

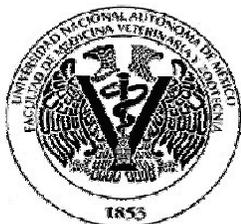


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE ACARREADORA
DE LA GLUTATIÓN S-TRASFERASA DE
CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
MARTHA ADRIANA HERNANDEZ BAUTISTA



MEXICO, D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente MVZ Héctor Quiroz Romero

Vocal MVZ Maria Teresa Clemencia Quintero Martínez

Secretario MVZ Félix Eduardo Tena Betancourt

1er Suplente MVZ Evangelina Romero Callejas

2do Suplente MVZ Miguel Ángel Martínez Castillo

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM

ASESOR

Dr. Agustín Plancarte Crespo

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a mi mamá por estar conmigo siempre, darme amor,
cuidado y sobre todo por ser una gran amiga. Gracias por
tus consejos, por las horas de desvelo a mi lado y
por darme educación, gracias por
creer en mí.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín Plancarte Crespo por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, compartir sus conocimientos, sus consejos, apoyarme durante la realización del presente trabajo y terminar exitosamente la tesis.

A la M en C. Gabriela Nava Balderas por compartir sus conocimientos, sus consejos, apoyarme para terminar la tesis y por brindarme su amistad

Al MVZ Víctor Manuel Salgado Alfaro por proporcionarme los ratones empleados para la realización de este trabajo, por sus consejos y amistad.

Al MVZ José Agustín Jiménez Rodríguez por sus observaciones, conocimientos, ayuda para terminar la tesis y amistad

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación.

A la UNAM y especialmente a la FMVZ por ser mi segunda casa, darme la infraestructura durante mi formación profesional y formarme con éxito.

A la Facultad de Medicina de la UNAM, por abrirme sus puertas.

De igual forma agradezco al jurado por la atención prestada para la revisión de la tesis, por sus consejos y sugerencias en este trabajo.

A mi familia:

Doy gracias a dios por la familia que me brindo, por su ejemplo de vida y amor ya que sin ellos no seria lo que soy.

- A mis padres
- A mi hermano
- A mis tíos
- A mi prima
- A mis sobrinos
- A los que siempre me reciben con cariño: Moscobichi y Kimosabi

A mis amigos:

A los que están y a los que han dejado huella. Por todos los momentos compartidos y ojalá sigamos compartiendo, por su cariño, por ser mis compañeros de estudio, por los regaños, por sus consejos y por sus cuidados.

INDICE

1. Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 <i>Taenia crassiceps</i>	2
1.1.1 Morfofisiología	2
1.1.2 Ciclo biológico	3
1.2 Evasión inmune	5
1.3 Glutación S-transferasas (GSTs)	7
1.3.1 Características bioquímicas	7
1.3.2 Clasificación	8
1.3.3 Estructura	8
1.3.4 Mecanismo catalítico	10
1.3.5 Método de purificación	10
1.3.6 Distribución en tejidos	11
1.3.7 Función de ligandina	12
1.3.7.1 Ácidos biliares	12
1.3.7.2 Bilirrubinas	13

1.3.7.3 Hematina	15
1.4 Enzimología	16
1.4.1 Cinética enzimática	16
1.4.2 Estudios de inhibición	18
1.4.3 Estudios de fluorescencia	20
2. Hipótesis	23
3. Objetivos	24
4. Material y Métodos	24
4.2 Purificación de la enzima	24
4.2.1 Mantenimiento y obtención de los parásitos de <i>T. crassiceps</i>	24
4.2.2 Obtención del extracto crudo del metacestodo (ECM)	25
4.2.3 Precipitación con sulfato de amonio	25
4.2.3 Obtención de la fracción de GST de <i>T. crassiceps</i> (GST _{Tc})	26
4.2.3.1 Cromatografía de afinidad Sefarosa-GSH	26
4.2.3.2 Detección y concentración de las fracciones cromatográficas con actividad de GST	27
4.2.3.3 Cromatoenfoco en PBE	27

4.2.3.4 Determinación del peso molecular nativo por columna de filtración	27
4.3 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida	28
4.4 Ensayos enzimáticos	28
4.4.1 Determinación de la especificidad por sustratos de la GST <i>Tc</i>	29
4.4.2 Determinación del pH óptimo y de equilibrio	30
4.4.3 Estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas	31
4.4.4 Determinación de los parámetros cinéticos de la GST <i>Tc</i>	31
4.4.4.1 Km, Vmax de la GST para sus sustratos más comunes:	31
4.5 Determinación de los parámetros de inhibición (I_{50} , tipo y constantes inhibitorias) de diversos compuestos	32
4.6 Determinación de la fluorescencia de la GST <i>Tc</i>	33
5. Resultados	34
5.1 Purificación de la enzima	34
5.1.1 Obtención de los cisticercos	34
5.1.2 Precipitación con sulfato de amonio	34
5.1.3 Cromatografía de afinidad y PBE	35
5.1.3.1 Determinación del punto isoelectrico	37
5.2 Análisis electroforético	37

5.3 Determinación de los pesos moleculares y composición de las subunidades	39
5.4 Especificidad de sustrato	41
5.4.1 Actividades específicas de la GSTTc con diversos sustratos	41
5.5 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la GSTTc	41
5.6 Efecto de la temperatura sobre la GSTTc	42
5.7 Determinación de las constantes catalíticas	43
5.8 Estudios de inhibición (I_{50} , K_i y tipo de inhibición)	46
5.9 Estudios de inhibición de la fluorescencia	48
6. Discusión	50
7. Conclusiones	52
8. Bibliografía	53

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ACARREADORA DE LA GLUTATIÓN S-TRASFERASA DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*

RESUMEN

La GSTTc se purificó a homogeneidad 80 veces con un rendimiento del 2.27%. Para tal fin se empleo una cromatografía de afinidad para GSH y un cromatoenfoco en PBE 94. La GSTTc mostró ser una enzima dimérica con un Mr 54000 y subunidades de Mr 27000. Su pH óptimo de reacción es de 8.0 y es estable en un rango de pH 6 – 9. La enzima incrementó su actividad a partir de 10°C hasta 35°C y posteriormente la disminuyó hasta cero a los 80°C. La GSTTc presentó una actividad específica de 1.45, 0.052, 0.134 y 0.42 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), 1, 2-dicloro 4 nitrobenzono, ácido etacrínico y trans-non-2-enal respectivamente, pero no presentó actividad para bromosulfaleína, hexa-2,4 dienal, 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano e hidroperóxidos. Cuando se usó el CDBN como sustrato se obtuvo una $K_{m(\text{CDNB})} = 0.38 \pm 0.065 \text{ mM}$ y una $V_{\text{max}(\text{CDNB})} = 0.57 \pm 0.023 \mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, y al emplear al glutatión (GSH) una $K_{m(\text{GSH})} = 0.66 \pm 0.07 \text{ mM}$, y $V_{\text{max}(\text{GSH})} = 0.9 \pm 0.03 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

La GSTTc fue inhibida tanto por la bromosulfaleína como por la hematina y sus valores IC_{50} fueron 0.010 mM y 0.53 μM respectivamente. En el mismo orden los valores de las K_i s determinados fueron: 0.4 μM y 1 mM. Ambos inhibidores actuaron sobre la enzima de forma no competitiva. Esta interacción molecular también se corroboró por estudios de fluorescencia. Adicionalmente la GSTTc fue capaz de inhibir la fluorescencia de excitación emitida por las porfirinas del líquido vesicular de *T. solium*, sugiriendo la unión de estos productos tóxicos sobre la enzima.

Se concluye que la GST T_c es diferente de las GSTs publicadas de otros cestodos y los resultados de inhibición y de fluorescencia sugieren que la enzima es capaz de unir ligandos en sitios diferentes del sitio activo.

INTRODUCCIÓN

Los cisticercos del cestodo *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) pueden permanecer en forma crónica en los tejidos de ratones inmunológicamente competentes sin ser dañados. Esta observación podría explicarse por algún mecanismo de evasión inmune desarrollado por el parásito (1). Las enzimas Glutación *S*-transferasas (GSTs), podrían estar involucradas en la evasión inmune de diversos parásitos (2, 3) por sus funciones detoxificantes y de “ligandinas”. Esta última función consiste en unir diversos ligandos biológicos y xenobióticos en sitios diferentes al sitio activo de la enzima. Diversas GSTs unen de forma no covalente, químicos lipofílicos aniónicos o neutros no sustratos. Ejemplos de estos compuestos son la bilirrubina, los ácidos biliares, los ácidos grasos, la hematina, y las porfirinas (4). Muchas de estas moléculas o sus productos intermediarios son tóxicos. De esta forma la unión de xenobióticos y endobiótico a las GSTs podría ser una forma no catalítica de detoxificación pasiva que pudiera ayudar al parásito a evadir la respuesta inmune. El objetivo de este trabajo fue purificar, caracterizar y evaluar la función de “ligandina” de la GST de cisticercos de *T. crassiceps* (GST T_c).

Taenia crassiceps

Morfofisiología

Taenia crassiceps es un parásito de roedores y cánidos. Pertenece a la subclase cestoda y familia tenidae, es un gusano aplanado, excepcionalmente largo.

Las estructuras de los huevos de este ténido comprenden una envoltura externa llamada cápsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio, la siguiente envoltura es la cubierta protectora o embrióforo formada por bloques de

queratina unidos por una proteína cementante. A su vez, el embrióforo es producido por una envoltura celular mas profunda llamada célula embriofoal. Finalmente, tiene una envoltura llamada membrana oncosferal. Generalmente su coloración es blanquecina o ligeramente amarilla. El embrióforo recubre a la oncosfera o embrión hexacanto, nombrada así ya que presenta 3 pares de ganchos. Este tiene forma esférica con un tamaño de 30-40 μM (5).

Larva o cisticerco: la morfología de la forma larvaria de este cestodo es una vesícula casi esférica de aproximadamente 0.5 a 1.5 cm de diámetro, con un escólex invaginado, posee 4 ventosas y dos coronas de ganchos rostelares que varían en numero de 22 a 28, solo que no son uniformes, algunos son grandes de 155 a 187 μM y otros pequeños de 107 a 142 μM , esta particularidad es característica de la especie (5, 6).

Adulto: presenta un cuerpo alargado y segmentado, adaptado a la forma tubular del intestino delgado de su hospedero intermediario. Este estadio morfológicamente presenta un cuerpo con simetría bilateral, compuesto por proglótidos alargados y aplanados dorsoventralmente. El parásito adulto puede dividirse en 3 regiones: el escólex (órgano de fijación a la mucosa intestinal), el cuello (región de tejido indiferenciado situado inmediatamente abajo del escólex, produce los proglótidos) y el estróbilo (formado por un numero variable de proglótidos).

Existen cepas de este parásito como la Hyg, WFU (ambas con escólex) y la ORF (sin escólex) (7).

Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. crassiceps* comprende tres estadios diferentes: la forma de huevo, la larva y el adulto.

El ciclo se lleva a cabo cuando el huevo es consumido por los huéspedes intermediarios, ratones y ratas. El huevo en este hospedero se desarrolla causando la cisticercosis en los murinos y se convierte en estado adulto cuando el huésped definitivo ingiere un roedor infectado con cisticercosis, este parásito se

ubica en el intestino. El cánido teniásico libera junto con su excremento los huevos del parásito, potencialmente infectivos para nuevos hospederos. De esta manera *T. crassiceps* pasa de su hospedero intermediario al definitivo y viceversa (8)

Los cisticercos no necesariamente requieren llevar a cabo todo el ciclo biológico para su reproducción, ya que el cisticerco tiene la capacidad de multiplicarse en el peritoneo de los roedores formando gemas que se desarrollan de sus membranas, estas gemas al desprenderse del cisticerco que las originó forman un nuevo individuo y así sucesivamente. Por lo tanto un solo cisticerco puede producir decenas de nuevos individuos en pocas semanas (9, 10).

Esta propiedad del parásito permite que se pueda reproducir *in vivo* en el laboratorio mediante pases intraperitoneales entre ratones no infectados, inyectándoles cisticercos por vía intraperitoneal por medio de una jeringa. Por lo tanto se mantienen *in vivo* los cisticercos y de manera óptima en la cavidad abdominal de los ratones, así con este método obtenemos grandes cantidades de cisticercos y en el momento necesario para el estudio experimental de la relación hospedero-parásito (11).

Como se puede ver la estructura microscópica de *T. crassiceps* y *T. solium* es muy parecida tanto de los cisticercos como de los adultos. Ambos presentan ciclo de vida indirecto, es decir requieren de un hospedero intermediario para el metacéstodo, roedores o topos en el caso de *T. crassiceps* y ganado porcino para *T. solium*, así como un hospedero definitivo para el estado adulto del parásito, como el zorro rojo, lobo y coyote de manera natural y en la infección experimental al perro en *T. crassiceps* (Fig. 1) y el hombre para *T. solium*.

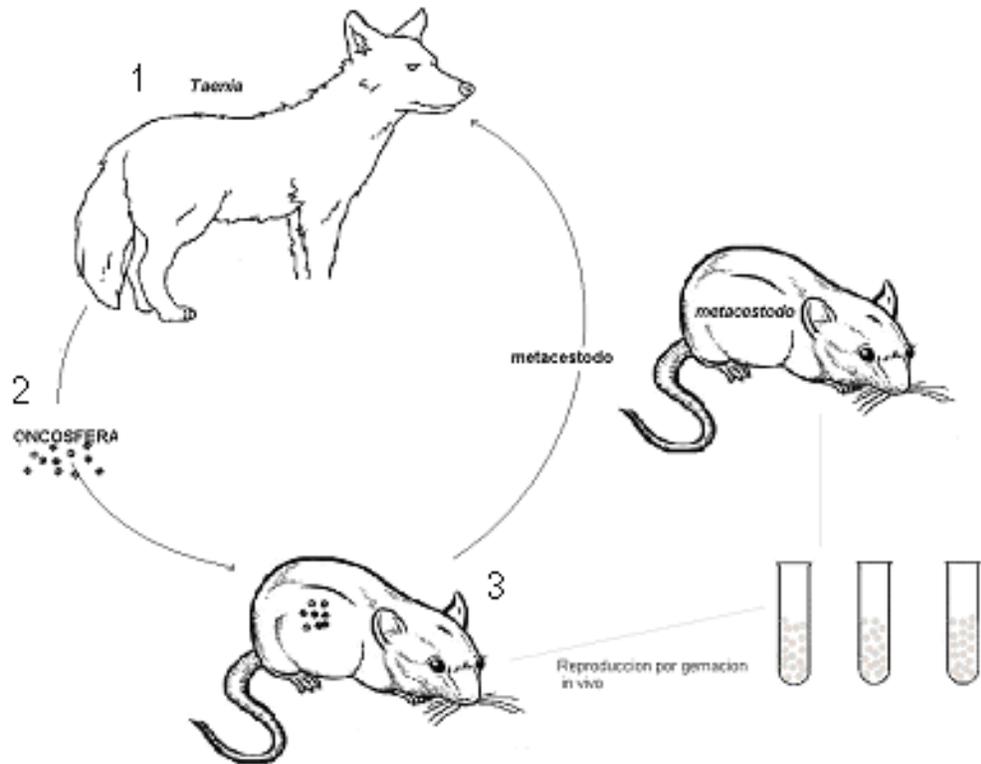


Fig. 1 Ciclo de vida de *T. crassiceps*. El parásito alterna entre el cánido como huésped definitivo y el roedor como principal huésped intermediario. (1) En su estado adulto habita el intestino del cánido, infección conocida como teniasis. La tenia produce miles de huevos que se expulsan en las excretas. El roedor se infecta al ingerir heces donde hay huevos (2). Cada huevo tiene el potencial para convertirse en cisticerco, ocasionando cisticercosis murina (3). El ciclo se completa cuando el cánido ingiere al roedor con cisticercosis. Debido a la capacidad de reproducción asexual de los cisticercos de este cestodo, en el laboratorio se llegan a obtener enormes cantidades de ellos, de ratones Balb/c. Freeman 1962.

