204.

87. Hayes JD, Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res.* 1995. 22 (3): 193 – 207. Review
88. Holm PJ, Bhakat P, Jegerschold C, Gyobu N, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Morgenstern R, Hebert H. Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. *J Mol Biol.* 2006. 28; 360 (5): 934 - 45.
89. Morgenstern R, DePierre JW, Ernster L. Activation of microsomal glutathione S-transferase activity by sulfhydryl reagents. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979. 13; 87 (3): 657 – 63.
90. Sun TH, Ling X, Persson B, Morgenstern R. A highly active microsomal glutathione transferase from frog (*Xenopus leavis*) liver that is not activated by N – ethylmaleimide. *Biochemical and Biophysics Research Communication.* 1998. 246: 466 – 469.
91. Kaneko T, Tanaka A, Sato S, Kotani H, Sazuka T, Miyajima N, Sugiura M, Tabata S. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence Features in the 1 Mb Region from Map Positions 64% to 92% of the Genome. *DNA Research.* 1995. 2: 153–166.
92. Oesch F, Wolf CR. Properties of the microsomal and cytosolic glutathione transferases involved in hexachloro-1:3-butadiene conjugation. *Biochem Pharmacol.* 1989. 15;38(2):353-9
93. Siritantikorn A, Johansson K, Ahlen K, Rinaldi R, Suthiphongchai T, Wilairat P, Morgenstern R. Protection of cells from oxidative stress by microsomal glutathione transferase 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007. 6; 355 (2): 592 – 6.
94. Clemens JA, Ho PP, Panetta JA. LY178002 reduces rat brain damage after transient global forebrain ischemia. *Stroke.* 1991. 22: 1048-1052
95. Emerit I. Clastogenic factors, a link between chronic inflammation and carcinogenesis. In: *Anticarcinogenesis and Radiation Protection.* Cerutti PA, Nygaard OF, Simic MG (eds) Plenum Press, New York, 1987. pp 59-62



96. Kozumbo W, Muehiematter D, Ochi T, Cerutti P. The role of active oxygen and the metabolism of arachidonic acid in the formation of clastogenic factor by human monocytes. In: Anticarcinogenesis and Radiation Protection. Cerutti PA, Nygaard OF, Simic MG (eds) Plenum Press, New York, 1987. pp 51-57
97. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. Trends Immunol. 2002. 23: 144-150
98. Leid RW, McConnell LA. PGE<sub>2</sub> generation and release by the larvae stage of the cestode, *Taenia taeniaeformis*. Prostag Leukoc Med. 1983. 11: 317-323
99. Fusco AC, Salafsky B, Delbrook K. *Schistosoma mansoni*: production of cercarial eicosanoids as correlates of penetration and transformation. J Parasitol. 1983. 72: 397-404