



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS
CINÉTICOS DE UNA GLUTATIÓN TRANSFERASA
RECOMBINANTE DE 25 kDa DE
Taenia solium

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RAÚL ARAMIS ROLDÁN MENDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

MÉXICO, D. F. 2009



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



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.

-A mi madre y a Marlene-

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. José Edgardo Escamilla Marvan

Vocal: Dr. Guillermo Salgado Maldonado

Secretario: Dr. Abraham Landa Piedra

Suplente: Dr. Victor Manuel Valdes López

Suplente: Dra. Veronica Monroy Martínez

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este trabajo de investigación fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT) con el contrato IN-207507-3 bajo el proyecto de nombre “Anticuerpos recombinantes: herramientas para identificar antígenos de membrana y como inhibidores de enzimas esenciales en *Taenia solium*” y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). El alumno Raúl Aramís Roldán Méndez recibió beca del proyecto (IN-207507-3).

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por permitirme ver la luz cada nuevo día y andar en el camino que yo mismo me he trazado.

A mi madre, por haberme brindado la vida y a través de sus infinitos cuidados y consejos haberme ayudado a llegar a ser la persona que soy ahora. A mi hermana por ser esa lucecita que llevo hace algunos años a iluminar nuestro hogar y que pase lo que pase siempre tiene una sonrisa en su carita. A mi padre y a mi hermano, por estar ahí cuando se les ha necesitado y por darme un sitio al cual llamar hogar.

A Viri, por todos estos años de risas, lagrimas, consejos y todas las cosas que nos ha tocado vivir juntos y sin la cual no estoy seguro de que estaría hoy aquí. A Toño, Rodrigo, Raúl, Ieshua, Helga, PasQ, Serafin y todas las demás personas que a lo largo de estos años se convirtieron no solo en compañeros y amigos, sino en mis hermanos y a los cuales les debo muchísimo.

Al Dr. Landa, por todas las horas de discusiones, correcciones, planeación de experimentos y demás que tanto me sirvieron para elaborar este trabajo. A Anayetzin por ser mas que una compañera y una amiga, sino una mentora de la cual aprendí la mayor parte de las cosas que se sobre cinética. A Alice, Lucia, Richi, Felipe, Vic, Oscar, Ponciano, Sergio y Omar por sus enseñanzas, consejos, regaños, compañía y más que nada por hacer del sitio de trabajo un lugar un poco más cálido, y por aguantarme durante este año.

ÍNDICE GENERAL

Jurado asignado	
Agradecimientos	
Índice General	
Lista de Abreviaturas.....	8
Algunos conceptos sobre cinética.....	9
Resumen.....	10
I. Introducción	
1.1 <i>Taenia solium</i>, taeniosis y cisticercosis.....	11
1.2 Respuesta inmune y mecanismos de defensa.....	13
1.3 Glutación transferasas.....	15
1.4 Cinética enzimática.....	19
II. Justificación.....	21
III. Objetivos	
3.1 Objetivo General.....	22
3.2 Objetivos Particulares.....	22
IV. Materiales y Métodos	
4.1 Material biológico.....	23
4.2 Reactivos químicos y medios de cultivo.....	23
4.3 Transformación de bacterias.....	23
4.4 Expresión y purificación de las GST_{25.5} recombinante.....	24
4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE- SDS).....	25
4.6 Ensayos de actividad enzimática.....	25
4.7 Efectos del pH y temperatura sobre la enzima.....	26
V. Resultados	
5.1 Purificación de la enzima.....	28
5.2 Parámetros cinéticos de GST_{25.5r}.....	29
5.3 Determinación de clase.....	32
5.4 Efecto del pH sobre la actividad de la GST_{25.5r}.....	32
5.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la GST_{25.5r}.....	33

5.6 Determinación de pI.....	34
VI. Discusión.....	35
VII. Conclusiones.....	41
VIII. Literatura Citada.....	42

ABREVIATURAS

°C.- Grados centígrados

ADN.- Ácido desoxirribonucleico

AE.- Ácido etacrínico

BSF.- Bromosulfaleína

CDNB.- 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno

CHP.- Hidroperóxido de cumeno

cm.- Centímetros

DCNB.- 1,2-dicloro-4-nitrobenzoceno

EDTA.- Ácido etilen diamino tetracético

GPX.- Glutación peroxidasa

GSH.- γ -glutamil.cistenil-glicina reducida (glutación)

GST_{25.5r}.- Glutación tranferasa de 25.5 kDa recombinante

IgE.- Inmunoglobulinas tipo E

IPTG.- Isopropil tio- β -D-galactosidasa

k_{cat} .- Constante catalítica

k_{cat}/K_M .- Eficiencia catalítica

kDa.- Kilodaltones

K_M .- Constante de Michaelis

M.- Mol

μ g.- Microgramos

mg.- Miligramos

mM.- Milimolar

μ mol.- Micromolar

ml.- Mililitros

ng.- Nanogramos

nm.- Nanómetros

pH.- Potencial de Hidrógeno

pI.- Punto isoeléctrico

PMSF.- Fluoruro de p-Fenil metilsulfonio

PRX.- Peroxiredoxina

ROS.- Reactive Oxygen Species (Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés)

s.- Segundos

SDS.- Dodecil-sulfato de sodio

SOD.- Superóxido Dismutasa

TFBO.- *trans*-4-fenil-3-buten-2-ona

V_{\max} .- Velocidad máxima

Algunos conceptos sobre cinética

Dentro de la cinética de las enzimas, la V_{\max} se refiere a la velocidad límite que es capaz de alcanzar una enzima cuando se le satura con el sustrato que utiliza, que no sobrepasará en ningún caso, independientemente de que se siga incrementando la concentración del sustrato. La K_M se define como la concentración a la que la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la V_{\max} , pero también como la afinidad que tiene la enzima por ese sustrato en particular. Por otro lado, la constante catalítica (k_{cat}) o tasa catalítica de formación del producto, se interpreta como el número máximo de reacciones catalizadas en un intervalo de tiempo de un segundo, mientras que el radio k_{cat}/K_M hace referencia a la eficiencia con la que la enzima convierte el sustrato en producto, y por ello está dado en unidades de concentración del soluto (M) y tiempo (s). Otros parámetros útiles para entender el comportamiento de las enzimas son el punto isoeléctrico (pI), que es el valor de pH al cual la carga de la enzima es neutra, y los intervalos de pH y temperatura a los cuales desempeña su actividad de manera óptima (Cornish-Bowden, 2004; Segel, 1975).

RESUMEN

Taenia solium es un helminto parásito cuyo estadio adulto es causante de la taeniosis en el ser humano, único hospedero definitivo y que en su estadio de metacéstodo provoca la cisticercosis en el cerdo (hospedero intermediario) y a veces en el humano (hospedero accidental) cuando se consumen huevos viables mediante agua o alimentos contaminados; una vez dentro del hospedero, el huevo libera al cisticerco por acción de los jugos gástricos y las sales biliares, y se mueve a través del torrente sanguíneo, teniendo especial predilección por el tejido muscular y el sistema nervioso central como destinos.

Estos helmintos han desarrollado estrategias para contrarrestar las defensas del hospedero en su contra, tales como la producción de enzimas desintoxicantes que contrarrestan las especies reactivas de oxígeno liberadas por el sistema inmune del hospedero. Debido a la falta del sistema CYP450 en estos animales, enzimas como las glutatión transferasas son las principales encargadas del proceso de desintoxicación del organismo y de defensa contra estas especies reactivas de oxígeno y de otros xenobióticos.

Las Glutatión transferasas son una familia de enzimas cuya función principal consiste en transferir el grupo tiol del péptido GSH a moléculas hidrofóbicas potencialmente dañinas para la célula, con el fin de hacerlas más solubles y luego desecharlas mediante diversas vías. Estas enzimas actúan como dímeros en las cuales cada monómero contiene un sitio de unión al GSH y uno de unión a compuestos electrofílicos, y tanto la variedad como la fuerza de unión a tales compuestos están determinadas por la estructura tridimensional de la enzima, así como su secuencia de aminoácidos.

Durante el presente trabajo se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima GST_{25.5F} como un primer paso para entender su funcionamiento. Se reportan los valores de V_{max} , K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M para los sustratos CDNB y GSH, la estabilidad de la enzima ante la temperatura, el valor de pH óptimo para su actividad y se confirmó su pertenencia a la clase Mu en mamíferos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 *Taenia solium*, taeniosis y cisticercosis

La taeniosis es una enfermedad del ser humano ocasionada por el estadio adulto de *Taenia solium*, conocido comúnmente con el nombre de “solitaria”, mientras que la cisticercosis es una enfermedad causada por las larvas (cisticercos) de este parásito, que se establecen en los tejidos del hombre o del cerdo. En México, la prevalencia de la taeniosis es del 0.2 al 3.4% (Sarti, 1997), mientras que la cisticercosis alcanza en promedio del 1.1-1.4% (Larralde et al 1992).

En el ciclo de vida de *T. solium*, el ser humano es el único hospedero definitivo del estadio adulto, y éste adquiere al parásito mediante la ingestión de carne de cerdo cruda o mal cocida infectada con cisticercos viables, las cuales se desarrollan al estadio adulto en el intestino delgado, donde crecen hasta desarrollar proglótidos grávidos llenos de huevos que se liberan al exterior junto con las heces. Cuando estos huevos son ingeridos por los cerdos, los jugos gástricos liberan y activan a la oncósfera (Molinari et al 1988); que al pasar la barrera intestinal y llegar al torrente sanguíneo se establece en diferentes tejidos del cuerpo del hospedero, con especial predilección por el músculo y el cerebro donde se desarrollará en cisticerco. El humano se convierte en un hospedero accidental, al ingerir los huevos a través de agua o alimentos contaminados, entonces estos se desarrollan a cisticercos dentro de sus tejidos, dando origen a la cisticercosis humana (Cox, 1982). El ciclo se reinicia cuando el humano ingiere carne de cerdo parasitada con cisticercos (Figura 1).