Evasión inmune

Dentro de la parasitología se han documentado diversos mecanismos de evasión inmune que dan como resultado que el parásito sea capaz de sobrevivir dentro de su hospedero por periodos largos. 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. Por lo tanto en este trabajo se explicara la manera en que los cisticercos logran evitar la respuesta inmune, se ha postulado el empleo de diversos mecanismos de evasión inmune. Particularmente, los mecanismos encargados de bloquear el daño oxidativo o estrés oxidativo, originado por las células inflamatorias (12)

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre las moléculas con alto potencial oxidante derivadas del oxígeno, especies reactivas de oxígeno (EROs) y los sistemas antioxidantes (13).

Una consecuencia por activar a las células inflamatorias con antígenos es que éstas desarrollen el “estallido respiratorio” (ER). El ER, consiste en un consumo elevado de oxígeno por parte de la célula y que utiliza para ocasionar estrés oxidativo por medio de las especies reactivas de oxígeno (14). Estas moléculas, provenientes del oxígeno presentan uno o más electrones sin aparear, siendo altamente reactivas dada su afinidad al aparearse con los electrones de los átomos de otras moléculas. Los 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 (15).

Los organismos han desarrollado sistemas enzimáticos y no enzimáticos de protección del daño producido por las especies reactivas de oxígeno (16). 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, y se puede 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 α -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 efectuada, este se refiere al daño en el DNA ocurrido como una variedad de productos de la oxidación de fosfolípidos, proteínas y otros compuestos (17).

Los sistemas enzimáticos están conformados por una serie de enzimas antioxidantes esenciales en los parásitos para defenderse contra los EROs generados por macrófagos neutrófilos y eosinófilos del hospedero (18).

Las principales familias de enzimas antioxidantes son las catalasas (CATs), las glutatión peroxidasas (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^-) a H_2O_2 y oxígeno (19).

Glutatión S-transferasa (GSTs)

Características bioquímicas de la Glutatión-S-transferasa (GST)

Las GSTs fueron primeramente purificadas por su capacidad para unir compuestos lipofílicos como las bilirrubinas. La similitud de estas proteínas de

unión llamadas ligandinas, con formas de glutatión transferasas fue reconocida poco tiempo después. (3)

Clasificación DE LAS GSTs

La existencia de múltiples formas (isoformas) de GST fue descubierta en los años sesenta en Inglaterra por Eric Boyland y colaboradores (Habig *et al.*, 1974). Un criterio que se tomó en ese entonces para clasificarlas, fue su especificidad por el sustrato. Sin embargo, una vez purificadas diferentes isoenzimas se vio que su especificidad por el sustrato se compartía entre ellas. Por ello su clasificación actual considera además de su afinidad por el sustrato otros parámetros como: secuencia de aminoácidos, propiedades inmunológicas y papel fisiológico (3).

El nombre sistemático que refiere a las glutatión S-transferasas fue acordado por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular y su clave numérica es: EC 2.5.1.18. EL primer número indica que pertenece a la clase de las transferasas. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo químico funcional, entre un donante y un aceptor. El segundo número se refiere a la subclase de enzima que transfiere grupos alquil o aril, es decir distintos grupos metilo. El tercero y cuarto número representan las subclases que incluye únicamente a las transferasas.

Estructura de las GSTs.

Las GSTs son moléculas compuestas de subunidades. Las enzimas citosólicas están formadas por homodímeros o heterodímeros. Sus pesos moleculares varían de 25-28 kDa por subunidad. La estructura de las subunidades es variable entre estas enzimas, lo que ha permitido clasificarlas en clases. Hasta la fecha se conocen siete diferentes clases. Por ejemplo, la GST humana clase alfa homodímera, esta compuesta por dos copias de subunidades 1 y es conocida

como GST A1-1; la isoenzima heterodimérica de la misma clase compuesta de subunidades 1 y 2 es denominada GST A1-2.

Por otro lado, las enzimas GSTs microsomales (GSTm) son trímeros con pesos moleculares de aproximadamente 50 kDa. Cada subunidad de estas enzimas pesa alrededor de 17 kDa. Las GSTs se clasifican en siete familias (alpha, mu, pi, sigma, theta y zeta) que se diferencian por sus propiedades mencionadas anteriormente. (3,25, 26, 27,28)

La estructura tridimensional de las GSTs citoplásmicas ha sido determinada por el método de cristalografía de rayos X. Estas estructuras se pueden apreciar en la figura 2.

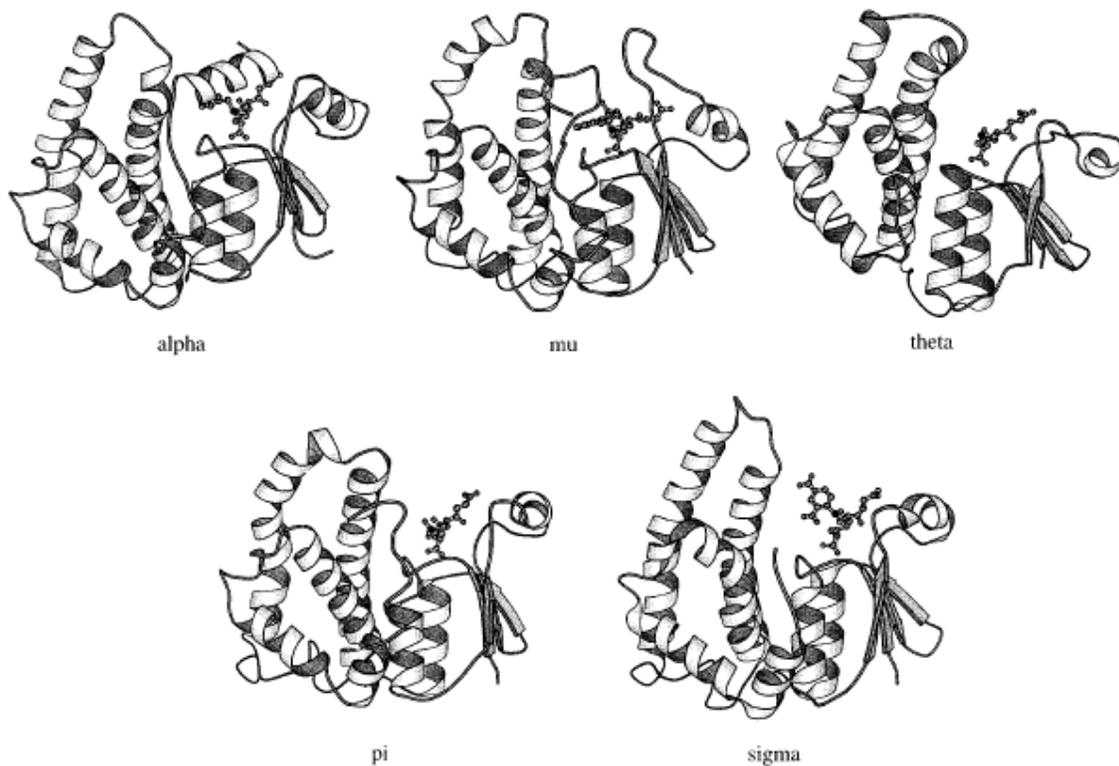


Fig.2. Se observan solo una cadena de diversas GSTs de mamíferos (alpha, mu, pi, sigma). Las GSTs que comparten cierta similitud con las plantas y los mamíferos son de la clase theta.

Mecanismo catalítico.

El común denominador en la reacción catalizada por las GSTs, es el ataque nucleofílico del átomo de sulfuro del glutatión sobre el segundo sustrato electrofílico (CDNB). Este ataque es facilitado por la ionización del GSH a su forma tiolato. El anión tiolato es estabilizado por un puente de hidrógeno del grupo hidroxilo fenólico de un residuo de tirosina en el sitio activo. Este residuo de tirosina cerca del sitio N-terminal es conservado entre las estructuras GST conocidas de las clases alfa Mu y Pi. En las enzimas de la clase alfa un puente de hidrógeno adicional es dado por un sitio activo del residuo de arginina.

Como la constante de disociación del complejo enzima-GSH es al menos de un orden de magnitud menor que la concentración intracelular de GSH, las enzimas deben estar casi saturadas con GSH en las células. La presencia de sustratos electrofílicos tóxicos activa a las GST, ya que estas enzimas permanecen inactivas en ausencia de este tipo de compuestos. Por lo tanto la enzima contribuye a la catálisis no solo activando el grupo tiol sino que también posicionando al tripéptido en una posición favorable con respecto al segundo sustrato. (3,)

La formación del conjugado de GSH con CDNB puede estar medido espectrofotométricamente. Este es el método más común para medir la actividad de las GSTs.

Método de purificación

La enzima se puede purificar por cromatografía de intercambio iónico, gel de filtración y por cromatografía de afinidad. Las matrices que se utilizan en estas últimas cromatografías pueden ser S-hexylglutatión-Sefarosa y glutatión-Sefarosa (Habig *et al.*, 1974).

También las diferentes GSTs pueden separarse por técnicas de alta resolución, como cromatofoco y enfoque isoeléctrico (Habig *et al.*, 1974).

Distribución en tejidos.

Las concentraciones de las isoenzimas de GSTs difieren dependiendo del tejido. Esto es debido a la variable distribución de los sustratos en los tejidos. La ausencia de isoenzimas particulares en las células puede predisponer a los tejidos a diferentes tóxicos químicos. Por ejemplo la ausencia de la clase Mu en la cual tiene gran actividad con epóxidos, el tejido es más susceptible a los efectos tóxicos por esta clase de compuestos. (29)

Función.

La aparición de sustratos para GSTs está ligado al metabolismo del oxígeno. Muchos grupos electrofílicos importantes de moléculas de sustrato, incluyendo epóxidos, alquenos activados y grupos hidroperóxidos, pueden surgir de procesos oxidativos de la célula. Los mecanismos de detoxificación tienen que ser muy generales para que las células puedan lidiar con las miles de moléculas tóxicas que se pueden derivar de compuestos endógenos y exógenos como el citocromo P-450. (3)

Por lo tanto entre las funciones de las GSTs, está la capacidad de detoxificar al organismo de sustancias endógenas, originadas por la respuesta inflamatoria y compuestos xenobióticos, como antihelmínticos. También participan en el metabolismo de los eicosanoides, por ejemplo, el leucotrieno C₄, el cual es formado por la acción de la glutatión *S*-transferasa microsomal. Este leucotrieno tiene amplias funciones proinflamatorias y espasmogénicas. También la enzima es capaz de conjugarse con GSH a la prostaglandina J₂ (PGJ₂) y conferirle de esta forma la propiedad de inhibir la proliferación celular. (3,20)

Función de ligandina

Las GSTs fueron originalmente denominadas ligandinas por su capacidad de unirse a los ácidos biliares (21). Los ligandinas fueron descubiertos al azar entre 1967 y 1969. Pero la designación de ligandina fue aceptada hasta 1971.

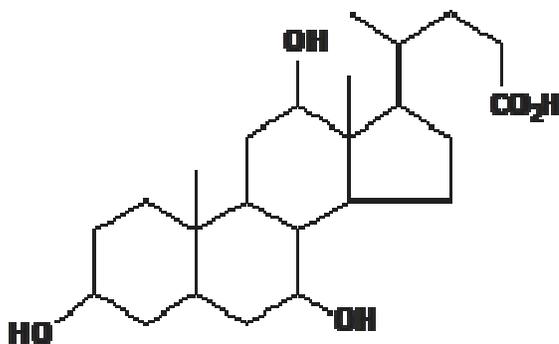
Ácidos biliares

Son ácidos derivados estructurales del ácido cólico, de 24 átomos de C, que se caracteriza por tener en el C17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono.

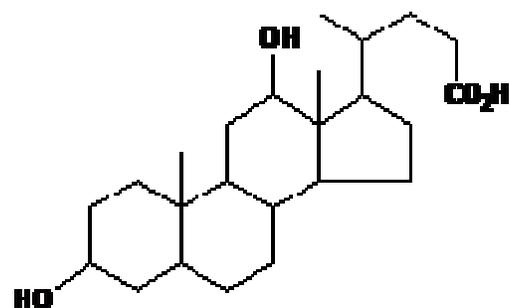
Emulsionan las grasas y facilitan la acción de la lipasa. Son necesarios para la absorción de las vitaminas liposolubles. Tienen una acción catártica suave, mejoran el drenaje biliar y evitan la presencia de infecciones, ayudan al transporte de agua y electrolitos. En exceso pueden dañar a las células por procesos de oxido reducción.

Los ácidos biliares se clasifican en primarios y secundarios.

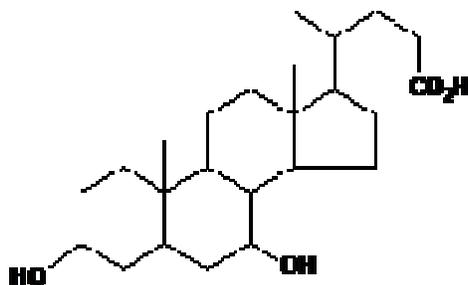
Los primarios son el ácido cólico, el ácido quenodeoxicólico, los cuales son sintetizados a partir del colesterol; los secundarios son el ácido desoxicólico y el ácido litocólico, los cuales se forman en el colon por acción bacteriana sobre ácidos biliares primarios.



ácido cólico

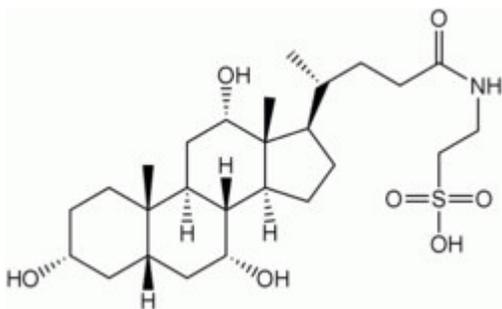


ácido desoxicólico

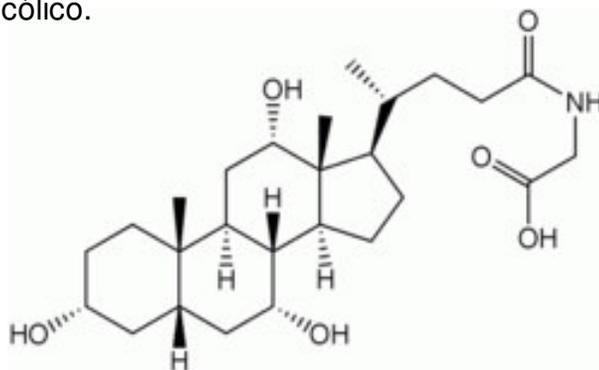


ácido quenodesoxicólico

Los ácidos biliares primarios se combinan con la glicina y la taurina y forman los ácidos biliares conjugados. Glucocólico y taurocólico.



ácido taurocólico



ácido glucocólico

Bilirrubina

Es un pigmento biliar de color amarillo anaranjado que resulta de la degradación de la hemoglobina. Se forma cuando el eritrocito sufre lisis celular es decir su membrana celular se rompe y la hemoglobina liberada es fagocitada por los macrófagos tisulares del organismo, sobre todo los macrófagos del bazo, hígado y médula ósea. En esta degradación de la hemoglobina, se separan, por un lado, la molécula de globina 10 y, por otro, el grupo hemo.

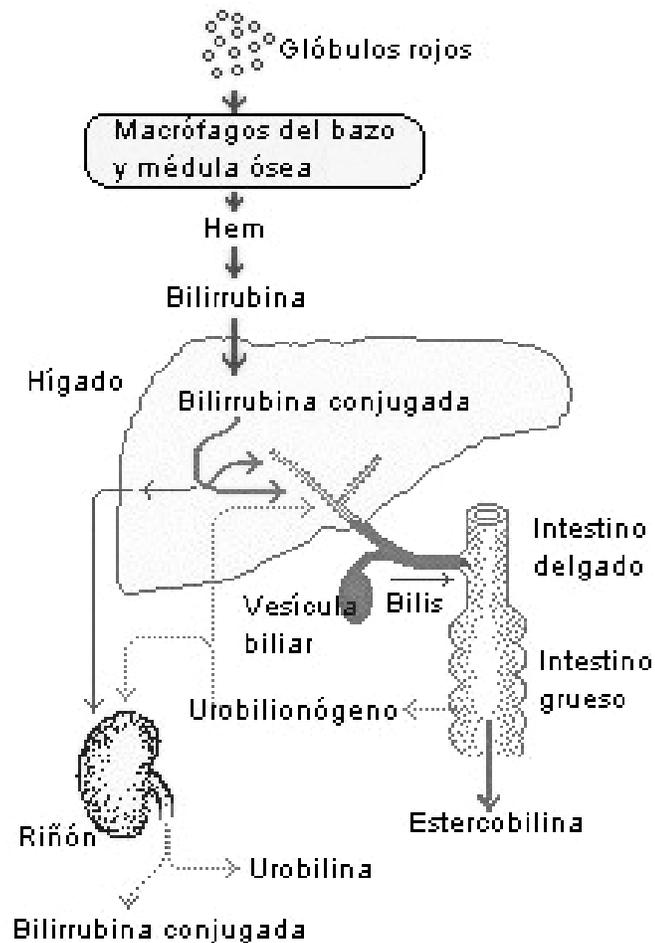
La hemo-oxigenasa degrada el grupo hemo en los macrófagos, abriendo el anillo tetrapirrólico en una molécula lineal, y dando como resultado hierro libre (Se oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+}), y una cadena de 4 anillos pirrólicos, la que será el sustrato de formación de la bilirrubina. Durante las horas o los días siguientes los macrófagos

liberan el hierro de la hemoglobina que será transportado por la transferrina hasta la médula ósea (para formar nuevos hematíes), o almacenado en el hígado y otros tejidos en forma de ferritina para situaciones de necesidad.

La bilirrubina no conjugada es captada por los hepatocitos intrahepáticamente se asocia a la Glutación S-transferasa y es conjugada con dos moléculas de ácido glucorónico, para dar lugar al di-glucoronato de bilirrubina y transportada a la luz del canalículo biliar a través de transportadores situadas en la membrana canicular del hepatocito.

Dado que la bilirrubina libre es muy insoluble en agua requiere ser modificada con el fin de facilitar su eliminación del organismo. Por lo tanto se conjuga con dos moléculas de ácido glucorónico. Esta bilirrubina conjugada ya es soluble y recibe el nombre de bilirrubina directa.

La bilirrubina conjugada se elimina por bilis y pasa al intestino en donde es degradada por las bacterias intestinales a urobilinógeno, que en parte se oxida a urobilina. Estos dos últimos no son absorbidos sino que se convierten en estercobilina, pigmento que confiere a las heces su color característico.



Hematina

Se encuentra en el cuerpo en condiciones patológicas. Usado en el tratamiento de Pórfiria hepática que es debida por una sobreproducción y acumulación de las porfirinas, después de la intoxicación por fosgeno, en anemia perniciosa, etc.

La hematina es un pigmento cristalino, marrón oscuro o negro, de localización extracelular. Está formado por la oxidación del grupo hemo del estado ferroso al estado férrico.

El sitio de unión de las sustancias químicas tóxicas no es necesariamente el sitio catalítico de la enzima, aunque el ligando estudiado se puede unir al sitio catalítico causando una inhibición de la enzima.

Las ligandinas se encuentran asociadas a múltiples funciones, como en la intervención de procesos de carcinogénesis, mutagenicidad, también participan en funciones de tipo cinético, es decir no solo tiene papel de conjugar con glutatión sino también de isomerización, participa en la síntesis del producto del ácido araquidónico, detoxifica al cuerpo de desechos exógenos (medicamentos, sustancias químicas) y endógenos (bilirrubinas), conjugando los tóxicos y participando en su eliminación del organismo. Por lo tanto son inducidas por medicamentos y químicos.

Enzimología

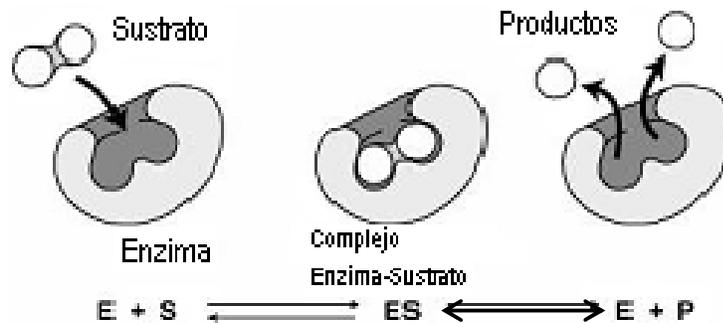
Cinética enzimática

La cinética enzimática permite conocer diversas características catalíticas 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 (22). También informan 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 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 (23).

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_o) 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

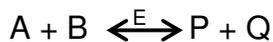
proporcional a la concentración de sustrato hasta alcanzar un estado de saturación.

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.



Esquema de las reacciones llevadas a cabo por la enzima de acuerdo a Michaelis-Menten (Voet D. 1999)

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 K_m y V_{max} es semejante al sistema utilizado en las reacciones con un solo sustrato, manteniendo uno de los sustratos a concentración constante y saturante (B), mientras que el otro (A) se emplea a concentraciones variables. Esto permite determinar el efecto del sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción y obtener así la constante de Michaelis-Menten 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 (36).

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 (36).

Estudios de inhibición

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 (36,37).

Existen diferentes tipos de inhibición:

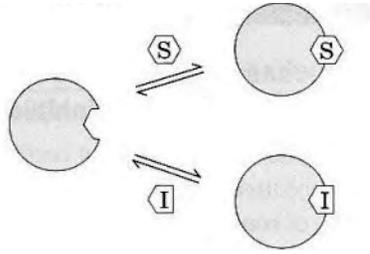
Inhibición irreversible.

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

Inhibición reversible.

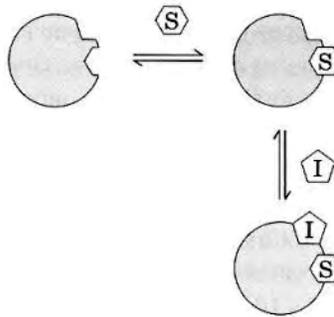
La unión del inhibidor con la enzima es reversible, al quitar el inhibidor del medio se recupera la actividad. Los tipos de inhibición de esta clase son:

Competitiva, cuando el inhibidor se une en el sitio activo de la enzima, de tal manera que compite con el sustrato por el mismo sitio (36, 37).



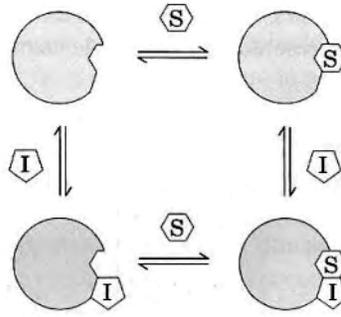
Inhibición acompetitiva.

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 $ES + I = ESI$, disminuyendo la velocidad de reacción. El inhibidor no se une al sitio activo sino a cualquier otro sitio, lo que hace que cambie la conformación y la enzima ya no sea tan efectiva (36,37).



Inhibición no competitiva.

Los inhibidores no competitivos se unen en un lugar de la 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 (36,37)



Estudios de fluorescencia

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad. Sin embargo es poco usado, debido a que se tiene un número limitado de sistemas químicos que pueden fluorescer (fluoróforos) (38).

Existen tres tipos de fluoróforos en las proteínas: intrínsecos, coenzimas y extrínsecos.

Los fluoróforos intrínsecos son los compuestos aromáticos, como la fenilalanina, tirosina y los residuos de triptofano (Fig.3).

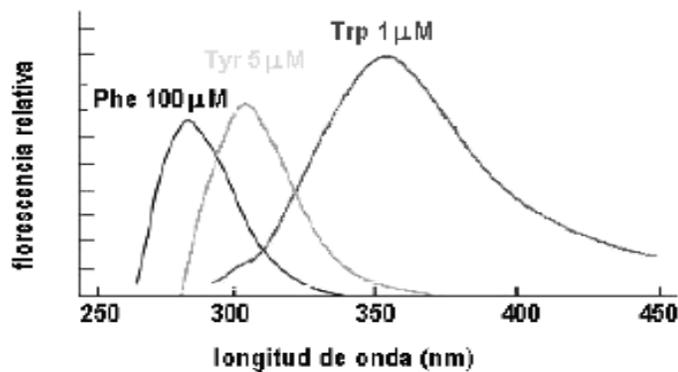


Fig.3. Espectros de fluorescencia de los aminoácidos aromáticos (M. Medina 1999)

Una pequeña cantidad de proteínas también cuentan con coenzimas fluorescentes como la nicotinamida adenin dinucleotido reducido (NADH), flavina adenin dinucleotido (FAD) y el fosfato piridoxal (PLP). Estudios de estos fluoróforos intrínsecos y coenzimas han proporcionado información importante sobre la estructura e interacción de un número de proteínas (38).

Sin embargo no todas las proteínas tienen fluoróforos en su estructura. Por lo tanto se utilizan fluoróforos extrínsecos que se insertan en la proteína. Para ello se requiere que se unan covalentemente a un solo sitio de la proteína (Fig.4).

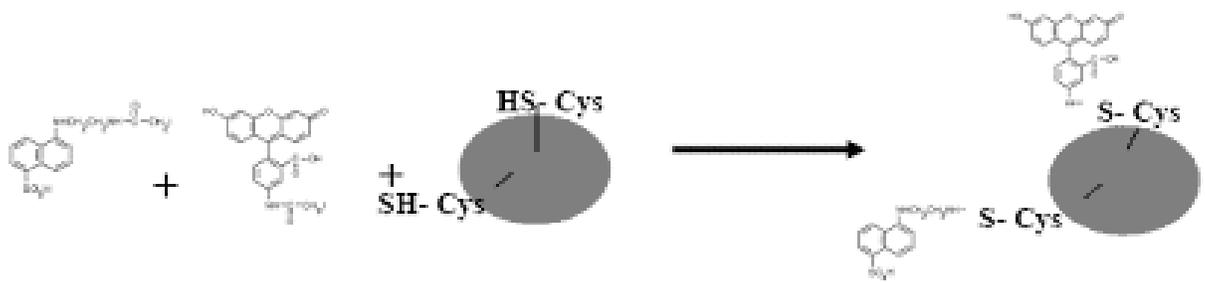


Fig.4. Unión de un fluoróforo extrínseco de forma covalente

Dentro de la fluorescencia se llevan a cabo dos procesos:

- a) *Excitación*: proceso en el cual a un sistema en estado fundamental, se le aplica una magnitud suficiente de energía, ésta puede ser absorbida por el sistema, pasando a un estado mayor de energía.
- b) *Emisión*: Los estados excitados son inestables, y el átomo tiende a volver a su estado fundamental, para lo cual se producen saltos de electrones desde los niveles más externos hacia los más internos, para ocupar los huecos producidos. En este proceso se produce desprendimiento de energía en forma de radiación.

Los procesos mencionados anteriormente pueden estar influenciados por varios factores que son

Estructura: La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación (38).

La sustitución en un anillo aromático causa desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima y los cambios correspondientes en los picos de fluorescencia

Rigidez estructural: Empíricamente se encuentra que la fluorescencia está particularmente favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas.

La influencia de la rigidez también tiene importancia en el aumento de la fluorescencia de ciertos quelantes orgánicos cuando están formando un complejo con un ion metálico (38).

Temperatura y disolvente: La eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de la temperatura, ya que el aumento de la frecuencia de las colisiones a temperatura elevada hace aumentar la probabilidad de desactivación no radiante (conversión externa).

Una disminución en la viscosidad del disolvente también aumenta la probabilidad de conversión externa y produce el mismo resultado (38).

Efecto del pH: La fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son probablemente diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Por lo tanto será muy frecuente en los métodos fluorimétricos el control estricto del pH.

Rendimiento cuántico: El rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es simplemente la relación entre el número de moléculas que emiten

fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. Las moléculas altamente fluorescentes, por ejemplo, la fluoresceína, tienen eficiencias cuánticas que, en ciertas condiciones, se aproximan a la unidad. Las especies no fluorescentes tienen eficiencias que son prácticamente cero.

La fluorescencia se puede desactivar (quenching) porque la molécula interactúe con otras moléculas en la disolución en la que se encuentre, por lo tanto se puede producir la pérdida de la emisión fluorescente (38).

El grado de polaridad de las proteínas puede ser determinada por las características de la emisión, ya que las proteínas en un ambiente muy polar exhiben una débil emisión verde, mientras que en un ambiente no polar muestran una intensa fluorescencia azul (38).