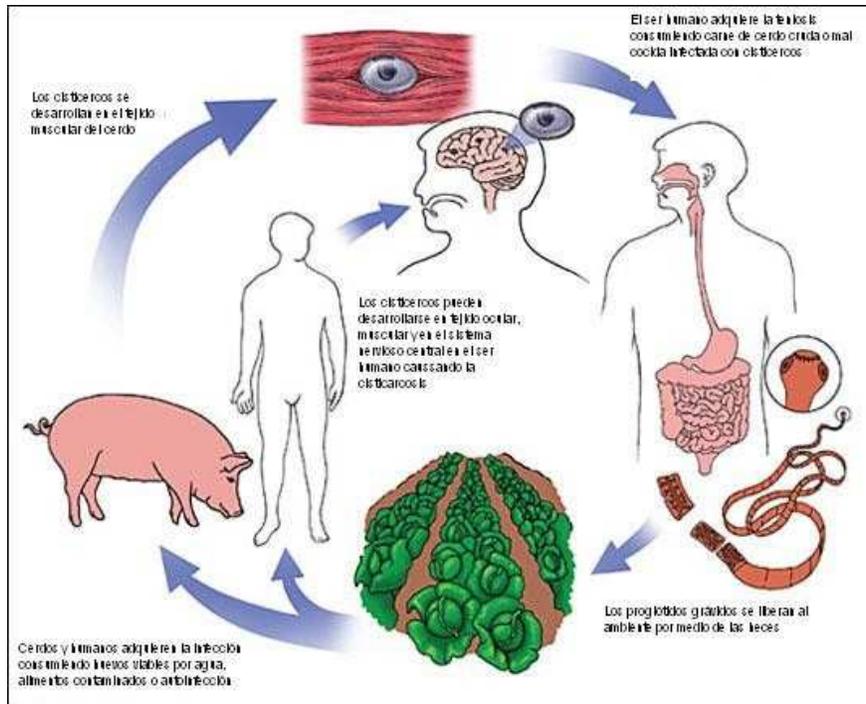


Figura 1.- Ciclo de vida de *Taenia solium*. En la figura se puede observar que cuando los huevos son ingeridos por el hospedero intermedio natural (cerdo) se puede presentar la taeniosis, mientras que si son ingeridos por un hospedero intermedio accidental (hombre) se desarrolla la cisticercosis (Tomado y modificado de Kraft, 2007 <http://www.aafp.org/afp//AFPprinter/20070701/91.pdf>).

Tanto la taeniosis como la cisticercosis son enfermedades que son más frecuentes en zonas donde la infraestructura sanitaria es deficiente o nula, la crianza del ganado porcino se hace de forma tradicional (de traspatio), el nivel educativo es bajo y no existe un conocimiento por las personas del parásito; es por esto, que en las zonas rurales del país se presenta el mayor número de casos. La estrategia idónea para combatir estas zoonosis sería desarrollar infraestructura sanitaria e implementar medidas de educación y de control que interrumpieran el ciclo del parásito, sin embargo, eso requiere de un esfuerzo en desarrollo de infraestructura sanitaria y educacional que es poco viable en nuestro país. Por lo que se han implementado otras alternativas para combatirlas que consisten en desarrollar fármacos o vacunas encaminados a eliminar o interrumpir el ciclo de vida de la *T. solium* (Flisser, 1997; Ligthowlers, 2000).

Taenia solium es un platelminto (Animalia: Cestodea), cuya morfología general consiste en un escólex o cabeza, la que es el órgano de fijación al hospedero, debido a que presenta

cuatro ventosas en forma de copa y dos hileras de ganchos que miden de 22 a 32 μm (Figura 2). El escólex mide aproximadamente 1mm de largo, mientras que el animal adulto alcanza entre 2 y 5 metros de longitud. Al escólex le sigue una región denominada “cuello”, que es corto y en donde se localizan células madre, que son las encargadas de generar los proglótidos. Los proglótidos conforman el resto del organismo, es decir, el estróbilo y dependiendo su posición respecto al cuello, y al estado de maduración reproductiva se clasifican como inmaduros, maduros o grávidos. Los proglótidos grávidos miden aproximadamente 1 cm de largo por 7 cm de ancho y se localizan en la región distal del parásito, y pueden contener hasta 40,000 huevos. Se ha reportado que al día pueden liberar al medio ambiente un promedio de 5 de estos proglótidos grávidos, lo que se permite la dispersión del parásito (Schmidt y Roberts, 2000).

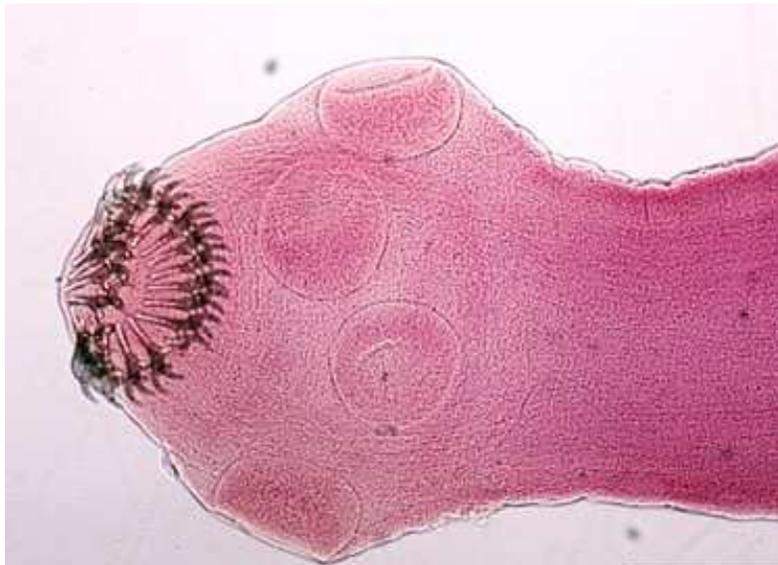


Figura 2.- Fotografía al microscopio del escólex de *T. solium* (40X) en donde se pueden apreciar las ventosas y las dos hileras de ganchos con los que se fija al hospedero (Hae-Seon Nam, tomado del Web Atlas of Medical Parasitology <http://www.atlas.or.kr/atlas/include/viewImg.html?uid=215>)

1.2 Respuesta inmune y mecanismos de defensa

La respuesta inmune del hospedero en contra de la tenia tiene componentes tanto celular como humoral, ya que se encuentra actividad tanto de células T CD4, como de inmunoglobulinas IgE; en cuanto a la respuesta de los linfocitos T CD4, el tipo de respuesta predominante es T_H2 , en donde las células producen citocinas que estimulan la producción de otras citocinas que activan a otras células como mastocitos, eosinófilos y macrófagos.

Estas células del sistema inmune son capaces de producir proteínas citotóxicas, enzimas proteolíticas o bien, liberar al ambiente especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de generar graves daños al parásito (Klion y Nutman, 2002).

Las ROS que se producen en la reacción inflamatoria son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el hidroxilo (OH^-), aunque también existen estos radicales asociados a nitrógeno, como el radical óxido nítrico (NO). Estas especies reactivas son capaces de dañar a las células porque oxidan y hacen perder la función de los lípidos de las membranas, las proteínas citosólicas y el ADN (Docampo, 1995). Entre otras cosas, los ROS son capaces de generar hidroperóxidos lipídicos y estos carbonilos citotóxicos; ambos compuestos son dañinos tanto para las proteínas como para el ADN (Brophy y Pritchard, 1992).

Como mecanismos de defensa ante la respuesta inmune del hospedero, los helmintos disponen de varias estrategias, como localizarse en sitios en los cuales la respuesta inmune del hospedero no es tan potente, como en el lumen de los intestinos, secretar moléculas para modular la respuesta inmune del hospedero y desarrollar respuestas en contra de las defensas de éste (Brophy y Pritchard, 1992; Klion y Nutman, 2002).

Entre las defensas contra las ROS y los xenobióticos como los antihelmínticos que disponen los helmintos, encontramos los de tipo enzimático y no enzimático. Dentro de las segundas tenemos compuestos de bajo peso molecular, como la vitamina E, el ácido ascórbico, el piruvato y el glutatión (GSH) que actúan directamente sobre las ROS e impiden que se propaguen dentro de la célula (Tracy y Vande, 1995). En cuanto al mecanismo de defensa enzimático, el parásito posee un conjunto de enzimas desintoxicantes que actúan a diferentes niveles, según la sustancia tóxica o especie reactiva; por ejemplo, la primera línea de defensa está a cargo de la Superóxido dismutasa (SOD), que se encarga de convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno, que luego será metabolizado por otras enzimas como la Glutatión peroxidasa (GPX), las Peroxiredoxinas (PRX) y la Catalasa. Cabe mencionar que esta última no se ha encontrado en helmintos. El metabolismo de xenobióticos se divide en dos fases, y a esta fase se le conoce como Fase I

o de reacciones de funcionalidad, cuya característica es que se hacen más solubles a los xenobióticos a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis. En la mayor parte de los organismos, esta función recae en la familia de enzimas del citocromo P450; sin embargo, en *T. solium* y helmintos esta variedad de mono-oxigenasas está ausente, por lo que las enzimas antes mencionadas (SOD, GPX y PRX) son las encargadas de cumplir esta labor.

En segundo lugar, tenemos a la Glutación transferasa (GST), la Glutación peroxidasa y la PRX que se encargan de metabolizar hidroperóxidos lipídicos si éstos se llegan a formar, mientras que si se forman carbonilos citotóxicos, entran en acción la GST, la Glutación reductasa o la Aldehído reductasa, enzimas consideradas de tercer nivel (Brophy & Pritchard, 1992). Estas reacciones corresponden a la Fase II del metabolismo de xenobióticos y ROS, en donde se realizan reacciones de conjugación, que catalizan la adición de pequeñas moléculas a estos xenobióticos, generando nuevos enlaces covalentes y haciéndolos más solubles (Tracy y Vande, 1995).