Como se puede ver el uso de la espectroscopia de fluorescencia es de gran apoyo en mediciones analíticas y en la investigación científica, para estudiar procesos físicos fundamentales de moléculas; como la relación estructura-función e interacciones de biomoléculas como proteínas, debido a su elevada sensibilidad y especificidad.

En este trabajo se realizaron estudios de inhibición de la intensidad de fluorescencia en las GSTs para conocer su función de ligandina, ya que se puede observar si hay un cambio conformacional y como es ese tipo de cambio.

Hipótesis

La GST de los cisticercos de *Taenia crassiceps* es capaz de unir diversos ligandos en forma no catalítica.

Objetivos

- Purificar por procedimientos bioquímicos a la enzima glutatión S-transferasa de cisticercos de *T. crassiceps* (GST*Tc*)
- Caracterizar aspectos bioquímicos de la GST*Tc*
- Demostrar la capacidad de la GST*Tc* de poder unir diversos ligandos de manera no catalítica.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Purificación de la enzima

Mantenimiento y obtención de los parásitos de *T. crassiceps*

Cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa HYG se obtuvieron de ratones (*Mus musculus*) infectados artificialmente con este parásito.

Ratones hembras y machos de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, se emplearon para mantener la cepa de *T. crassiceps* en el laboratorio. A los roedores se les brindó agua y alimento (Rodent Lab Chow* 5001) a libre acceso. La cama que se utilizó fue de viruta de madera, cambiándola cada tercer día.

Para mantener y usar a la cepa de *T. crassiceps* se aprovechó su capacidad reproductora asexual que se lleva a cabo en el peritoneo de ratones. Esto se realizó mediante infecciones intraperitoneales con cisticercos a 20 ratones sanos Balb/c cada mes. A cada ratón se le inyectó 20 parásitos (0.5ml) de cisticercos con una jeringa de tuberculina y aguja de 20x25mm. Al paso de un mes, a los ratones infectados se le diseccionó el abdomen y se extrajeron cientos de parásitos. Los cisticercos se lavaron con amortiguador de fosfatos 0.01M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (PBS), se eliminaron los parásitos calcificados y restos del hospedero. Posteriormente, los cisticercos se almacenaron a -70° C hasta su uso.

Obtención del extracto crudo del metacestodo (ECM)

Se homogeneizaron cincuenta gramos de cisticercos en 10 ml de PBS con un triturador de tejidos de la marca Polytron (Brinkman Instruments) y una cuchilla de 1.5 cm de diámetro. Los parásitos se mantuvieron en hielo durante este procedimiento que consistió en triturarlos con pulsos de 15,000 rpm por minuto y descansos de otro minuto. Esta operación se repitió entre cuatro y cinco veces hasta quedar perfectamente homogeneizados. El extracto se agitó suavemente durante una hora a 4° C, después se centrifugo a 1,250 g / 30 min / 4° C. el precipitado se descarto y el sobrenadante se recupero y filtro para continuar con el proceso de purificación, esta última fracción se denomino Sn1.

Precipitación con sulfato de amonio

A un determinado volumen del Sn1 se le adicionó suficiente sulfato de amonio (SA) en polvo hasta alcanzar éste una concentración del 30% en la solución. La adición del SA a la solución proteica fue manteniendo la mezcla en agitación lenta y en frío durante una hora. Posteriormente, la solución proteica precipitada al 30% con SA se centrifugo a 10,000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en PBS (pp. SA30%) para su análisis y al sobrenadante (Sn SA30%) se le añadió más SA en polvo hasta alcanzar una concentración del 70%. La forma de adicionarle el SA al Sn SA30% fue similar a la descrita con anterioridad, al término de este procedimiento se obtuvo la solución proteica Sn SA70%. A continuación el Sn SA70% se centrifugó de forma similar a la descrita anteriormente. El precipitado obtenido (pp. SA70%) se resuspendió en PBS y el sobrenadante se desechó.

El pp SA 70% se dializó durante 24 horas a 4° C con 2L de PBS pH 7.2 con 2 cambios del mismo amortiguador para utilizarse en el siguiente paso de purificación.

Obtención de la fracción de GST Tc

Cromatografía en Sefarosa-GSH

El pp SA 70% se hizo pasar por una columna de Sefarosa-glutación (3 X 30 cm.) (Pharmacia Biochem) equilibrada en PBS pH 7.2. La velocidad del flujo se estableció en 100 ml / h y se colectaron fracciones de 2 ml. Las proteínas que no se absorbieron a la resina se lavaron de la columna con suficiente cantidad de PBS. Posteriormente las GSTs fueron eluidas de la resina con una solución 5 mM de glutatión reducido (GSH) en Tris-HCl 50mM pH 8, y se volvió a pasar PBS pH 7.2; el eluido es la SG-GST Tc . El desempeño cromatográfico de las proteínas se registraron espectrofotométricamente, a 280 nm.

Detección de las fracciones cromatográficas con actividad para GST.

Para ello se realizó un ensayo específico para determinar la actividad enzimática de la GST (8). La prueba utilizó un amortiguador de ensayo (GSH 5 mM, K₂HPO₄ 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6.5) y al sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB), componentes necesarios para que se lleve a cabo la reacción. Al término de la misma se registró el cambio de absorbancia en función del tiempo usando un espectrofotómetro (Pharmacia Biotch modelo Ultrospec 3100 Pro) ajustando la longitud de onda a 340 nm. Los tubos en los que la absorbancia fue mayor al valor del control se consideró que contenían a la enzima.

Concentración de las fracciones de SG-GST Tc :

Una vez determinadas las fracciones cromatográficas con actividad enzimática, se reunieron y se concentraron en un sistema (Amicon) de filtración con presión negativa (nitrógeno gaseoso) a 4^o C. La SG-GST Tc concentrada se guardó en alícuotas a -20°C para su ulterior análisis.

Cromatoenfoco en PBE

Posteriormente, la fracción SG-GST T_c se dializó exhaustivamente contra imidazole-HCL, 0.025 M (pH 7.35). La SG-GST T_c dializada se cromatografió en una columna intercambiadora de iones denominada polybuffer exchanger 94 (PBE) (Pharmacia Biotech), (1 X 18 cm) y equilibrada con el mismo amortiguador de la muestra. Para eluir a las proteínas del PBE se hizo pasar una solución amortiguadora (Polybuffer 74) diluida 1:16 en agua desionizada y se ajustó el pH a 4.0. La muestra se corrió a un flujo de 20 ml / h, se colectaron fracciones de 1 ml, y se les evaluó su pH. Las fracciones contenidas en un rango de una unidad de pH se juntaron y dializaron contra PBS pH 7.2. Subsiguientemente se determinó su actividad enzimática de GST y correlacionó con el valor de pH. La enzima purificada obtenida en este último paso de purificación se denominó GST T_c .

Determinación del peso molecular nativo de la GST T_c por cromatografía de filtración.

Para determinar el peso molecular nativo de la enzima, se utilizó una alícuota del extracto crudo de *T. crassiceps* de 30 mg en 1 ml de PBS (pH 7.2). Esta alícuota se corrió en una columna de filtración de Sefacril S-200 HR (0.9 cm. X 30 cm) equilibrada en el mismo amortiguador de la muestra.

Antes de correr esta cromatografía, la columna se calibró utilizando las siguientes proteínas de referencia de peso molecular: albúmina sérica bovina (66000 Da), ovoalbúmina (44000 Da), anhidrasa carbónica (31000 Da) y mioglobina (16900 Da), gamma-globulina (150000 Da), lisozima (13900 Da). Con estos datos se calculó el coeficiente de distribución (Kd) y se relacionó con las masas moleculares (Mr) tanto de los controles como el de la enzima. La gráfica de log Kd vs Mr de los valores de los pesos moleculares controles se utilizó para determinar, por extrapolación, el Mr de la enzima.

El peso molecular de las subunidades que conforman a la enzima se determinó obteniendo el valor de su movilidad relativa (Rf) en geles de poliacrilamida reductores al 15%.

Análisis electroforético en geles de poliacrilamida de las fracciones proteicas obtenidas en los diferentes pasos de purificación.

Se siguió la técnica de Laemlli (1970). Se prepararon geles de poliacrilamida utilizando el sistema Protean II (Bio-Rad). Cada gel rectangular se formó en un molde integrado de dos placas de vidrio de 9 X 7 cm y separadas por separadores de plástico de 0.75 mm dispuestos en sus extremos mas alejados en forma vertical. El molde se selló herméticamente excepto en su parte superior. Por este sitio, se vertió la mezcla de reactivos para formar gel separador con acrilamida al 15% y se dejó polimerizar. Posteriormente, sobre este gel se vertió la mezcla de reactivos para formar el gel concentrador con acrilamida al 10%, se colocó un molde de 10 canales en su superficie y se dejó polimerizar.

Para realizar la electroforesis se colocó el gel en la cámara electroforética, se le adicionó el amortiguador de corrida y se colocaron las muestras en los pozos. La electroforesis se corrió a 100 volts, 30 mAmp durante 90 minutos. Al finalizar la electroforesis se depositó el gel en un contenedor y se tiñó con azul de Commassie durante 30 min. Después se destiñó el gel del colorante, excepto donde se encontraban las proteínas, usando ácido acético al 10%.

Ensayo enzimático de la GST

Se realizó un ensayo específico para determinar la actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST) siguiendo el método de Habig y col (3).

La actividad enzimática de la GST se obtuvo por el método de Habig y col. (3) se determinó cada dos fracciones de la cromatografía de afinidad. En cada fracción se le agregó el amortiguador de ensayo (GSH 5 mM, K₂HPO₄ 100 mM, EDTA 1mM, pH 6.5) y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), componentes necesarios para que se lleve a cabo la reacción en caso de que existiese la enzima. Cada tubo se leyó en el espectrofotómetro (Pharmacia Biotch modelo Ultrospec 3100 Pro) a 340

nm, los tubos en los que la densidad óptica fue mayor al valor del control se consideró que contenían la enzima.

Una vez determinadas las fracciones con actividad enzimática, se reunieron en un conjunto, y se concentraron por ultrafiltración con presión negativa (nitrógeno gaseoso en concentradores Amicon) a 4^o C, llevando el volumen inicial a un volumen de 1-2 ml, lo obtenido es la GSTTc, la cual se guardó en alícuotas para su posterior análisis.

Determinación de la especificidad por sustratos de la GSTTc.

Las diversas condiciones experimentales se describen en el cuadro 1. Brevemente, las reacciones catalíticas se monitorearon empleando un espectrofotómetro Ultrospect 3100 Pro (Pharmacia Biochem). En un tubo de ensayo 0.3 µg de la enzima parasitaria se mezcló en amortiguador de ensayo (K₂HPO₄ 100 mM, EDTA 1 mM, GSH 5 mM) a pH 6.5. La concentración de GSH fue de 5 mM, excepto en los ensayos que emplearon trans-non-2-enal, ácido etacrínico y hexa-2,4-dienal, que fue de 2.5 mM. Las reacciones enzimáticas siempre se iniciaron, al adicionar al tubo de ensayo 1-cloro-2,4-dinitrobenzenueno (CDNB) (7 mM) en etanol al 96%, al menos que otro sustrato fuese el evaluado. El volumen de reacción se mantuvo siempre en 1 ml; la concentración final del etanol fue menor al 1%. Todas las velocidades de reacción se registraron a la longitud de onda elegida y hasta 3 minutos después de su inicio. Una mezcla de ensayo conteniendo todos los reactivos, excepto la enzima, se empleó como control negativo; los valores resultantes de este control fueron restados de los valores experimentales. El control positivo consistió en emplear 5 µg de GST de hígado de conejo (Sigma) por ensayo. Se realizaron duplicados o triplicados de cada ensayo enzimático, con el valor promedio de ellos se construyeron diversas gráficas. Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µ mol de producto por minuto bajo las condiciones del ensayo descritas. La actividad específica se define como la unidad de actividad

enzimática por mg de proteína, ésta última determinada por el método de Lowry (10).

Cuadro 1.

Sustrato	[Sustrato] mM	pH	λ (nm)	$\Delta\xi$ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Disolvente
1 – cloro -2,4 – dinitrobenceno	1.0	6.5	340	9.6	Etanol 96%
1,2 – dicloro – 4- nitrobenceno *	1.0	6.5	345	8.5	Etanol 70%
Bromosulfaleína	0.03	7.5	330	4.5	H ₂ O
Ácido etacrínico	0.2	6.5	270	5.0	Etanol 50%
1,2–epoxy–3 (p- nitrofenoxi) propano	5.0	6.5	360	0.5	CHCl ₃
Hexa-2,4-dienal	0.025	6.5	280	34.2	H ₂ O
4 – nitrobenzil clorido	1.0	6.5	310	1.9	H ₂ O
Trans-4– fenil – 3– butano – 2 – one	0.05	6.5	290	24.8	H ₂ O

Determinación del pH óptimo y de equilibrio

Para determinar el pH óptimo de reacción de la GSTTc se realizaron ensayos enzimáticos empleando al CDNB como sustrato y diversos amortiguadores de ensayo a diferentes pHs que se encuentran descritos en el cuadro 2.

Para evaluar la estabilidad de la enzima en función del pH se utilizaron varias alícuotas de la misma y se dejaron dializando cada una con uno de los distintos amortiguadores con pHs diferentes. Se dializó durante 14 hrs. Después se prosiguieron a hacer los ensayos enzimáticos para obtener las velocidades de reacción.

Cuadro 2. Rango de pH de los amortiguadores utilizados.

Amortiguador	pH
tris(hidroximetilaminometano)-HCL 50mM	9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0
fosfato de sodio 50mM	6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5
citrato de sodio-ácido cítrico 50mM	3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5

Estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas

La estabilidad de la GSTTc a diferentes temperaturas se analizó utilizando alícuotas de la enzima, las cuales fueron incubadas cada una durante cinco minutos en el amortiguador de ensayo al cual estaba ajustado a una temperatura específica. El intervalo de temperatura empleado fue de 5 - 80 °C con intervalos de 5°C. Después de la incubación se adicionó el CDNB, y durante los siguientes 3 minutos, a temperatura ambiente, se registró el cambio de absorbancia a 340 nm.

Determinación de los parámetros cinéticos GSTTc

Km, Vmax de la GST para sus sustratos más comunes:

Se realizaron diversos ensayos enzimáticos tomando en cuenta la velocidad inicial catalítica de la fracción de GSTTc en presencia de CDNB, el cual fue variando su concentración (Cuadro 3) y fueron evaluados en el espectrofotómetro a 340 nm.

Para determinar las constantes de Km. Y Vmax para GSH, se realizaron ensayos similares variando la concentración de GSH (Cuadro 3).

Para obtener 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 Km / Vmax el intercepto de la recta en la ordenada es la 1 / Vmax y el intercepto de la recta en la abscisa es la -1 / Km.

Cuadro 3.

Sustrato	Concentración (mM)
1-cloro-2,4- dinitrobenceno (CDNB) (GSH 5mM constante)	0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Glutati3n reducido (GSH) (CDNB 2mM constante)	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10

Determinaci3n de los par3metros de inhibici3n (I_{50} , tipo y constantes inhibitorias) de diversos compuestos

Se elaboraron ensayos de inhibici3n para establecer los valores de la dosis I_{50} de la bromosulfale3na (BST) y hematina sobre la enzima parasitaria.

La inhibici3n enzim3tica de la GST se determin3 agregando el amortiguador de ensayo, el reactivo inhibidor a diferentes concentraciones y 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) a una concentraci3n variable, ver cuadro 4. Cada ensayo se ley3 en el espectrof3tmetro a 340 nm, durante 3 minutos. Los ensayos en los que la densidad 3ptica fue menor al valor del control se consider3 que se hab3a logrado el 100% de inhibici3n.

Los datos generados en el espectrof3tmetro del ensayo a 340 nm, permiti3 construir una recta en un sistema de Lineweaver – Burk, donde se grafic3 el inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentraci3n del CDNB, de tal forma que la recta representa el inverso de la velocidad inicial de la GST T_c para la concentraci3n de 0.005 mM de BTS. Se construy3 otra recta de este tipo para la BTS pero con la concentraci3n de 0.01 mM, otro a una concentraci3n de BTS de 0.015 mM y otra m3s en ausencia de inhibidor.

Para conocer el tipo de inhibici3n que ejerci3 la hematina sobre la GST T_c , se repiti3 todo el procedimiento anterior, pero empleando las concentraciones de 0.25 y 0.75 mM, y las de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 mM para el CDNB.

El comportamiento de las rectas, por el patr3n de intersecci3n tanto en el eje de las ordenadas como en el de las abscisas, defini3 el tipo de inhibici3n.

Cuadro 4.

inhibidor	Concentración	[CDNB] mM
BST (mM)	0.005, 0.01, 0.015	0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5
Hematina (μ M)	0.25, 0.75	

Inhibición de la fluorescencia intrínseca de la GST Tc.

La bromosulfaleína fue preparada en fresco, disuelta en PBS 1x pH 7.2. La hematina se disolvió en NH_4OH 0.1M. Ambas soluciones fueron protegidas de la luz hasta su uso. El líquido vesicular se utilizó en fresco, y se mantuvo a una temperatura de 4°C durante su uso.

La inhibición de la fluorescencia intrínseca de la GST se determinó agregando la enzima y el inhibidor a diferentes concentraciones en PBS 1x en la celda de ensayo de 3ml (ver cuadro 5). Por último se añadió 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) para comenzar la reacción. Cada ensayo se leyó en el espectrómetro de luminiscencia LS 45 (Perkin Elmer). Como control positivo se utilizó una mezcla de ensayo conteniendo solo a la enzima y el CDNB disueltos en el PBS 1x pH 7.2, En el caso de las porfirinas del cestodo *T. solium* (líquido vesicular), los ensayos se realizaron midiendo la inhibición de la intensidad de la fluorescencia de las porfirinas por medio de la GST Tc, en las mismas condiciones que con los otros ensayos.

La unión del inhibidor con la enzima se determinó mediante la disminución de la intensidad de fluorescencia

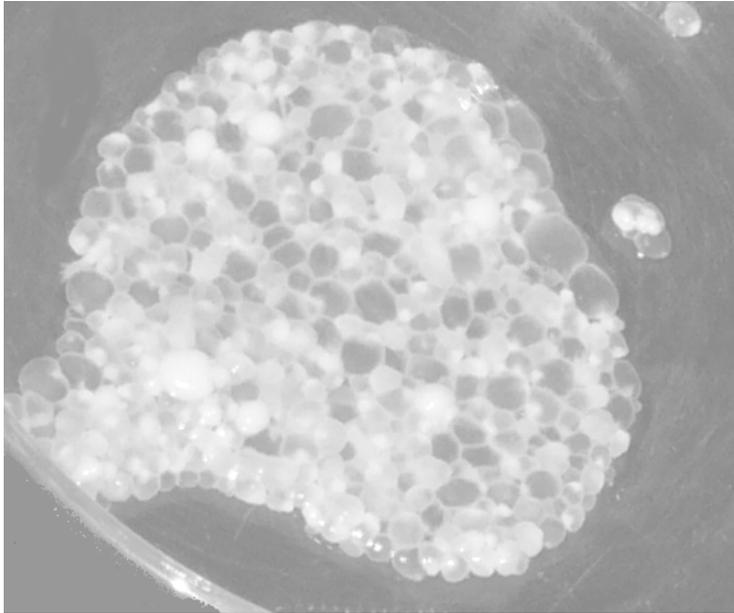
Cuadro 5.

inhibidor	Concentración	λ Excitación (nm)	λ Emisión (nm)
BST (μ M)	3, 15, 30, 45	280	300-470
Hematina (μ M)	0.01, 0.1, 0.3	280	300-470
GST Tc (μ g)	0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 2.4	390	590-650

RESULTADOS

Obtención de los cisticercos

En total se obtuvieron cisticercos de 77 ratones. Todos los parásitos mostraron la misma apariencia bajo observaciones macroscópicas.



Precipitación con sulfato de amonio

Al observar los resultados de la precipitación (Fig. 5) se puede observar que en términos generales se obtiene muy poca purificación, mas bien lo que la técnica nos permite es concentrar la muestra en un volumen más pequeño para posteriormente pasarlo por una cromatografía de afinidad.

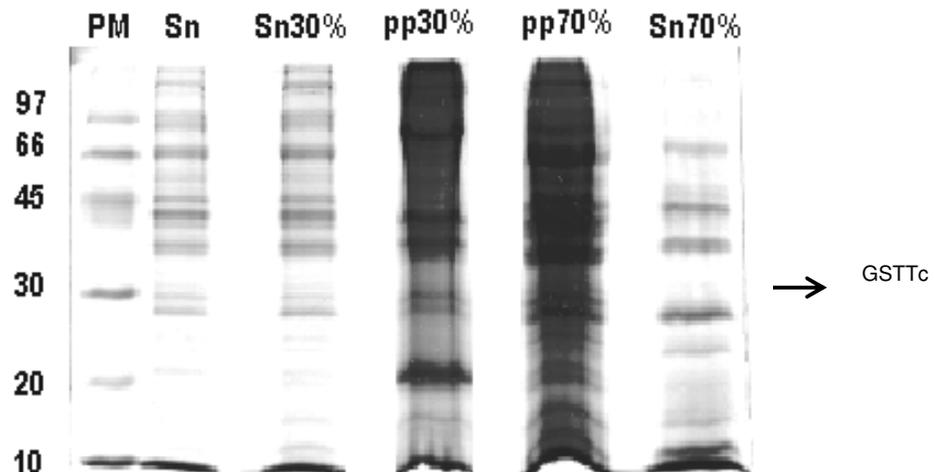


Fig.5. Análisis del homogeneizado a diferentes concentraciones con sulfato de amonio. PM) Peso molecular, Sn) sobrenadante, Sn30%) sobrenadante precipitado con el 30% de sulfato de amonio, pp30%) precipitado con sulfato de amonio al 30%, pp70%) precipitado con sulfato de amonio al 70%, Sn70%) sobrenadante precipitado con sulfato de amonio al 70%.

La GSTTc se logró purificar a homogeneidad por medio de una cromatografía de afinidad Sefarosa-GSH (Fig.6) y posteriormente en un sistema de cromatoenfoco PBE (Fig.7). Los resultados se resumen en el cuadro 6; la actividad de la enzima pura fue de 8.28 U / mg con un rendimiento del 2.27%

Cromatografía de afinidad y PBE

La figura 6 es una muestra de 31 cromatografías realizadas. En ella se observa los valores de absorbancia a 280 nm así como la actividad enzimática a 340 nm. El primer pico de proteínas corresponde a las excluidas que no interactuaron con la resina, el segundo pico corresponde a la fracción enriquecida con GSTs eluídas con una solución de glutatión reducido. El perfil cromatográfico de todas las columnas de este paso de purificación fue muy similar entre si. La gran cantidad de actividad enzimática para conjugar al GSH con el CDNB se obtuvo en las fracciones eluídas.

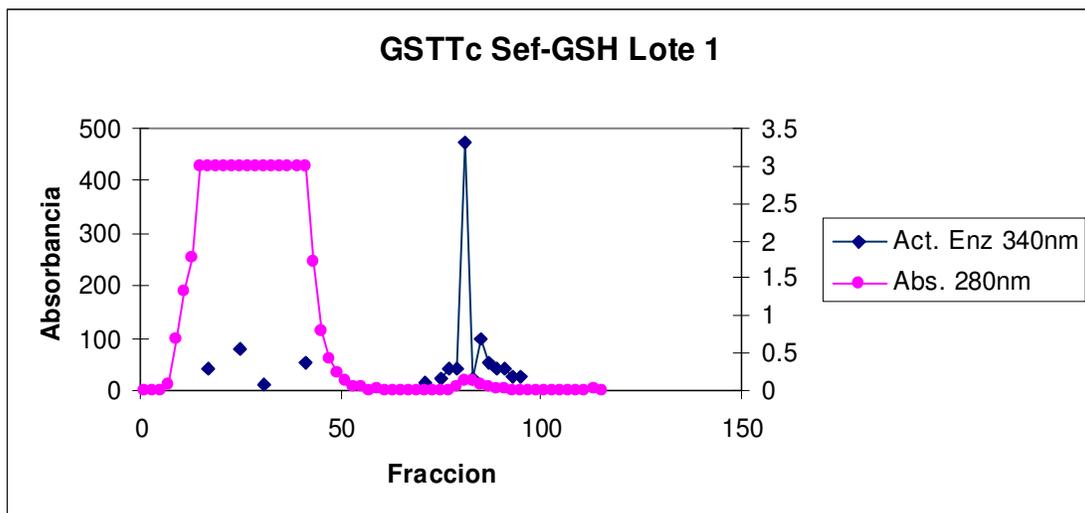


Fig. 6 Resultado de la cromatografía de un extracto crudo de cisticercos de *T. crassiceps* en Sefarosa-GSH. Proteína determinada a 280 nm y la actividad enzimática de la SG- GSTTc a 340 nm.

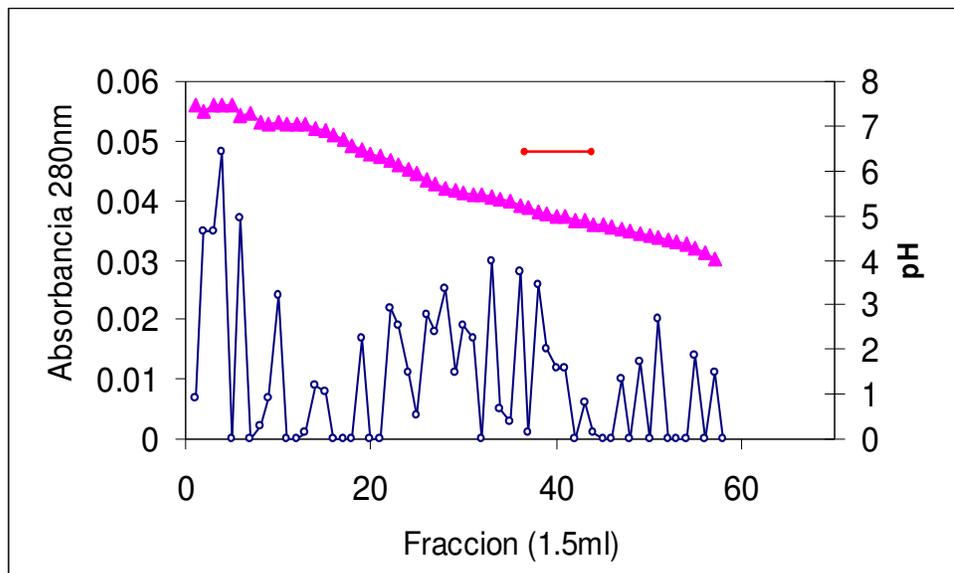


Fig. 7 Resultado del cromatoenfoco en PBE de la fracción eluída de Sef-GSTTc, absorbancia a 280 nm (○), pH (▲), actividad enzimática (●—●). La actividad específica de la enzima mostró un pI de 5-5.4

Cuadro 6. Resumen de la purificación.

Fracción	Volumen Total (ml).	Proteína total (mg).	Actividad específica ^a (U/mg)	Actividad total ^b (U)	Rendimiento (%)	Veces purificadas
Sn L17	48	141.12	2.58	364.59	100.00	1
Sn SA30%	46	50.6	1.51	76.26	20.92	1
Sn SA70%	47	12.22	2.34	28.60	7.84	2
pp SA30%	4	27.8	0.09	2.53	0.69	0
Pp SA70%	13	139.62	1.82	254.25	69.74	1
GST	1	0.04	206.96	8.28	2.27	80

- (a) Es el cociente de actividad enzimática total (expresada en unidades enzimáticas) y la cantidad total de proteínas.
- (b) Se define como la cantidad de GST que cataliza la formación de 1mg de producto (desaparición de reactivo) en un minuto

Determinación del punto isoeléctrico de la enzima.

El valor del pI para la GST Tc resulto ser de 5-5.4. Este valor se obtuvo en el último paso de purificación. En la figura 7 se muestra el resultado del cromatofoco de la fracción GST Tc .

Análisis electroforético.

Todas las fracciones proteicas obtenidas en el procedimiento de purificación se analizaron por electroforésis en geles de poliacrilamida reductores (SDS-PAGE).

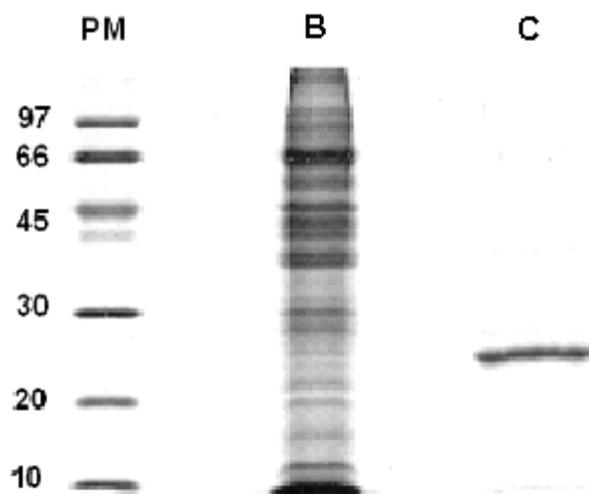


Fig. 8. Análisis de las fracciones purificadas por gel de acrilamida SDS-PAGE al 15 %. En el carril B el extracto crudo presenta un gran número de bandas. El rango de los pesos moleculares de estas proteínas se situó entre 10 kDa hasta 100 kDa. En el carril C se aprecian las proteínas pertenecientes al eluido de la columna de Sef-GSH, el número de bandas no es excesivamente grande, por lo tanto se puede ver el trabajo de la resina para concentrar a diversas bandas proteicas cuando las comparamos con el extracto crudo.