Como cualquier otro cestodo, *T. solium* carece de tracto digestivo, por lo que la absorción de nutrientes y otras moléculas se realiza a través de la membrana tegumentaria que compone a la pared del parásito, esta característica los hace vulnerable al ataque de xenobióticos como los antihelmínticos o bien a los producidos por respuesta inmune del hospedero. Sin embargo, estos parásitos permanecen en los tejidos del hospedero por largo tiempo, como ya se mencionó debido a los diversos mecanismos de evasión que han desarrollado en contra de las respuestas de defensa del hospedero (Brophy y Pritchard, 1992) en donde las enzimas juegan un papel importante en especial la Glutación transferasas que ha sido considerada como el principal mecanismo detoxificante en los helmintos (Smith, 1992; Lighthowers, 1999).

1.3 Glutación Transferasas

La clasificación más general de las enzimas se basa en la función que desempeñan, por ejemplo las oxidorreductasas, encargadas de transferir electrones de una molécula donante a una receptora (reacciones redox), las transferasas, enzimas que mueven grupos activos de

una molécula a otra, las hidrolasas que permiten obtener monómeros a partir de polímeros complejos, las isomerasas que modifican espacialmente los sustratos, girando o moviendo las cadenas laterales y las ligasas, que sintetizan enlaces mediante el acoplamiento de sustancias de alto valor energético, como el ATP.

Las Glutación transferasas (GSTs, antes conocidas como Glutación-S-transferasas) son una familia de enzimas cuya función principal consiste en transferir el grupo tiol del péptido GSH (γ -glutamil-cistenil-glicina) a moléculas hidrofóbicas potencialmente dañinas para la célula, con el fin de hacerlas solubles en agua y luego desecharlas mediante diversas vías, tales como por ejemplo, la ruta del ácido mercaptúrico (Barnes et al, 1959, Booth et al 1961; Habig et al. 1974).

La reacción general se da como sigue: $\text{GSH} + \text{RX} \longrightarrow \text{GSR} + \text{HX}$,

y ésta puede realizarse por medio de un ataque nucleofílico, sustitución aromática, apertura de los anillos de epóxidos, adiciones reversibles de Michael, isomerizaciones o peroxidaciones (Armstrong, 1994); el ataque nucleofílico suele ser en contra de un átomo de carbono, pero puede también ser dirigido hacia el nitrógeno, sulfuros e incluso el oxígeno (Clark, 1989, Wilce y Parker, 1994). Las GSTs muestran poca especificidad hacia los sustratos hidrofóbicos que catalizan, pero presentan una alta afinidad por la porción glutamil del GSH.

Estas enzimas se han agrupado en familias de acuerdo a su localización dentro de las células: las mitocondriales, las asociadas a membranas microsomales o MAPEG (proteínas asociadas a membrana involucradas en el metabolismo de ecosanoides y glutación, por sus siglas en inglés) y las citosólicas. Las últimas se subdividen en clases de acuerdo a los sustratos que utilizan, su especificidad a inhibidores, por su secuencia primaria y criterios serológicos y genéticos (Snyder & Maddison, 1997). Algunas de estas clases de GSTs citosólicas son exclusivas de ciertos grupos, como las lambda (L), phi (F) o tau (U) en las plantas, delta (D) y epsilon (E) en insectos o las beta (B) en procariontes; mientras que otras están presentes en muchos tipos de organismos diferentes, como las pertenecientes a

las clases de tipo mu (M), alpha (A), pi (P), theta (T), sigma (S), zeta (Z) y omega (O), respectivamente.

En general, las GST citosólicas son dímeros compuestas por monómeros de 23 a 28 kDa con un promedio de 220 aminoácidos. Estos dímeros pueden o no tener subunidades idénticas (homo o heterodímeros). Cada monómero tiene un sitio catalítico con dos regiones, una de unión al GSH y otra que une al compuesto electrofílico, de tal forma que los monómeros podrían actuar independientemente (Figura 3), sin embargo, la enzima solo presenta actividad como dímero (Danielson y Mannervik, 1985).

El dominio de unión a GSH está localizado en la porción amino terminal y se encuentra conservada en todas las clases, presenta una estructura similar a la de la tiorredoxina compuesta de tres hélices alfa y cuatro hojas beta en un arreglo β - α - β - α - β - β - α , en donde el núcleo del dominio se conforma por el motivo $\beta\alpha\beta$, relacionado con la unión a cisteínas, el motivo $\beta\beta\alpha$ se relaciona con el reconocimiento y la unión a la porción γ -glutamil del GSH. Por otro lado, los residuos de aminoácidos de la hélice α_3 en conjunto con los de la hoja β_4 utilizan el grupo hidroxilo de la serina (clase theta), tirosina (clases mu, sigma, pi) o un coordinado entre tirosina y arginina (clase alpha) para realizar la activación del grupo sulfhidrilo de la cisteína del GSH. En promedio este dominio se compone de 80 residuos de aminoácidos y está muy conservado dentro de la familia de las GST. El segundo dominio, que se une a los sustratos hidrofóbicos y por eso es llamado sitio H, se encuentra en la región carboxilo terminal, y se compone exclusivamente de 4-7 hélices alfa; tiene de 87 a 210 residuos de aminoácidos, que son los que marcan las diferencias entre las afinidades por los sustratos y las interacciones que se pueden generar en las diferentes clases de GST (Armstrong, 1997; Eaton y Bammler, 1999; Wilce & Parker, 1994).

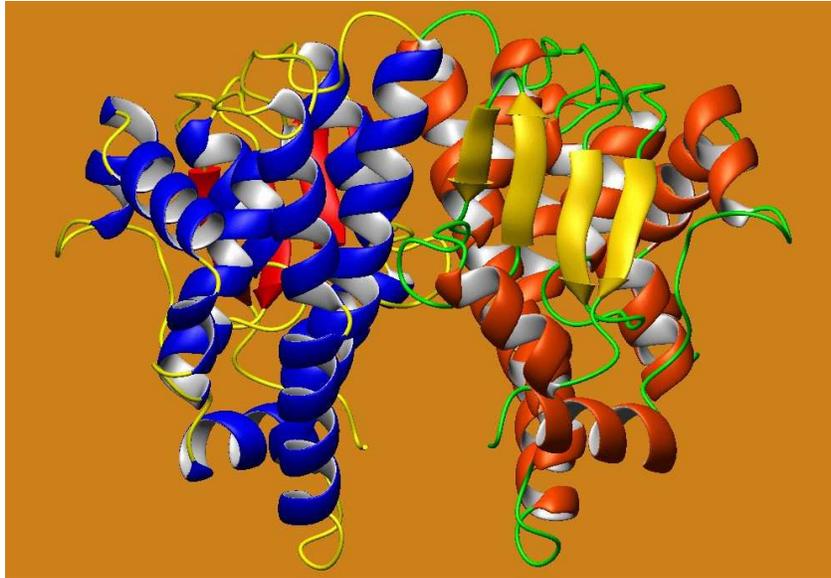


Figura 3.- Modelo computacional de una glutatión transferasa en su forma dimérica; del lazo izquierdo se aprecia el dominio de unión a compuestos hidrofóbicos compuesto de hélices alfa, mientras que del lado derecho se aprecia el dominio de unión al glutatión, compuesto por hélices alfa y hojas beta en un arreglo similar a tiorredoxinas (Tomado de www.biochem.szote.u-szeged.hu/.../protein3.htm)

Además de la clase a la que pertenecen, es común nombrar y mencionar a las GST según el peso molecular de sus monómeros y la especie animal a la que pertenecen; por ejemplo, para el caso de los helmintos se han reportado GSTs en nemátodos como *Ascaris lumbricoides* de 24, 25 y 26 kDa, asociados a las clases M y A, en *Heligmosomoide polygirus* de 23 y 24 kDa, que parecen ajustarse a la clase A; *Onchocerca volvulus* tiene una forma de 24 kDa con dos isoformas, que pueden asociarse a la clase P (Liebau et al., 1996a). También se han hallado GST en *Onchocerca gutturosa*, *Toxocara canis*, *Cooperia onchopora* entre otros (Pemberton & Barret, 1989; Brophy et al., 1990); en tremátodos se sabe que *Fasciola hepatica* presenta una GST de 26 y otra de 26.5 kDa, ambas parecidas a la clase M de mamíferos y que cuatro de las especies del género *Schistosoma* (*bovis*, *haematobium*, *japonicum* y *mansonii*) presentan una forma de 26 y otra de 28 kDa, cada una con isoformas que abarcan las clases A, M y P de la clasificación para mamíferos (O'leary et al., 1992). En el caso de cestodos, *Echinococcus granulosus* presenta una GST de 24 kDa, mientras que *E. multilocularis* presenta una de 25.5 kDa, ambas relacionadas con la clase M, *Moniezia expansa* tiene una forma de 24.5 kDa que se parece a las clases M y A (Brophy et al. 1989), y en *T. solium* se han reportado dos GST de 25.5 y 26.5 kDa, que

se ubican en las clases M y M-A respectivamente (Vibanco-Pérez y Landa, 1998; Vibanco-Pérez et al. 1999; Plancarte et al. 2004). Tal variedad de formas e isoformas dentro de estos organismos, sugieren heterogeneidad en cuanto a la variedad de funciones que tienen estas enzimas.

1.4 Cinética enzimática

Pese a que el estudio de las GST de helmintos ha adquirido mayor importancia a últimas fechas, la mayor parte de estos estudios se han enfocado en determinar el comportamiento de estas GSTs con diferentes sustratos y su sensibilidad a inhibidores, así como a determinar las K_M (Constante de Michaelis) para el sustrato universal, 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) y del GSH (γ -Glutamil-cistenil-glicina), dejando de lado otros parámetros cinéticos como la velocidad máxima (V_{max}), la constante catalítica o número de recambio (k_{cat}) y la constante de especificidad (k_{cat}/K_M), sus constantes de inhibición a inhibidores específicos de clase, los cambios en la estructura de la enzima sometida a diferentes condiciones de pH y temperatura, la determinación de pH y temperaturas óptimas, así como la determinación de sus mecanismos catalíticos, todos ellos importantes para poder entender el funcionamiento de cualquier enzima (Torres-Rivera y Landa, 2008; Cornish-Bowden, 2004; Segel, 1975).