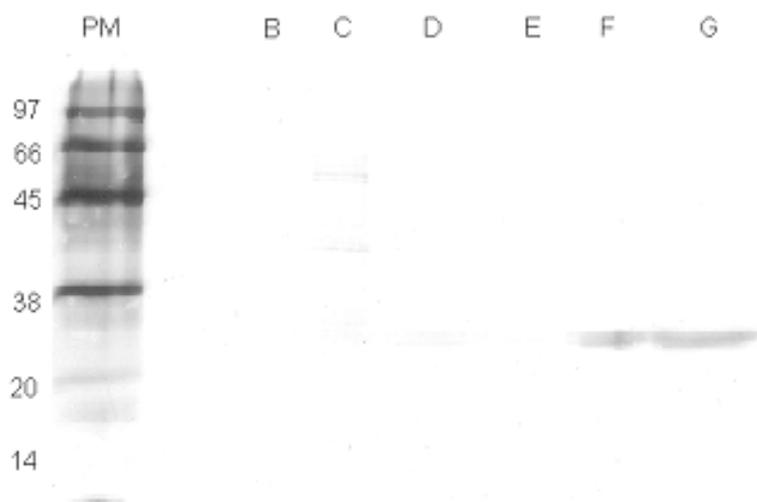


Fig. 9 Análisis en PAGE al 15 %, tinción en plata. PM) Control de peso molecular, en el carril F y G se aprecia la GSTTc perteneciente al eluído del cromatoenfoque (PBE).

Determinación de los pesos moleculares y composición de subunidades.

El peso molecular de las subunidades de la GSTTc al análisis por geles de poliacrilamida fue de 25 kDa (Fig. 10)

El peso molecular nativo de la GSTTc, al análisis por cromatografías de filtración, resultó de 54 kDa (Fig. 11)

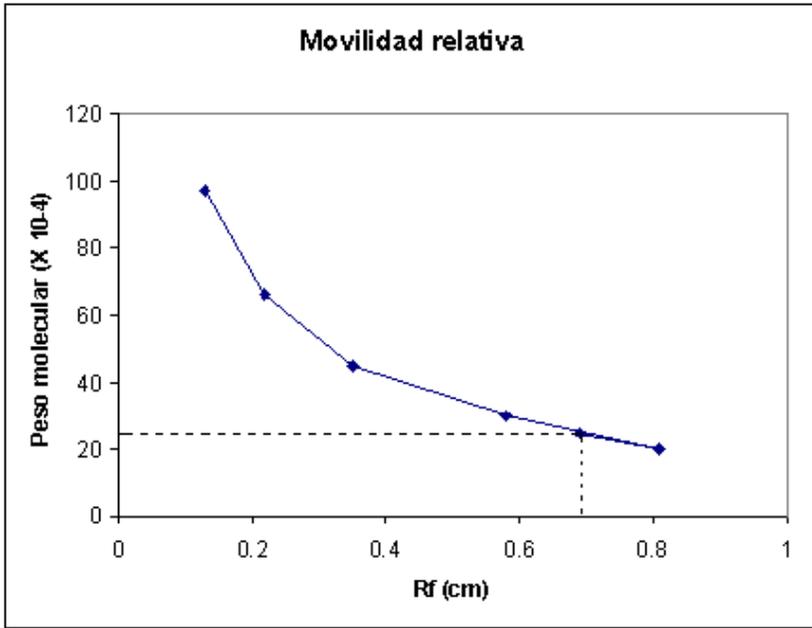


Fig. 10. Se observa que cada subunidad de la GSTTc tiene un peso de 25 ± 0.07 KDa.

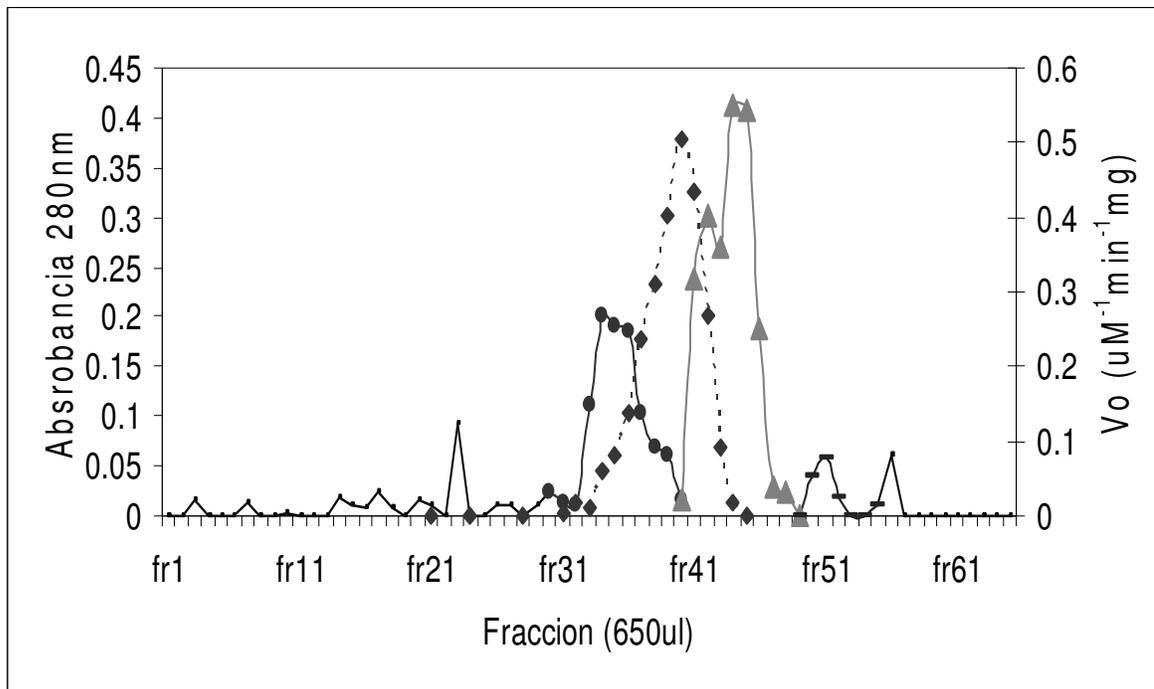


Fig. 11. Resultado de la cromatografía de filtración Sephacryl S200 HR. Se muestra la absorbancia a 280nm de las proteínas de calibración de la columna:

BSA 66,000 Da (●); anhidrasa carbónica 31,000 Da (▲); mioglobina 16,900 Da (—); elusión con actividad GST expresada en $\mu\text{M}^{-1}\text{min}$ (- - -).

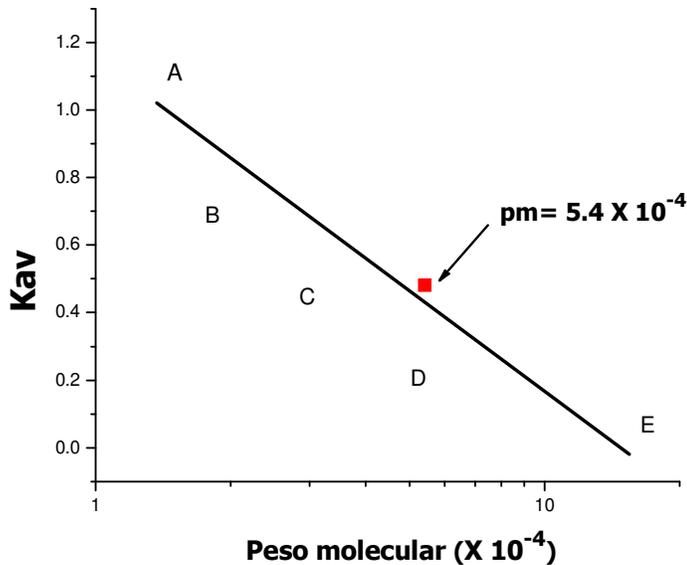


Fig. 12 Grafica de la constante de distribución frente a los pesos moleculares de referencia. Se observa por medio de una flecha el valor obtenido de peso nativo por la GSTTc. Marcadores de peso molecular: A) Lisozyma 13.9kDa, B) Mioglobina 16.9kDa, C) Anhidrasa carbónica 31kDa, D) Albúmina sérica bovina 66 kDa, E) Y-globulina 150 kDa.

Especificidad de sustrato.

La tabla 7 muestra las diversas actividades específicas desarrolladas por la GSTTc frente a una variedad de sustratos característicos para evaluar a las GSTs. La enzima parasitaria desarrollo la máxima actividad con el CDNB que es el sustrato universal para las GSTs, y con la menor actividad pasa el trans-non-2-enal. No tuvo actividad enzimática con la bromosulfaleína, 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano y con el hexa-2,4-di-enal.

Tabla 7. Se muestran las actividades catalíticas de la GSTTc con diferentes sustratos.

Sustratos	($\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
1-cloro-2,4-dinitrobenceno	1.45
1,2-dicloro-4-nitrobenceno	0.052
Bromosulfaleína	ND
Ácido etacrínico	0.134
1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano	ND
hexa-2,4-di-enal	ND
trans-non-2-enal	0.042

ND. No mostraron actividad catalítica con GST

Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de la GST

La Fig. 13 presenta el comportamiento de la actividad enzimática en función del pH utilizado en el ensayo enzimático. La actividad óptima se obtuvo en el 7.5 y decrece rápidamente en ambos lados del máximo. Estos resultados son parecidos a los reportados para otras GSTs. También se muestra la estabilidad de la enzima por el efecto del pH al que estuvo sometida durante 14 horas. La figura indica que la GSTTc fue estable en un intervalo de pH 5.7 – 8.0; es decir, la enzima logra conservar sus grupos ionizables en una forma apropiada para mantener la conformación de su sitio activo en este intervalo de pH.

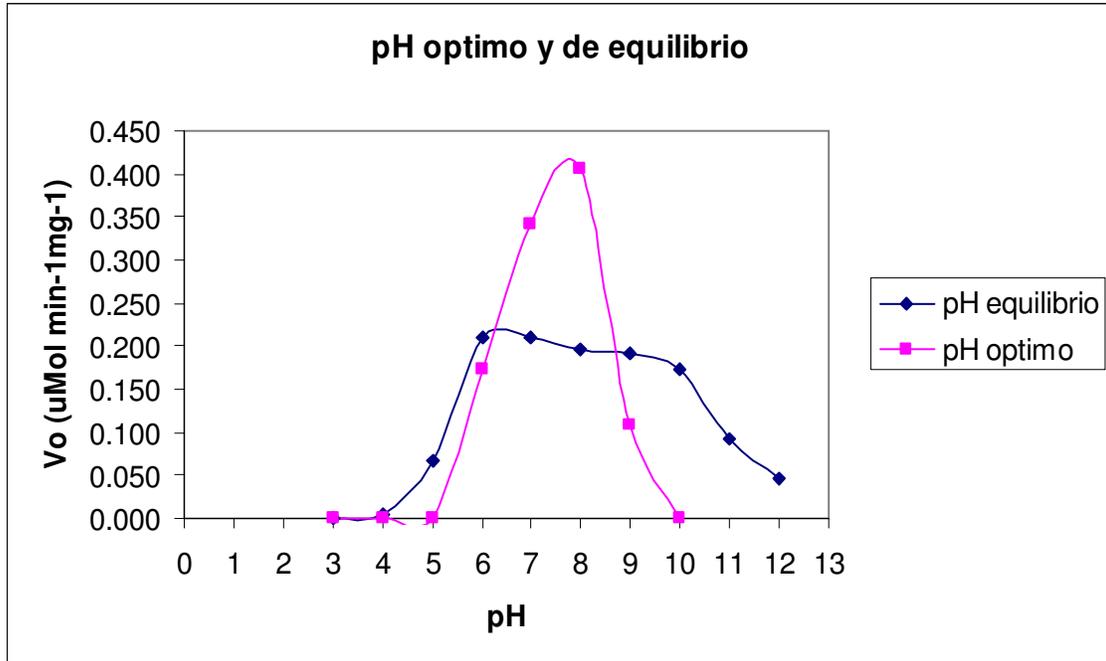


Fig. 13. Se puede observar que la enzima pierde su estabilidad a un pH de 5.8, y tiene un pH óptimo de 7.5

Efecto de la temperatura sobre la actividad de la GST

La Fig. 14 muestra el porcentaje de la actividad enzimática de la GSTTc en función de la temperatura a la cual se realizó el ensayo enzimático. Se puede observar que la enzima se mantuvo estable en el intervalo de 25 °C hasta los 50°C. Temperaturas más elevadas produjeron la inactivación gradual de la enzima.

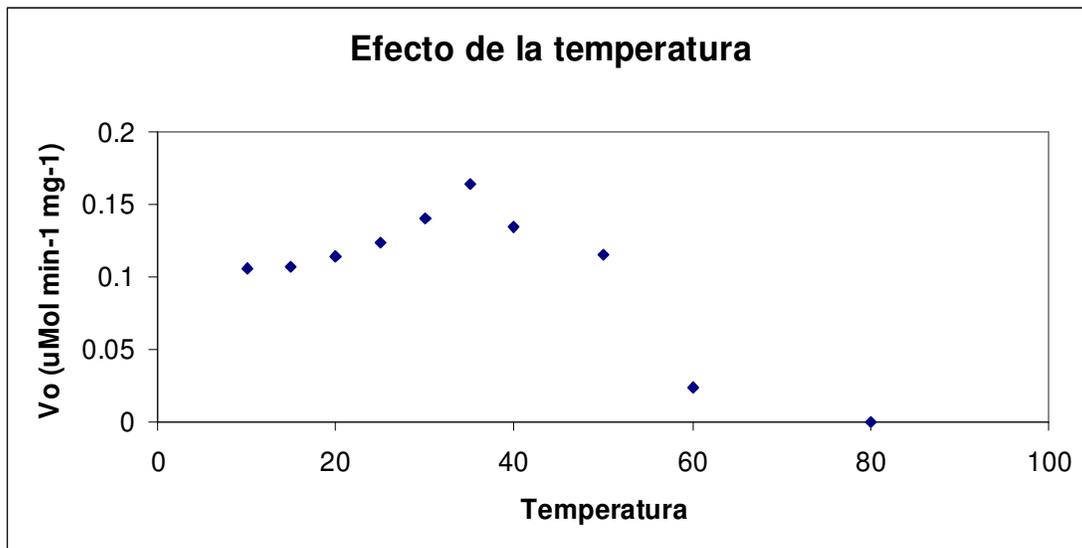


Fig. 14. La enzima tiene una mejor actividad enzimática a temperaturas entre 30 - 35° C.

Determinación de las constantes catalíticas.