Entre las características físicas y cinéticas que hay reportadas para GST de helmintos encontramos algunos puntos isoeléctricos, los cuales se localizan dentro de un amplio intervalo que va de 4.6 a 7.9, como es el caso de *Heligsomoides polygyrus* que presenta un pI de 7.9 para su GST de 24 kDa y de 5.8 para la forma de 23 kDa (Brophy, et al. 1994), en *Schistosoma mansoni* se reporta un pI de 7.4 para dos de sus formas, de 28.5 y 26 kDa, mientras que en *S. japonicum* la forma de 26.2 kDa tiene un pI de 5 (O'Leary et al. 1992; Walker et al. 1993); *Clonorchis sinensis* en su GST de 25.1 kDa presenta un pI de 5.6 y para *Taenia solium*, se reporta un pI de 7.1 para la forma de 26.5 kDa (Plancarte et al. 2004). Estos parámetros fueron obtenidos mediante una de dos formas: por la técnica de cromatoenfoque, o prediciéndolos a partir de su estructura primaria mediante bioinformática (Torres-Rivera & Landa, 2007).

Las V_{\max} reportadas se limitan a cestodos y presentan un amplio margen de variación (11.1-74.0 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$), mientras que las K_M tanto para CDNB y GSH se han calculado en protozoarios, helmintos, trematodos y cestodos, generalmente para el sustrato CDNB, donde la K_M se encuentra por debajo de 1.5mM (Brophy et al, 1989; Libeau, 1996; Vibanco-Perez & Landa, 1998; Vibanco-Perez et al, 2002; Plancarte et al., 2004). De la misma forma, los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_M están reportados solo para el nemátodo *Setaria cervi* (1515 s^{-1} y $6.83 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) y para los cestodos *E. multilocularis* y *T. solium* (GST26.5kDa recombinante (Gupta et al., 2007; Liebau et al., 1996b; Plancarte et al., 2004).

En el presente trabajo se determinaron los parámetros cinéticos de la glutatión transferasa recombinante de 25.5 kDa de *T. solium* (GST_{25.5r}) como una aproximación para entender su comportamiento al igual que el papel que esta enzima desempeña dentro del parásito y en la relación hospedero-parásito.

II. JUSTIFICACIÓN

Debido al problema de salud pública que representan la teniosis y la cisticercosis, tanto en México como en otros países en vías de desarrollo, se hace necesaria la búsqueda de estrategias que permitan controlar, disminuir o erradicar al agente causal: la *T. solium*.

Por otro lado, se ha descubierto que la familia de las GST no solo cumple la función de mecanismo desintoxicante, sino que también puede verse involucrada en otros procesos, tales como la modulación de señales, catabolismo de aminoácidos aromáticos, modulación de canales iónicos y transporte de algunas moléculas como la bilirrubina, el grupo hemo, esteroides, hormonas y sales biliares (Armstrong, 1997; Cho et al, 2001; Mannervik, 1985; Wilce y Parker, 1994).

Por otro lado, hemos encontrado que las dos GSTs que componen el sistema de desintoxicación en *T. solium*, son esenciales para la vida del parásito, debido a que experimentos de vacunación con ambas formas logran reducir hasta un 90% la carga parasitaria en el modelo experimental de cisticercosis de *T. crassiceps*-ratón (Vibanco-Pérez, 2002). Lo último mencionado y el hecho de que las GST son el principal mecanismo desintoxicante que utilizan estos parásitos para contrarrestar los mecanismos de defensa del hospedero, las hacen moléculas interesantes para utilizarlas como blancos para destruir a la *T. solium* y otros parásitos.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los parámetros cinéticos de la Glutación transferasa recombinante de *Taenia solium* de 25.5 kDa, así como establecer el rango de temperatura y el valor de pH óptimos para su actividad.

3.2 Objetivos particulares

1. Transformar bacterias *E. coli* con el plásmido de expresión pTr99c-GST25.5.
2. Producción de la GST25.5 recombinante de *T. solium* (GST_{25.5r}).
3. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima:
 - Actividad específica para el sustrato CDNB
 - V_{\max} y K_M para GSH y el sustrato CDNB
4. Determinar la estabilidad de la enzima a la temperatura y el valor de pH óptimo para la actividad.
5. Calcular el punto isoelectrico (pI), la constante catalítica (k_{cat}) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M)
6. Confirmar la clase a que pertenece la enzima mediante dos marcadores específicos para la clase Mu.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Material Biológico

Se utilizó la cepa de bacterias *Escherichia coli* JM105 (thi, rpsL, sbcB15, hsdR4, supE, (lac-proAB,)/F' [traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]) de la casa Invitrogen. El vector de expresión pTrc99A-GST25.5 que produce la enzima recombinante, clonada bajo el control del promotor trc (trp-lacUV5), regulada por lacI^q (Vibanco-Perez, 2000).

4.2 Reactivos químicos y medios de cultivo

1-Cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB), 1,2-dicloro-4-nitrobenzono (DCNB) y el ácido etacrínico (AE) fueron obtenidos de Aldrich. El glutatión reducido (GSH), la ampicilina y estreptomycin de los laboratorios de Sigma y la columna GSH-sefarosa 4B de Amersham Pharmacia Biotech. El isopropil tio-β-D-galactosidasa (IPTG) fue provisto por Sigma. Para crecer las bacterias se utilizó medio de cultivo de Luria-Bertani (LB) compuesto de triptona 1%(v/v), extracto de levadura 0.05% (v/v) y NaCl 1% (v/v), complementado con Ampicilina y/o Estreptomycin; estos reactivos se encontraban disponibles en el laboratorio de fueron de la mayor pureza posible. El medio SOC (Triptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM) se obtuvo de la casa comercial Invitrogen.

4.3 Transformación de bacterias

Las bacterias de *E. coli* JM105 químicamente competentes de la casa Invitrogen fueron transformadas con 10 ng del vector pTrc99A-GST25.5 e incubadas a 4°C durante 30 minutos, posteriormente las bacterias fueron sometidas a un golpe de calor incubándolas a 42°C durante 30 segundos y de inmediato se le añadieron 200 μl de medio SOC para ser incubadas a 37°C en agitación por una hora; finalizado ese tiempo se sembró el 50% de las bacterias en una placa de medio sólido de Luria Bertani (LB) con-Ampicilina (100mg/ml) /estreptomycin (30 mg/ml) y se crecieron toda la noche a 37°C. Para la selección de las clonas que contuvieran el plásmido de expresión, se realizó un cultivo bacteriano en LB líquido de toda la noche, se obtuvo el ADN plasmídico (ver método) de la bacteria. Los ADN plasmídicos junto con 2 oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonación del

vector se sometieron a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y geles de agarosa con bromuro de etidio, para identificar las clonas que tienen la GST25.5 clonada.

4.4 Expresión y purificación de la GST 25.5 recombinante

Las bacterias conteniendo el plásmido (pTrc99A-GST25.5) se crecen en 10 ml de medio LB-ampicilina, con agitación (250 rpm) a 37°C durante toda la noche. Este cultivo se transfiere a medio LB-ampicilina (500 ml) y se crece como antes hasta que el crecimiento bacteriano alcanza una $OD_{600nm} = 0.4$, en este momento se adiciona IPTG 2mM para inducir la expresión de la enzima recombinante. Después de crecer 8 horas, se recolectaron las bacterias centrifugando el cultivo a 1,200 g. Las bacterias fueron resuspendidas en PBS pH 7.4, 10% Tritón, EDTA 2.5 mM, 0.006% de PMSF y lisadas con un Polytron (Brinkman Instruments, mod VC130PB) a máxima velocidad durante un minuto en hielo, este paso se repitió por cuatro ocasiones. La suspensión obtenida se centrifugó a 10,000 g durante 15 min, a 4°C y el sobrenadante recuperado fue diluido 1:2 v/v con amortiguador de columna (PBS, 7.4 y 1% de Tritón) y filtrado con una membrana Millipore de 22 μ m. Posteriormente, 10 ml de este sobrenadante fueron incubados por 1 hr en agitación lenta con 2 g de sefarosa 4B acoplada a GSH, previamente equilibrada con 8 ml de un amortiguador de PBS y 1% de Tritón. Terminado el tiempo, se montó esta misma columna de sefarosa B4 y se hizo pasar el resto del extracto bacteriano tres veces para procurar la máxima retención de la enzima. La columna fue lavada con 5 volúmenes de PBS pH 7.4 y las proteínas unidas a la sefarosa-GSH fueron eluidas con una solución de GSH 5mM en Tris HCL 50mM, pH 8.0. Las fracciones colectadas de la columna se midieron espectrofotométricamente a 280nm, las que contenían proteínas se juntaron y concentraron hasta un volumen final de aproximadamente 2 ml. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford, estableciendo una curva patrón de albúmina bovina y la pureza de la enzima fue observada en geles de poliacrilamida con SDS. La enzima obtenida se guardó en alícuotas de 200 μ l (0.8 mg/ml) y se almacenaron a -20°C hasta su uso (Vibanco-Perez, 2000).

4.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

Se tomó el equivalente a 10 μg de proteína de cada una de los extractos a separar y de 5 μg de enzimas puras. Las proteínas se mezclaron 1:1 con amortiguador de muestra (0.5g de dodecil-sulfato de sodio, EDTA (0.370 g), glicerol (5ml), azul de bromofenol (0.02%) disueltos en Tris-HCl 0.05M, pH 6.8) y se incubaron a 100°C durante 2 minutos para ser separadas en el PAGE-SDS al 12.5%. El voltaje usado para la separación de las muestras fue de 100 V constante por una hora. Las bandas separadas de las muestras se visualizaron mediante la tinción con una solución de azul de Coomassie (metanol 50%, azul de Coomassie R-350 0.05%, ácido acético 10%) por 2 horas, y los geles posteriormente de destiñeron con una solución al 10% de ácido acético glacial a temperatura ambiente, hasta que las bandas se hicieron visibles (Laemmli, 1970).

4.6 Ensayos de actividad enzimática

Para todos los ensayos de actividad, se utilizaron 5 μg de la enzima en amortiguador de fosfato de potasio 100mM, pH 6.5 con EDTA 1 mM, a una temperatura de 25°C en un volumen de reacción de 1 ml, usando GSH reducido como sustrato, monitoreando los cambios en la absorbancia durante tres minutos en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro de Amersham a una longitud de onda de 340 nm. El segundo sustrato utilizado, el CDNB se preparó como una solución concentrada de 500mM en etanol, del cual se añadió el volumen necesario para hacer una mezcla de reacción de CDNB 1mM, manteniendo siempre la concentración de etanol por debajo del 5% e iniciando la reacción de esta forma (Habig, 1981). Para el cálculo de la actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción descrito para CDNB en la literatura (Brophy, et al 1974). Los ensayos con los marcadores de clase para la GST, el DCNB y el AE se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Condiciones utilizadas para realizar los ensayos con los marcadores de clase para la GST_{25.5r}

Substrato	Segundo substrato (mM)	pH	GSH (mM)	Longitud de onda (nm)	Coefficiente de extinción (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
1-Cloro-2,4-dinitrobenceno	1	6.5	1	340	9.5
1,2-dicloro-4-nitrobenceno	1	7.5	5	345	8.5
Acido etacrinico	0.2	6.5	0.25	270	5.0

Para determinar los parámetros de la constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) tanto para el GSH como para el CDNB, se realizaron ensayos que permitieran determinar las concentraciones saturantes de ambos sustratos, a partir de ahí, se fijó uno de los sustratos en su concentración saturante y se varió el otro en un rango de 0.1-7 mM, con el objetivo de observar saturación en la actividad. Cada punto se realizó por triplicado. Con los puntos de las gráficas de Michaelis, se realizaron gráficas de dobles recíprocos, a partir de los cuales se calcularon los valores de K_m y V_{max} , utilizando el programa Origin 7 para los análisis. Los valores de K_{cat} y el radio K_{cat}/K_m fueron calculados a partir de fórmulas ya establecidas, mientras que el punto isoeléctrico teórico (pI) se calculó utilizando la secuencia primaria de la enzima con el programa Expassy (<http://www.expasy.ch/>) (Segel, 1975; Cornish-Bowden, 2004).

4.7 Efectos de pH y estabilidad de la enzima ante la temperatura

Para determinar el pH óptimo para la actividad de la GST_{25.5r} de *T. solium* se utilizaron tres amortiguadores diferentes: el primero se utilizó una mezcla de ácido cítrico 0.1M y citrato de sodio 0.1M, para el intervalo de pH de 4 a 6, el segundo se utilizó fosfato de potasio 100mM para el intervalo de 6.5-8.5 y en tercer lugar, una mezcla de Tris base y Tris HCl a una concentración de 100 mM para el intervalo de pH 9-12; a cada amortiguador se le añadió además EDTA 1mM, CDNB 1mM y GSH 1mM, a una temperatura de 25°C; cada punto fue tomado con una diferencia de 0.5 en pH del anterior. La enzima fue mantenida en hielo y se adicionó a la mezcla el equivalente a 5 µg de enzima para iniciar la reacción y



monitoreando ésta por tres minutos, midiendo a intervalos de 15 segundos en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro de Amersham a 340 nm.

Para determinar la estabilidad de la proteína respecto a la temperatura, se utilizó la misma mezcla de reacción anterior, sólo que el pH se ajustó a 6.5 para todos los ensayos. Las temperaturas utilizadas fueron 4, 20, 30, 37, 40, 50, 70 y 100°C. Este ensayo se llevó a cabo incubando la enzima por 3 minutos en la temperatura descrita y se midiendo la reacción por 3 minutos. Cada punto se determinó realizando ensayos por triplicado.

V. RESULTADOS

5.1 Purificación de la enzima

La enzima GST de 25.5 kDa recombinante de *Taenia solium* producida en las bacterias *E. coli*, se purificó pasando un extracto de las mismas a través de una columna de GSH acoplado a sefarosa 4B. En la figura 4 se muestran los pasos de la purificación en un SDS-PAGE al 12.5% teñido con azul de Coomassie. En el carril número 1 se puede observar el conjunto de proteínas bacterianas, cuyos pesos moleculares van desde los 10 hasta los 200 kDa, aproximadamente. El carril número 2 presenta un extracto de bacterias inducidas con IPTG y crecidas por 8 h que producen la enzima recombinante, se observa un conjunto de proteínas similar al observado en el carril 1, pero pudiéndose apreciar un aumento de la proteína en la región que corresponde al peso molecular de 25 kDa. En el carril 3 se observa el conjunto de proteínas bacterianas después de haber pasado por la columna de GSH-Sefarosa 4B, donde la banda de 25.5 kDa desaparece, para hacerse visible en el carril número 4, que corresponde a la fracción eluída de la columna con 5mM de GSH en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. En el carril 5 se muestra el resultado de concentrar la fracción eluída obtenida de la columna. Finalmente, el carril 6 muestra la enzima GST26.5 kDa recombinante de *T. solium*, que en este caso fue utilizada como marcador de peso molecular (Torres-Rivera, 2004, Plancarte et al. 2004).

El rendimiento de la purificación de la enzima GST2.5 kDa recombinante se indica en la tabla 2, que muestra que la enzima se purificó 6 veces a partir del extracto crudo de la bacteria, además el método produce una enzima funcional con una actividad específica de 2.81 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ determinada con el sustrato CDNB.

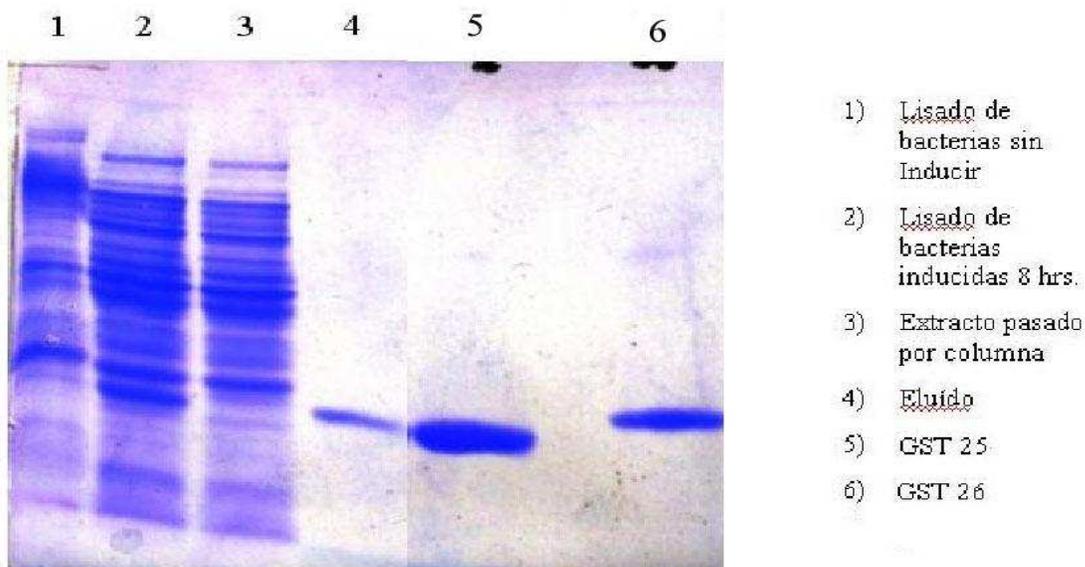


Figura 4.- PAGE-SDS al 12.5% mostrando la purificación de la GST_{25.5} recombinante de *T. solium*. Carril 1, lisado de bacterias *E. coli* sin inducir. Carril 2, lisado de bacterias recombinantes inducidas con IPTG durante 8 horas. Carril 3, lisado de bacterias pasado a través de la columna de GSH-Sepharosa. Carril 4, fracción eluida de la columna de GSH. Carril 5, GST 25.5 kDa concentrada. Carril 6, GST 26.6 recombinante de *T. solium* utilizada como marcador de peso molecular.

Tabla 2.- Rendimiento obtenido mediante el proceso de purificación de la GST_{25.5r} de *T. solium*

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (U)	Rendimiento (%)	No. De purificaciones
Extracto bacteriano crudo	12.5	47.5	0.479	22.76	100	1
GST 25.5	1.5	1.017	2.81	2.8603	7.95	6

5.2 Parámetros cinéticos de GST_{25.5r}.

La determinación de los parámetros de K_m y V_{max} se llevó a cabo mediante ensayos de actividad para GST como se describe en la sección de métodos. La cantidad de 5 μ g de la enzima usada para los ensayos, se determinó mediante ensayos de actividad en los cuales se alcanzó el pico máximo de la actividad con esta cantidad de enzima (Vibanco-Pérez, 2000). Puesto que esta enzima presenta dos moléculas que interaccionan con la enzima el cosustrato (GSH) y el sustrato (CDNB) para determinar la concentración saturante de cada uno, se procedió a mantener una concentración constante de uno y variando la concentración del otro, y viceversa, encontrando que para la GST_{25.5r} las concentraciones

saturantes de GSH y CDNB fueron de 5 mM. Posteriormente para la obtención de la K_m y V_{max} , se fijó uno de los sustrato del que se van a determinar los parámetros cinéticos en un intervalo que va desde 0.1M hasta obtener la saturación de la actividad, que tanto para GSH como para CDNB fue de 7 mM.

Para el cosustrato GSH, se obtuvo una gráfica de tipo hiperbólico (Figura 5). Para construir la gráfica de dobles recíprocos, se tomó el inverso de los valores de la actividad de cada punto y se graficaron contra el inverso de las concentraciones del segundo sustrato (CDNB), con lo que se calculó una $k_{M(GSH)}$ de 0.905 mM y una $V_{max(GSH)}$ de 10.2 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$. En la gráfica se puede observar que la enzima aumenta rápidamente sus valores de actividad entre 0.1 y 0.8 mM, alcanzando el 50% de su máxima velocidad en las concentraciones cercanas a 1mM y a partir de aquí el incremento en la actividad se hace mas lento, hasta alcanzar un nivel máximo a 4 mM, para luego tener un leve descenso a concentraciones superiores, en donde la gráfica se torna estacionaria.