En las figuras 15 y 17 ambas gráficas mostraron una hipérbola rectangular con límites de V_{max} y K_m características de enzimas que se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten. Para tener valores más precisos de las constantes catalíticas se construyeron gráficas de Lineweaver-Burk con los datos de las figuras 15 y 17. La Fig. 16 muestra la gráfica de la doble recíproca para la GSTTc frente a diversas concentraciones de CDNB. A partir del intercepto de la recta en el eje de las ordenadas se obtiene un valor para la $V_{max(CDNB)} = 0.57 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mientras que el intercepto de la misma recta pero en el eje de las abscisas permite calcular un valor para la $K_{m(CDNB)} = 0.36 \text{ mM}$. La Fig. 18 es la gráfica de la doble recíproca equivalente a la anterior, pero describe los valores en función de las concentraciones empleadas con GSH. De esta forma se aprecia que la $V_{max(GSH)} = 0.79 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y la $K_{m(GSH)} = 0.53 \text{ mM}$.

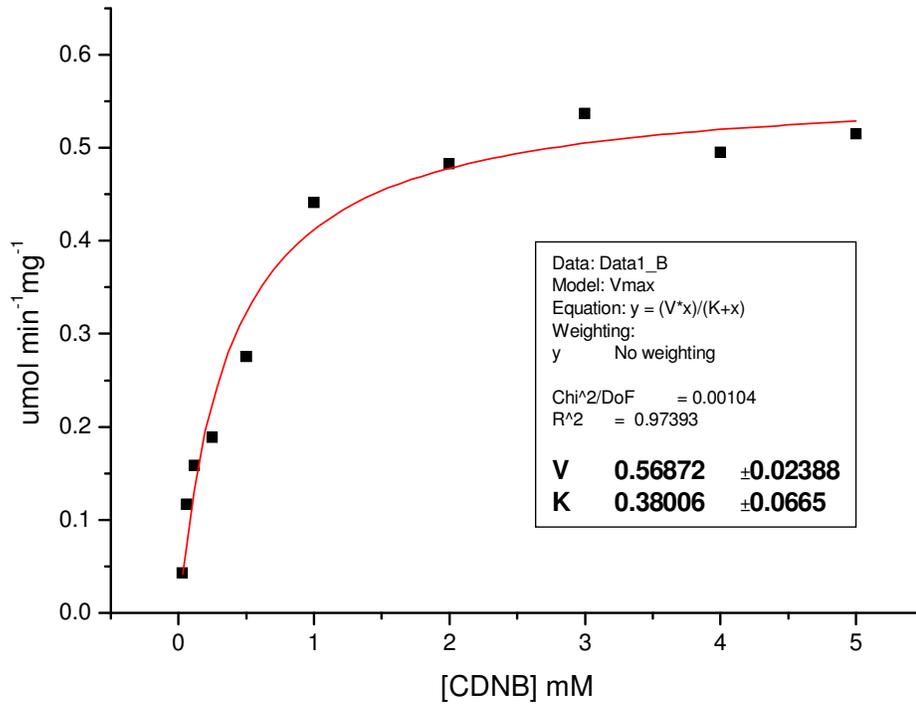


Fig. 15. Grafica de Michaelis-Menten para obtener los valores cinéticos V_{max} y K_m de la GSTTc usando 1-cloro, 2,4-dinitro benceno (CDNB) como sustrato

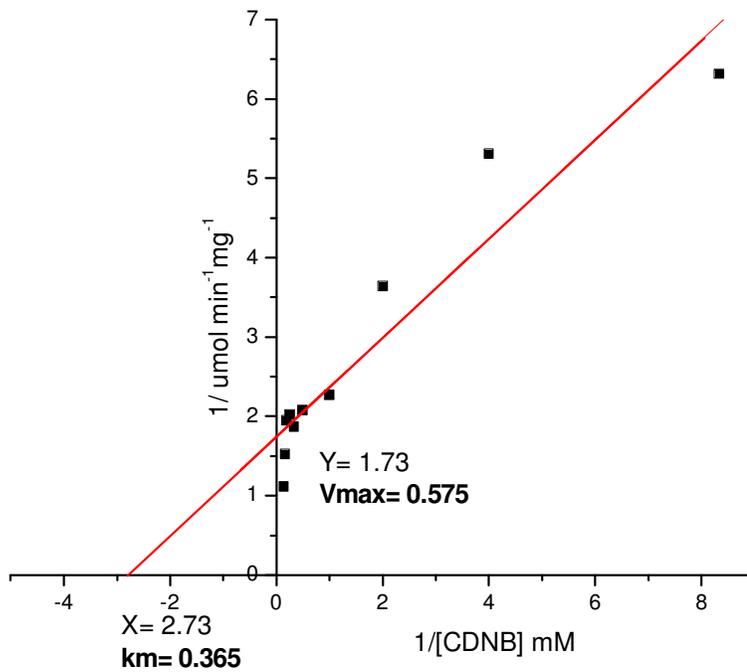


Fig. 16 Grafica de Lineweaver-Burk para el CDNB, en el cual se aprecia el valor de la $K_m = 0.36$ mM y de la $V_{max} = 0.57$ $\mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$

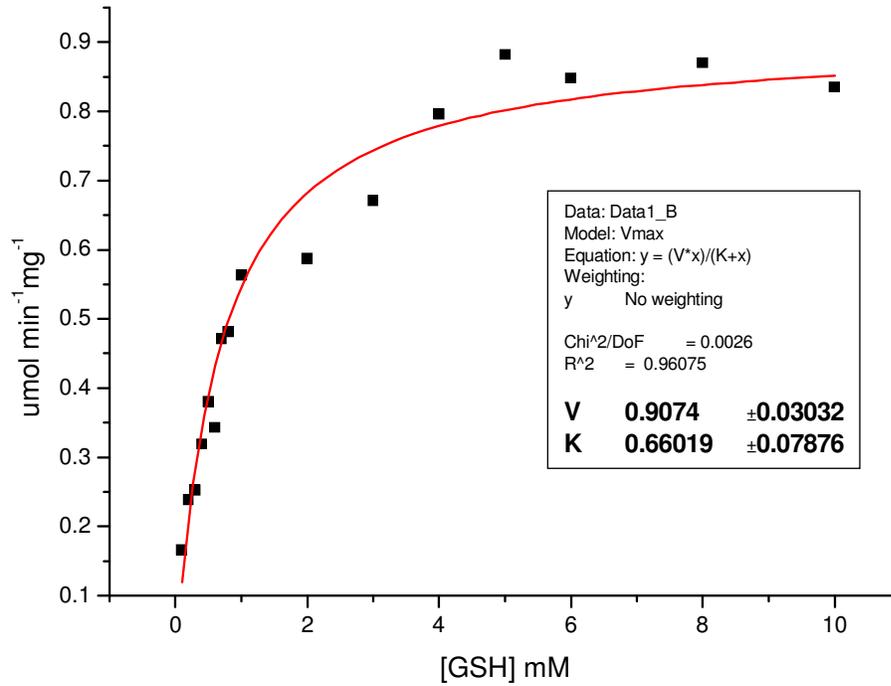


Fig. 17 Grafica de Michaelis-Menten para obtener los valores cinéticos Vmax y Km de la GSTTc usando al GSH como sustrato

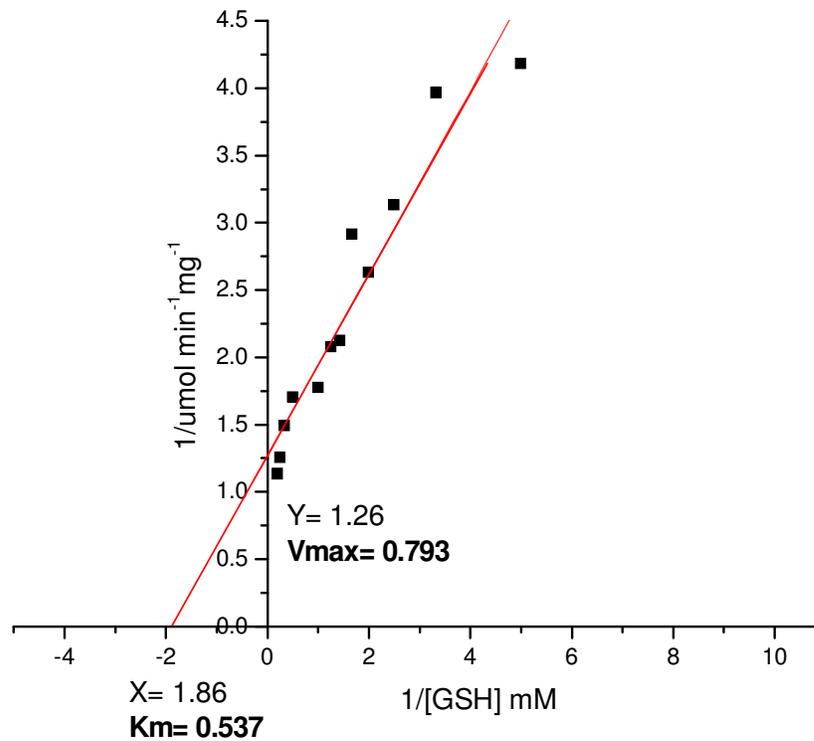


Fig. 18. Grafica de Lineweaver-Burk del GSH. Se aprecia el valor de la Km = 0.53 mM y de la V max = 0.79 uM min⁻¹mg⁻¹

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

En las figuras 19 y 21 se presentan las gráficas del porcentaje de la actividad residual (% actividad) de la GSTTc frente a las concentraciones de BST y hematina, respectivamente. Los valores de las I_{50} fueron: para la BTS = 0.107 mM y para la Hematina = 0.53 μ M.

Cuando se utilizó al CDNB como sustrato variable en los ensayos de inhibición, se identificó que los dos inhibidores empleados desarrollaron el tipo de inhibición no competitiva sobre la GSTTc. Este efecto se muestra en las Fig. 20 y 22, donde los dos inhibidores produjeron una disminución en las V_{max} de las reacciones sin modificarse las K_m , siendo tal efecto característico de este tipo de inhibición. El graficar los valores de las pendientes ($m = K_m / V_{max}$) de las figuras 20 y 22 frente a las concentraciones del respectivo inhibidor, proporcionaron valores de $K_i = 0.4 \mu$ M para la BTS y 1 mM para la hematina.

Bromosulfaleína:

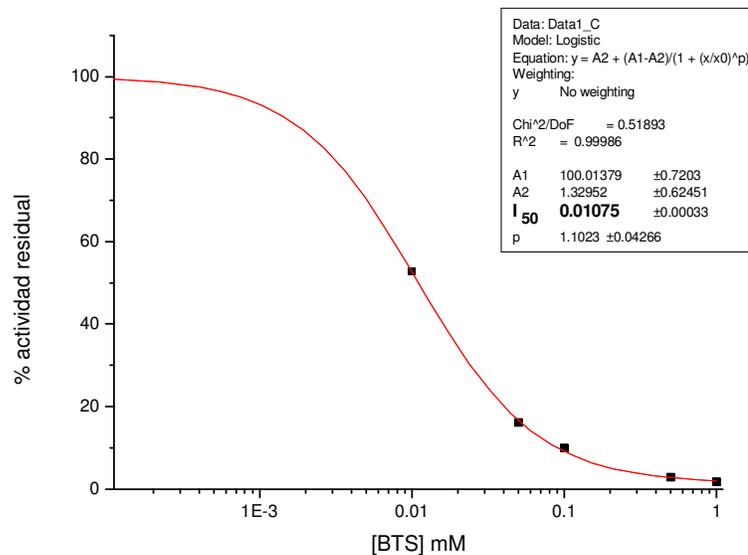


Fig. 19 Composición grafica de la inhibición al 50%. Se obtuvo una I_{50} de 0.01075mM

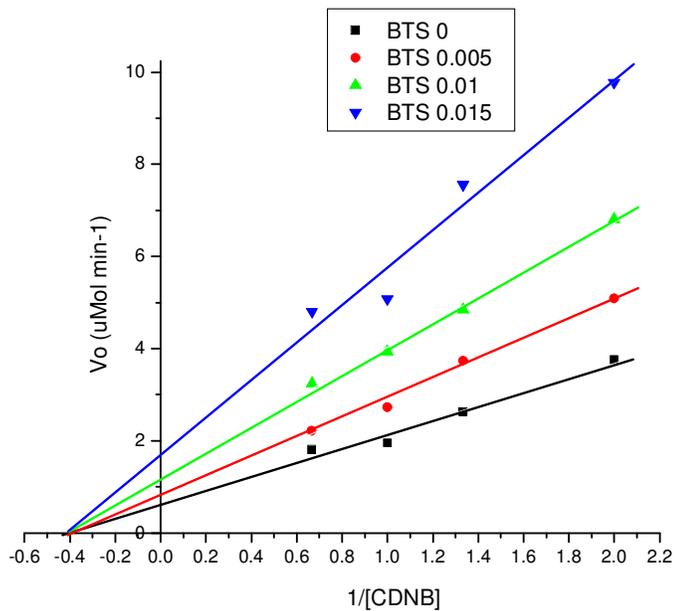


Fig. 20. Inhibición de la velocidad de reacción de la GSTTc frente a diferentes concentraciones de bromosulfaleína (BTS). (Grafica de Lineweaver-Burk)
Se obtuvo un valor de $K_i = 0.4\mu\text{M}$

Hematina:

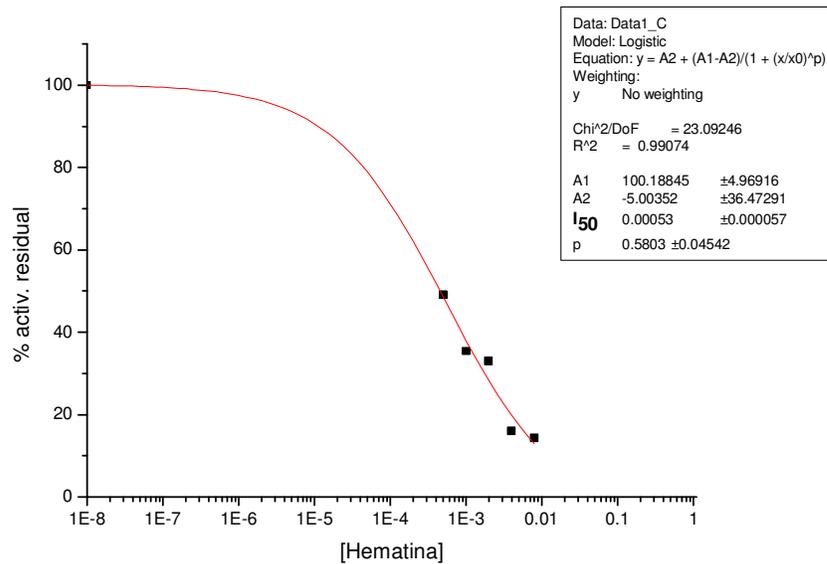


Fig.17 Composición grafica de la inhibición de la actividad de la GSTTc al 50%, en el cual se obtuvo una $I_{50} = 0.53\ \mu\text{M}$

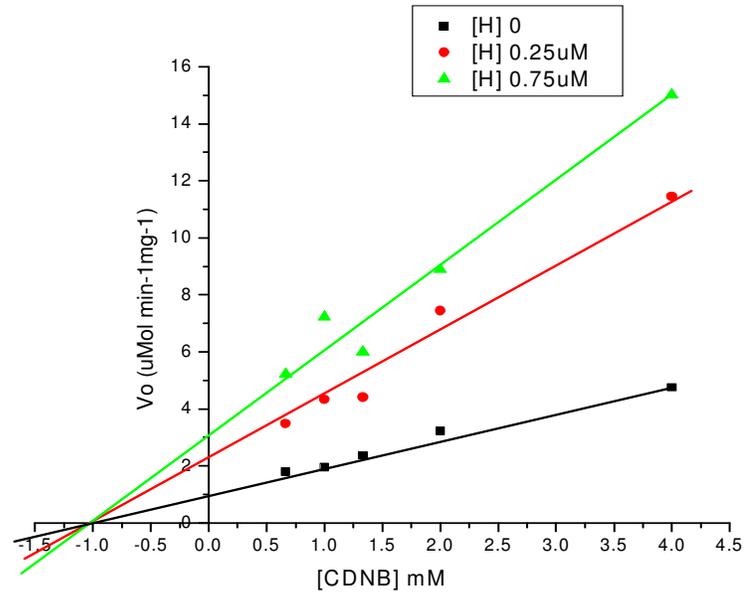


Fig.18 Inhibición de la velocidad de reacción de la GSTTc frente a diferentes concentraciones de hematina (H). (Grafica de Lineweaver-Burk)

Se obtuvo un valor de $K_i = 1 \text{ mM}$

Estudios de inhibición de la fluorescencia.