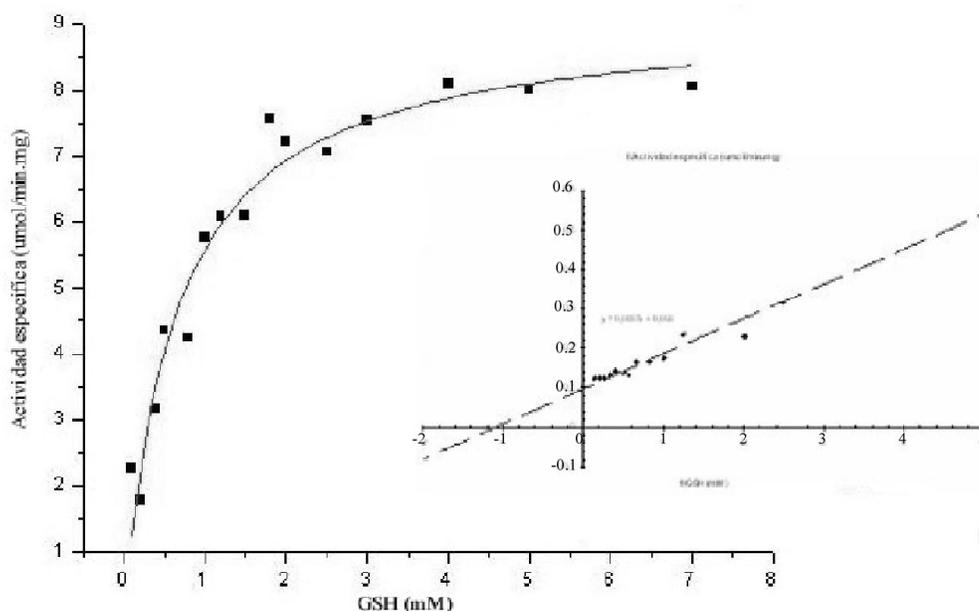


Figura 5.- Determinación de la actividad específica para la GST_{25.5r}. Para el ensayo de actividad de la enzima se utilizaron diferentes concentraciones de GSH de 0-7 mM, manteniendo constante la concentración de CDNB 5 mM. La gráfica interna muestra el doble recíproca de los datos de concentración de GSH y de las velocidades registradas en la primera grafica para obtener los valores de $k_{M(GSH)}$ y $V_{max(GSH)}$.

Para el caso del sustrato CDNB, la gráfica obtenida fue de tipo hiperbólico (Figura 6), y la gráfica del doble recíproco indican una $k_M(\text{CDNB})$ de 1.38 mM y una $V_{\max}(\text{CDNB})$ de 12.04 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$. Se observa que el incremento de la actividad es muy marcado entre las concentraciones de 0.1 y 0.8 mM, mientras que el 50% de la velocidad máxima se alcanza a concentraciones entre 1-1.2 mM, para luego tener un incremento notorio en 1.4 y 1.5 mM y alcanzar su nivel máximo en 5mM para luego volverse estacionaria a concentraciones de 6 y 7mM.

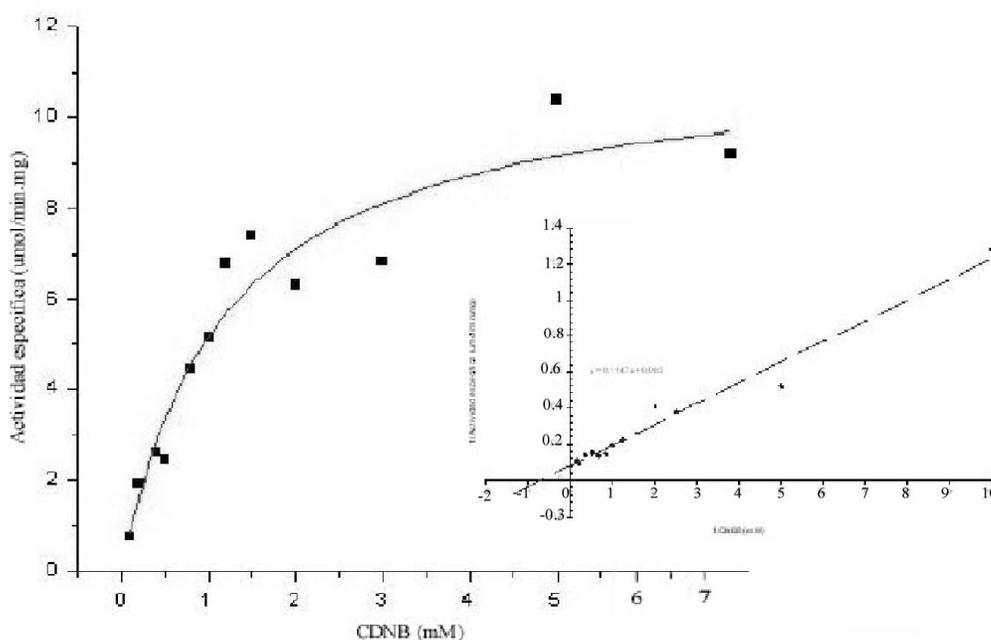


Figura 6.- Determinación de la actividad específica de la GST_{25.5r} a diferentes concentraciones de CDNB; la gráfica interna muestra el resultado de graficar el inverso de la concentración contra el inverso de las velocidades obtenidas en la primera gráfica, que permiten calcular los valores de $k_M(\text{CDNB})$ y $V_{\max}(\text{CDNB})$.

El valor de k_{cat} para CDNB se calculó tomando en cuenta la $V_{\max}(\text{CDNB})$ y la concentración utilizada de la enzima por ensayo (5 μg) dando como resultado 5.119 s^{-1} . Finalmente, la eficiencia catalítica de la enzima para el CDNB se obtuvo mediante la fórmula $k_{\text{cat}}(\text{CDNB})/k_M(\text{CDNB})$ para CDNB, obteniéndose el valor de $4.249 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En la tabla 3 se presenta un resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para la GST_{25.5r}.

Tabla 3.- Parámetros cinéticos calculados para la GST_{25.5r} de *T. solium*.

Parámetro	Valor encontrado
Actividad específica	2.81 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$
k_M (GSH)	0.905 mM
V_{max} (GSH)	10.204 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$
k_M (CDNB)	1.38 mM
V_{max} (CDNB)	12.04 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$
k_{cat}	5.119 s^{-1}
k_{cat}/k_M	4.249 $\times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

5.3 Determinación de clase

Para confirmar la clase a la que pertenece la GST_{25.5r}, se utilizaron dos sustratos que fueron 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (DCNB), marcador característico de clase M y el ácido etacrínico (AE) marcador de clase P, que es uno de los sustratos con el cual la GST_{25.5r} presenta gran actividad, después del CDNB (Vibanco-Pérez et al, 2002). Los resultados de actividad específica obtenidos de estos ensayos se muestran en la tabla 4. El DCNB solo es metabolizado por las GST de tipo M, por lo que es muy buen marcador; por otro lado, el AE presenta rangos de actividad según las diferentes clases de GSTs, siendo de 0.01 a 1.2 típico de clase A, de 0.08 a 0.6 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ característico de la clase M, mientras que de 0.9 a 4 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ se relaciona con GST de tipo P (Mannervik et al. 1985).

Tabla 4.- Actividad específica de la GST_{25.5r} con diferentes sustratos.

Sustrato	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$)
CDNB (1-cloro-2,4-nitrobenceno)	2.895
DCNB (1,2-dicloro-4-nitrobenceno)	0.94
AE (ácido etacrínico)	1,506

5.4 Efecto del pH sobre la actividad de la GST_{25.5r}

La actividad óptima de la GST_{25.5r} se ubicó en el pH 8, debido a que se puede observar un decremento en la actividad a cada lado de este pH. Se observa que la enzima mantiene

actividad en un intervalo más amplio de pH de 6.5 a 10.5 (Fig. 7). A pH 5 y 6 la actividad de ésta es sólo un 15% del máximo obtenido a pH 8, a pH 7 la actividad es de un 38%, mientras que a pH 7.5 es de un 52%; a pH 8.5 la actividad es de un 90%, mientras que a 9, decae hasta un 67%; en pH 10 solo se tiene el 45% de la actividad máxima, y en el pH 11, un 23.5%. En la gráfica también se puede apreciar que a pH de 4 y 4.5, así como al pH 12, no se detecta ninguna actividad de la GST_{25.5r}.