En las figuras 23 y 24 se presentan las gráficas del porcentaje de la actividad residual (% actividad) de la GSTTc frente a las concentraciones de BST y hematina, respectivamente. Mientras que en la grafica 25 se observa el porcentaje de la actividad residual de las porfirinas frente a las concentraciones de la GSTTc.

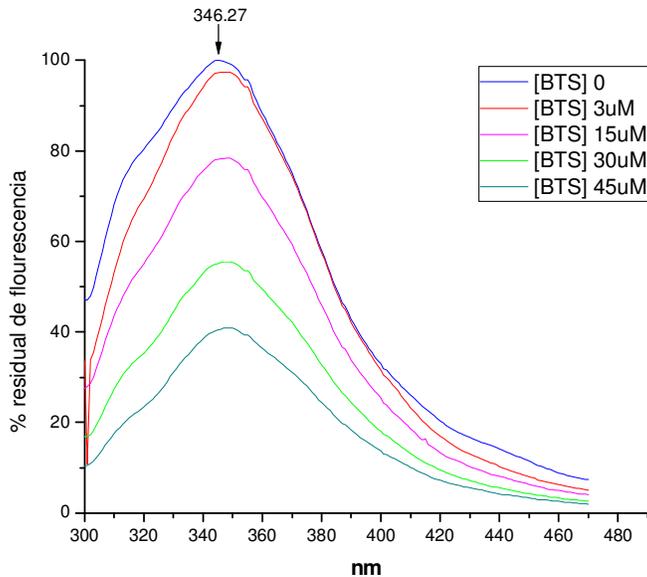


Fig.23. Inhibición de la fluorescencia intrínseca de la GSTTc por la bromosulfaleína.

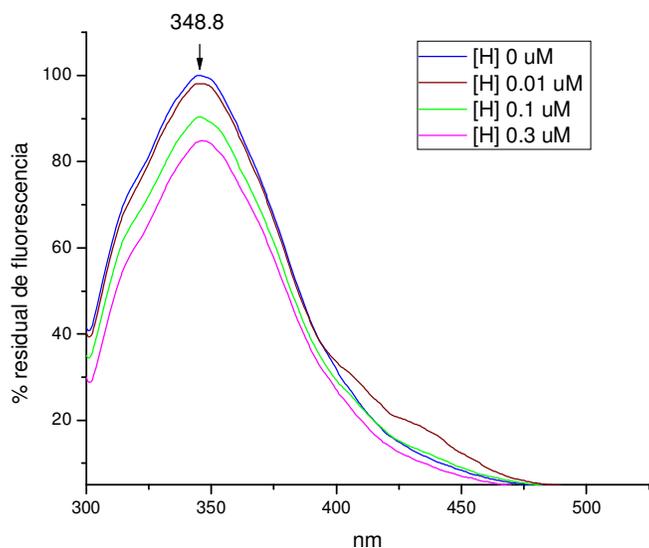


Fig.24. Inhibición de la fluorescencia intrínseca de la GSTTc por la hematina.

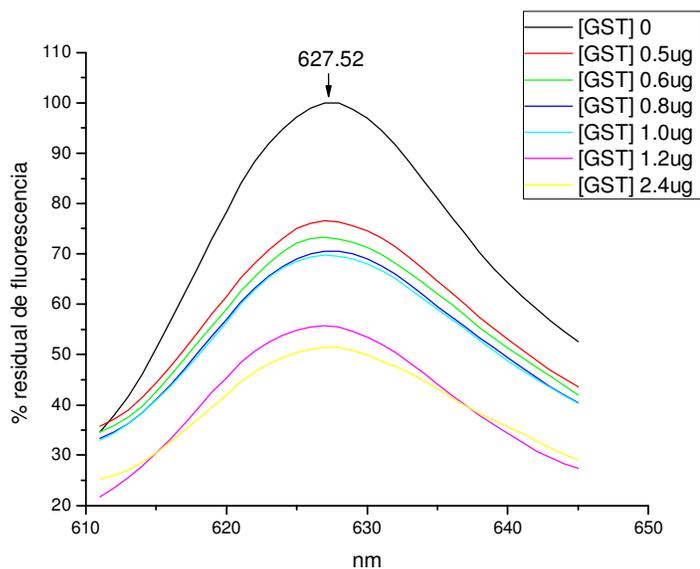


Fig. 25. Inhibición de la fluorescencia intrínseca de las porfirinas presentes en el líquido vesicular del cestodo por la GSTTc

DISCUSION

La presencia de de la glutatión *S*-transferasa se demostró en el cestodo de *T. crassiceps* por su actividad catalítica. Los ensayos utilizaron los sustratos tradicionales para las GSTs como el CDNB y el GSH (3).

El procedimiento de purificación para obtener la fracción GST*Tc* en forma homogénea se basó principalmente en la afinidad específica de la enzima hacia el GSH. La eficiencia en el procedimiento de purificación fue similar a lo obtenido por Brophy y Barret (2).

La determinación de las constantes catalíticas V_{max} y K_m de la GST*Tc* para el glutatión fue $K_m = 0.53 \mu\text{M}$ con una $V_{max} 0.79 \mu\text{Mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ y el CDNB tuvo una $K_m = 0.36 \mu\text{M}$ y una V_{max} de $0.57 \mu\text{Mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Estos datos en comparación con las K_m de la GST tipo1 de humano (T. H. Manoharan et al, 1992) GSH $K_m = 0.142 \mu\text{M}$ y CDNB $K_m = 0.626\mu\text{M}$ son muy diferentes entre si. Esto puede permitirnos pensar en buscar un inhibidor específicamente para la GST*Tc* sin afectar al hospedero (34).

El peso molecular nativo para las subunidades de GST*Tc* fue de 54 kDa. Este valor resultó ser similar con la mayoría de las GSTs de vertebrados, y menor para algunos invertebrados (25). El peso molecular determinado para las subunidades resultó ser de 25 kDa, el cual esta dentro de los establecidos para la mayoría de las GSTs publicadas (31). Estos datos apoyan el hecho de que la GST de *T. crassiceps* está formada de dos subunidades.

La máxima actividad enzimática desarrollada por la GST*Tc* fue a pH de 6.5-7.5. Este dato concuerda con la función catalítica que tienen las GSTs de diferentes especies (32, 33).

Se estudió la sensibilidad de la GSTTc hacia las moléculas hematina y bromosulfaleína. Las formas de las gráficas de la actividad residual frente a la concentración del inhibidor fueron típicas de inhibiciones lineales simples para los dos compuestos. El análisis del tipo de inhibición que desarrollaron estas moléculas inhibitorias fue realizado por medio de las gráficas de Lineweaver-Burck. Estas gráficas mostraron que los inhibidores actuaron en forma no competitiva sobre la enzima; es decir, los inhibidores no tuvieron un efecto directo sobre el sitio catalítico, sino se unieron a la enzima en un sitio diferente a su sitio activo.

La GSTTc también fue inhibida por la hematina y la bromosulfaleína en los ensayos de fluorescencia. En las graficas 23 y 24 se aprecia la disminución de la fluorescencia intrínseca de la enzima por efecto de estas dos moléculas. De forma similar, la fluorescencia intrínseca emitida por las porfirinas del cestodo *T. solium*, disminuyó en forma proporcional cuando se incubaron con cantidades crecientes de GSTTc. Esta disminución de la fluorescencia intrínseca fue similar al de la Zm GST III (35), lo cual sugiere que se inhibió a la mesoporfirina del liquido vesicular de metacestodo de *T. solium*. Por lo tanto se puede observar que hay un cambio conformacional de la enzima al interactuar con los ligandos no sustratos.

Los resultados cinéticos y el apagamiento de la fluorescencia obtenidos en los ensayos de inhibición de la enzima sugieren, que la enzima es capaz de unir ligandos en sitios diferentes al sitio activo. Se sugiere que esta enzima presenta funciones de acarreadora. Este papel de la enzima podría estar participando en el parásito *in vivo* detoxificando en forma pasiva y contribuyendo a la evasión de la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró purificar en forma homogénea una glutatión *S*-transferasa de metacestodos de *T. crassiceps* (GST*Tc*).

La GST*Tc* es una enzima dimérica.

Esta enzima presenta características fisicoquímicas y cinéticas similares a las de otras GSTs.

La GST*Tc* fue capaz de unir ligandos de forma no catalítica.

La potencial función acarreadora de la GST*Tc* podría contribuir a explicar algún mecanismo de evasión inmune.

La información generada en este trabajo sobre aspectos bioquímicos de la GST*Tc*, también contribuiría a entender las rutas metabólicas en las que participa la glutatión *S*-transferasa en el parásito. De tal forma que en un futuro se pueda diseñar inhibidores específicos contra esta enzima que afecten sus funciones.

3.

BIBLIOGRAFIA

1. Leid R W, Suquet CM, Taniagoshi L. Parasite defense mechanism for evasion of host attack: a review. *Vet Parasitology* 1978, 25: 147-162
2. Brophy, P. M., Southan, C., and Barret, J. Glutathione transferasas in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem Journal* 1989, 262: 939-946.
3. Habig W, Pabst M, Jakoby W. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biochem Journal* 1974, 249: 7130-7139
4. del Arenal P, Cea A, Moreno-Sanchez R, Escamilla E. A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. *J Parasitology* 1998, 84: 461-468
5. D. Hill et al. Principles and practice of clinical parasitology, Ed Wiley 2001, 613-630.
6. Barry M. and Kaldjian LC. Neurocysticercosis. *Semin Neurol* 1993, 13: 131–143.
7. Sciutto, E., G. Fragoso, M. L. Díaz, F. Valdez, R. M. Montoya, T. Govezensky, C. Lomelí, and C. Larralde. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Res* 1991, 77:243-246
8. Cheng, T. General Parasitology. Academic Press Collage Division. Hardcourt Brace Hovanovich, Publisher. New York 1986, 827-829
9. Terrazas L, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective TH1-Type immune response to a late permissive TH2-Type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitology* 1998, 84: 7481.

10. del Arenal P, Cea A, Moreno-Sanchez R, Escamilla E. A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. *J Parasitology* 1998, 84: 461-468.
11. Freeman R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 1962, 40: 969-990
12. Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol Lett* 1987, 16: 315 – 20.
13. Rice-Evans C. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological state. In: *Free radical damage and its control*. Elsevier Sci. London 1994, 131-153
14. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998, 201: 1203-1209.
15. Seis H. Strategies of antioxidant defense. *Eur Journal Biochem* 1993. 215: 213 – 219
16. Callahan, H.L., R.K. Crouch, and E.R. James. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?. *Parasitol Today* 1988, 4: 218-25.
17. Rosen, GM, et al. Free radicals and phagocytic cells. *Faseb Journal* 1995, 9: 200-209.
18. James, E.R. Superoxide dismutase. *Parasitology Today* 1994, 10: 481-484.

19. 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: 101-104.
20. Alan G, Clark. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comp. Biochem. Physiol* 1989 92B: 419–446
21. Irwin M. Arias, Naohito OHMI, 1980. Ligandin: an adventure in liverland. *Mol Cell Biochem* 1980, 29:71–80
22. Herve M, Angeli V, Pinzar E, Wintjens R, Faveeuw Ch, Narumiya S, Capron A, Urade Y, Capron M, Riveau G, Trottein F. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur J Immunol* 2003, 33: 2764-2772.
23. Morgenstern R, DePierre W, Jörnvall. Microsomal Glutathione Transferase. *The Journal of Biological Chemistry* 1985, 260: 13976 – 13983.
24. Pearson WR. Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods Enzymol* 2005, 401:186-204.
25. Clark, A., G. The comparative enzymology of the glutathion S-transferase from non-vretebrate organisms *Comp Biochem Physiol* 1989, 92: 419-446.
26. Armstrong, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol* 1997, 10:2–18
27. Frova, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 2006, 23, 149–169.

28. Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. Glutathione transferases. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol* 2005, 45: 51–88.
29. A Torres-Rivera, Landa-Piedra A 2007. Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Rev. Acta Tropica*. 105, 99–112
30. T.H. Manoharan, A.M. Gulick, R.B. Puchalski, A.L. Servais and W.E. Fahl, Structural studies on human glutathione S-transferase Pi substitution mutations to determine amino acids necessary for binding glutathione. *The Journal of Biological Chemistry* 1992, 267:18940–18945
31. Ketterer B, Taylor J, Meyer D, Pemble S, Coles B, Chulin X, Spencer S. Some functions of glutathione transferases. Boca Raton, Florida; CRC Press 1993, 15-27.
32. Mantle T, Pickett C, Hayes J. Structure and function of glutathione transferases. Boca Raton, Florida; CRC Press 1993, 25-37.
33. Mannervik, B. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev in Biochemistry* 1988, 23: 283-337.
34. Raffalli-Mathieu, F., Mannervik, B. Human glutathione transferase A3–3 active as steroid double-bond isomerase. *Met. Enzymol* 2005, 401:265–278.
35. B. Lederer and P. Boger. Binding and protection of porphyrins by glutathione S-transferases of *Zea mays* L. *Biochemistry* 2003, 226–233
36. Lehninger, A. *Bioquímica*. 2^a edición, Ediciones Omega, S.A. Barcelona 1980, 195-218

37. Voet, D., Voet J. Fundamentals of biochemistry. Ed. New York Wiley 1999, 357-377

38. Lubert Stryer. Fluorescence spectroscopy of proteins. Science New Series 1968, 162: 526-533.