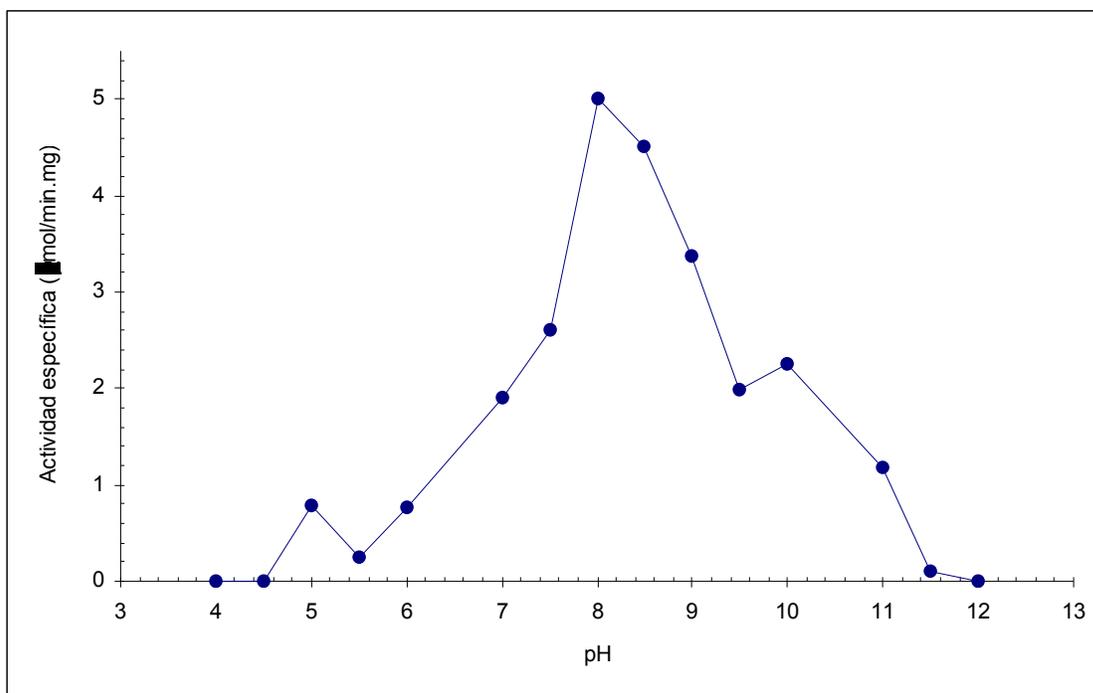


Figura 7.- Efecto del pH sobre la actividad de la GST_{25.5r} de *T. solium*. La enzima fue incubada a diferentes pHs en el rango de 4 a 12. El valor máximo de actividad se observa a pH de 8. Todos los ensayos se realizaron a 25°C, en 1mM de GSH y 1mM CDNB.

5.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la GST_{25.5r}

La Figura 8 muestra que la actividad de la enzima alcanza su punto máximo a 40°C, aunque mantiene su actividad en un rango de 20-40°C. La figura muestra que a 4°C la enzima pierde el 72% de su actividad, mientras que a las temperaturas de 50°C; 20 y 30°C, la enzima conserva el 59% de su actividad, respectivamente. A 37°C, la enzima tiene un 85% de su actividad máxima, que considerando el error estándar en la muestra, resulta igual al máximo. La enzima también se sometió a temperaturas de 70°C, en donde ésta pierde el 90% de su actividad mientras que se inactiva por completo a 100°C.

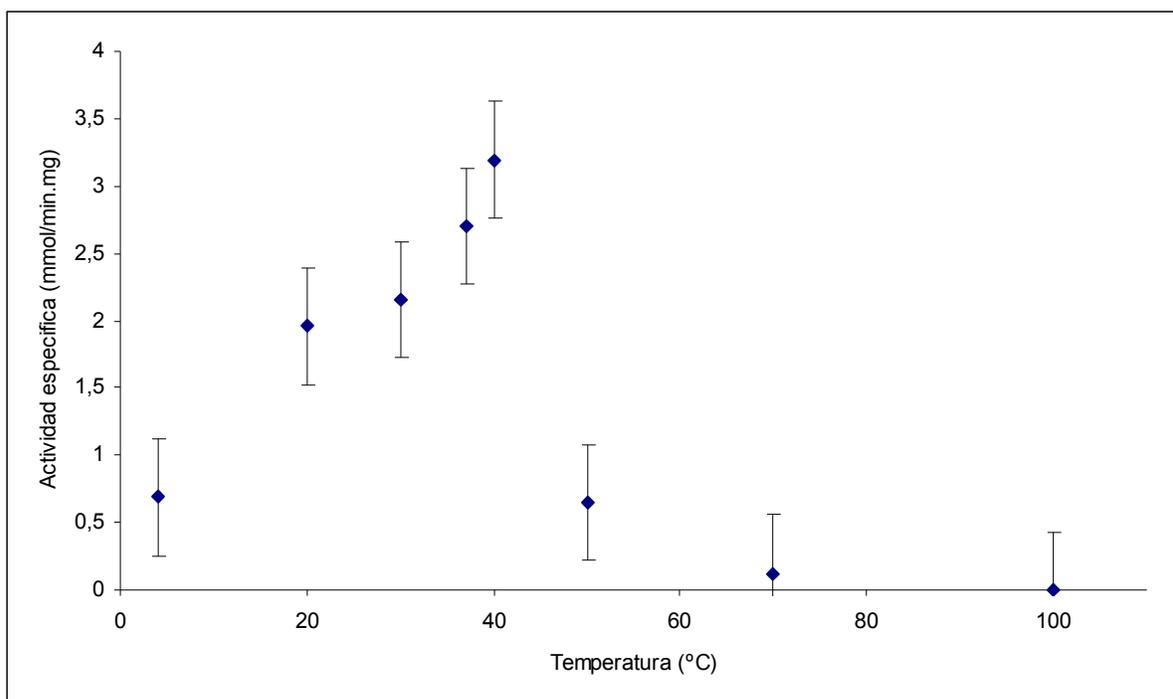


Figura 8.- Estabilidad de la estructura y actividad de la GST_{25.5r} respecto a la temperatura. La enzima fue incubada a diferentes temperaturas en el rango de 4 a 100°C. Las muestras fueron incubadas por 3 minutos antes de iniciar la reacción para determinar su actividad residual.

5.6 Determinación de pI

El valor de pI fue determinado a partir de la secuencia primaria de la enzima, mediante cálculos computacionales utilizando el programa Expassy (<http://www.expasy.ch/>) dando como resultado el valor de 6.12 (ver tabla 5).

Tabla 5.- Resumen de las propiedades físicas determinadas para la GST_{25.5r}

Parámetro	Valor encontrado
pI	6.12
pH óptimo	8
Temperatura óptima	40°C

VI. DISCUSIÓN

La Glutación transferasa es una enzima esencial para los helmintos, ya que no solo cumple la función de desintoxicación para estos parásitos de xenobioticos diversos mediante la reacción de conjugación de GSH a estos compuestos para inactivarlos y prepararlos para ser excretados, sino que además esta involucrada en diversos procesos como la señalización, la modulación de señales, el transporte a través de canales iónicos y el transporte de otras moléculas. Sin embargo, aunque ésta enzima realiza lo antes mencionado, está poco estudiada en helmintos, por lo que esta trabajo se avocó a determinar los parámetros cinéticos de una GST_{25.5r} de *Taenia solium*, así como establecer el intervalo de temperatura en el que su estructura se mantiene y el valor de pH óptimos para su actividad.

Para esto se produjo la enzima recombinante pura, mediante los procesos de 1) transformación de bacterias *E. coli* con un plásmido que expresa la enzima y de 2) purificación de esta mediante una cromatografía de afinidad con GSH. La obtención de la enzima pura se logró aprovechando la propiedad que tienen estas enzimas de unir GSH, para lo cual lisados de bacterias que expresan la proteína son pasados por una columna de GSH acoplado a sefarosa 4B. Como se observa en el SDS-PAGE de la Figura 4, se obtuvo banda única que corresponde al peso molecular esperado monomérico de 25.5 kDa. Por otro lado, el rendimiento obtenido para la purificación de la enzima fue de 1 mg/500 ml de cultivo bacteriano, lo cual está debajo de lo esperado para una proteína recombinante, comparándola con otras GSTs producidas en este sistema (Vibanco-Pérez, 2000). Esto puede explicarse debido a que el plásmido utilizado es de bajo número de copias por célula o que la enzima es tóxica para la bacteria entre otras.

La actividad específica para la GST_{25.5r} determinada para CDNB que es el sustrato universal para estas enzimas fue de 2.81 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$, el cual se encuentra dentro del mismo orden de magnitud de otras GSTs de cestodos previamente reportadas, como la GST de 25.5 kDa de *E. multilocularis*, y es entre dos y tres veces menor que lo reportado para las GSTs de *S. solidus*, cuyas formas pesan 24 kDa con actividades de 3.10, 4.60 y 6.70 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ respectivamente, y entre 7 y 9 veces menor a las reportadas para *M. expansa*

que presenta formas de 24.5 y 25 kDa con actividades de 20.8, 20.9, 24.7 y 25.8 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$, respectivamente (Brophy et al.1989a; Brophy et al. 1989b; Liebau et al. 1996b). Comparando este valor de la GST_{25.5r} con GSTs de helmintos trematodos, resulta que es tres y media veces mayor al reportado para *C. sinensis* en su forma de 25 kDa (0.79 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$), 15 veces menor que la que presenta la forma de 26 kDa de *S. mansoni* (44.0 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) y 16 veces menor que la que se observa en *S. cervi* cuya GST tiene un peso de 25.8 kDa (46.9 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) (Brophy, 1994; Hong, et al. 2001; Walker, et al. 1993). Aquí cabe mencionar que la *T. solium*, también presenta una GST26.5 kDa con características de Clase Alfa y Mu que tiene una actividad de 88.3 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ (Plancarte et al. 2004). El significado de este valor de actividad específica es que aunque el rendimiento no fuera el esperado, se obtuvo una enzima de buena calidad para poder realizar los siguientes ensayos (30% mejor al reportado por Vibanco-Pérez en el 2000) y su importancia para el parásito, aunque no sea tan alta como algunas otras determinadas en céstodos y tremátodos, es que continúa desempeñando la función desintoxicante con la eficiencia esperada para una enzima metabólica con la posibilidad de utilizar una amplia variedad de compuestos electrofílicos como sustratos.

Se sabe que la GST_{25.5r} pertenece a la clase Mu, sin embargo, en este trabajo como parte de la caracterización de la enzima recombinante producida, se utilizaron dos sustratos para confirmar la clase de la enzima, el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (DCNB, sustrato clásico para las de clase M) y ácido etacrínico (ETA, sustrato clásico para las GST P), pero que se ha reportado que es utilizado con alta eficiencia por las de clase M. Los resultados de actividad obtenidos con la GST_{25.5r} producida con los sustratos (CDNB, DCNB y ETA) fueron 2.81, 0.94 y 1.50, respectivamente, resultados que al compararlos con los datos reportados para esta enzima con los mismos sustratos (2.1, 0.49 y 0.609 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) fueron del mismo orden de magnitud (Vibanco-Pérez et al., 2002). Los resultados mostrados anteriormente nos indican que la GST_{25.5r} producida presenta las mismas características que la reportada previamente. Sin embargo y en base a los datos reportados anteriormente por Mannervik y colaboradores en 1985, el resultado ubica a GST_{25.5r} dentro del rango de actividad de GST tipo P. Esto pudiera plantear dudas sobre la clase a la que pertenece esta GST en particular, sin embargo, el hecho de que sea capaz de conjugarse con el DCNB la ubica exitosamente dentro

de la clase M, al igual que sus rangos de actividad para CDNB, TFBO (*trans*-4-fenil-3-buten-2-ona), BSF (bromosultaleína) y CHP (hidroperóxido de cumeno), reportados por Vibanco-Pérez en 2002. La clase Mu es reconocida dentro de las GST de mamíferos por la presencia de un característico “lazo Mu”, ubicado entre la hoja $\beta 2$ y la hélice $\alpha 2$, cuya presencia se propone le confiere estabilidad estructural a esta clase de GSTs (Wilce y Parker, 1994).

Como siguiente objetivo se procedió a determinar los parámetros cinéticos GST_{25.5r}. Se obtuvo el valor para la V_{\max} (CDNB) que fue de 12.048 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, mientras que la K_M (CDNB) fue de 1.38 mM, valores que concuerdan con lo encontrado previamente para esta enzima (V_{\max} (CDNB) de 11.1 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ y K_M (CDNB) de 3.3 mM, respectivamente) (Vibanco-Perez et al., 2000. Comparado estos valores con GST de otros parásitos, se observa que la K_M es menor al reportado para otras GST de 25 kDa como en *P. falciparum*, *P. vivax*, *S. cervi* y la forma de 26 kDa de *T. solium* (2.0, 2.1, 2.22 y 2.0 mM respectivamente), indicando que la afinidad de la enzima a este sustrato es mayor que en otras GST parecidas, aunque GSTs de 25 y 25.5 kDa en *C. sinensis* y *E. multilocularis* reporta mayor afinidad hacia el CDNB (0.15 y 0.32 mM) (Byoung-Kuk et al. 2007; Gupta et al. 2007; Liebau et al. 1996a; Liebau et al. 2002; Plancarte et al. 2004; Wu et al. 2007). En cuanto a la V_{\max} (CDNB), muchos de los valores reportados se han dado para fracciones completas y no para proteínas puras (Morello, et al. 1982; Brophy et al. 1989a). En cestodos, se tiene descrito un valor de V_{\max} (CDNB) de 32.3 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ para una GST de *M. expansa* y de 74.0 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ para la forma de 26.5 kDa de *T. solium* (Brophy et al. 1989a; Plancarte et al. 2004).

En contraste se obtuvo un valor de V_{\max} (GSH) para la GST_{25.5r}, que fue de 10.20 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{m}$, valor comparable con la V_{\max} (GSH) de 77.0 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ reportado para la GST 6.5 kDa de *T. solium* (Plancarte et al., 2004). En cuanto a la K_M (GSH) obtenida de 0.9 mM, el valor sorpresivamente se encuentra por encima de lo reportado para otros parásitos como *P. falciparum*, *P. vivax*, *S. cervi* y *S. mansoni*, que van desde 0.16 a 0.61 mM, pero es idéntico al reportado para GST 26.5 de *T. solium* (Byoung-Kuk et al. 2007; Gupta et al. 2007; Liebau et al. 2002; Plancarte et al. 2004; Walter et al. 1993). Este resultado sugiere

que las GST de *T. solium* no presentan tanta afinidad por el GSH como otras GSTs de parásitos, sin embargo al presentar afinidad similar entre si las dos GSTs de *T. solium*, muestra que ambas son capaces de utilizar el sustrato con la misma eficiencia dentro del parásito.

Como es sabido estas enzimas conjugan el GSH (cosustrato) a diversos xenobioticos (sustrato) por lo en cierta manera el valor menor obtenido para la K_M (GSH) versus el hallado para la K_M (CDNB), tiene lógica y puede explicarse en base a la gran afinidad que tiene esta enzima para el GSH, contra la regular afinidad que tiene la enzima por el segundo sustrato (xenobioticos), lo que podría entenderse el porque puede utilizar una mayor variedad de éstos (Cornish-Bowden, 2004; Segel, 1975).

El valor de k_{cat} calculado fue de $5.11s^{-1}$, valor que es muy similar a los reportados para los cestodos *E. multilocularis* y la forma de 26 kDa de *T. solium* que fueron 3.25 y $4.30 s^{-1}$ respectivamente (Liebau et al. 1996b; Plancarte et al. 2004). En general las enzimas metabólicas tienen rangos de $k_{cat} > 1$, y lo normal son valores de 10^1 a $10^4 s^{-1}$, aunque estos valores también se encuentran determinados por la concentración del sustrato dentro de la célula y por la cooperatividad que exista en la misma enzima, dado que por ejemplo en los dímeros que conforman las GST, la unión del sustrato al sitio activo de uno de los monómeros resulta más fácil si en el otro monómero ya se ha unido el sustrato; además, las enzimas que utilizan dos sustratos deben esperar a que el segundo sustrato se una para poder realizar una catálisis exitosa. El valor de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M (CDNB)) de $4.24 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$ obtenido para la GST_{25.5r} es comparable al reportado tanto para la GST de *M. expansa* como para la forma de 26 kDa de *T. solium*, de 6.83×10^5 y $2.15 \times 10^3 M^{-1}s^{-1}$ respectivamente. Puesto que el límite máximo de este valor para superenzimas se ubica alrededor de $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$. De nuevo, este resultado nos confirma que el sitio H de estas enzimas permite utilizar diversos sustratos hidrofóbicos. Juntos estos valores (k_{cat} y k_{cat}/K_M (CDNB)) determinan la eficiencia de la enzima para poder cumplir su función y en el caso de las GST los valores obtenidos son lo que se esperaba de una enzima metabólica que requiere tanto velocidad para poder metabolizar los compuestos hidrofóbicos o los ROS así

como ser poco discriminativa para poder utilizar una mayor variedad de tales compuestos como sustratos.

El pH óptimo para la enzima fue de 8, sin embargo la enzima presenta actividad en el intervalo de pH entre 7.5 a 9, cuyos valores máximos de actividad se encuentran por arriba del pH fisiológico. Se han reportado pocos valores de pH idóneos para GSTs de helmintos, como por ejemplo de la GST de 26.5 kDa de la misma *T. solium* que se ubica en 7.5 (Torres-Rivera, datos no pub.) o en *Ascaris suum* cuya GST tiene un pH idóneo de 8.3 (Douch y Buchanan, 1978). Cuando se considera a otros organismos, los pH idóneos para las GST varían de 7 a 9, utilizando CDNB como sustrato y la mayoría de los valores se ubican alrededor de 8 (Clark, 1989). El hecho de que el pH idóneo para la GST_{25.5r} se encuentre por arriba del reportado para la isoforma de 26.5 kDa nos lleva a pensar si ésta podría localizarse dentro de algún compartimento celular en donde el pH sea ligeramente mas alto que en el resto de la célula, por ejemplo en algún endosoma, o cercanas al retículo endoplásmico o aparato de Golgi.

Los ensayos de actividad fueron realizados no en el pH ideal de la enzima, sino a 6.5, y esto se puede explicar puesto que se siguió el método de Habig (1981), en donde lo que se intenta medir es el producto generado por la catálisis del CDNB a S-(2,4-dinitrofenil) glutatión, que absorbe a 340 nm y en este caso el pH de 6.5 es en donde se obtiene un mejor acoplamiento del sustrato CDNB con la GST.

En cuanto a la temperatura, la máxima actividad específica se determinó en 40°C, lo cual es cercano tanto a la temperatura normal del hospedero definitivo, en este caso el ser humano (37°C) y aun más a la del hospedero intermediario, el cerdo, cuya temperatura normal es de 39°C, no mayor a los 40°C, ni menor a los 38.4°C (Espinosa y Serrano, 2007). Esto explica el resultado obtenido, ya que el hospedero intermedio del parásito tiene una temperatura corporal mas alta que la del definitivo, además de que no es capaz de regular su temperatura como los otros mamíferos, es decir por medio de la sudoración, por lo que el cisticerco constantemente se encuentra sometido a temperaturas corporales muy elevadas, y para permanecer dentro del cerdo, la GST debe ser capaz de funcionar a tales temperaturas.

La enzima probó ser estable y activa en un rango de 20 a 40°C, su actividad decae drásticamente a ambos lados de este intervalo, indicando que la enzima es poco eficiente a bajas temperaturas; con respecto a la forma de 26 kDa de *T. solium*, la enzima presenta un intervalo de actividad mas reducido (máximo en 37°C, estable de 4-40°C); sin embargo, la actividad importante esta presente en el mismo intervalo (Torres-Rivera, 2004). La importancia de este resultado radica en que la GST_{25.5r} puede mantener una correcta estructura a temperaturas corporales tanto de su hospedero intermediario como de su hospedero final, y así cumplir con las funciones desintoxicantes que se le atribuyen.

El punto isoeléctrico teórico fue de 6.1, que se encuentra por debajo del reportado para la isoforma de 26.5 kDa, pero se encuentra dentro del intervalo antes reportado para otros helmintos de 4.6-7.9 (Torres-Rivera y Landa, 2008). Este resultado concuerda con lo escrito por Dierickx en 1985 y por Clark en 1989, donde los valores de K_M para CDNB en el gusano *Tubifex tubifex* se incrementaban con el pI ; en este caso, lo reportado para GST 26 kDa de *T. solium* es un pI de 7.1 y una $K_{M(CDNB)}$ de 2.0 mM, mientras que para GST_{25.5r} el pI es 6.1 la $K_{M(CDNB)}$ 1.39 mM. Dierickx no pudo hallar la relación que existe entre estos dos parámetros (si es que existe alguna relación) y la conclusión a la que llegó es que este fenómeno debe investigarse mas a fondo.

La GST_{25.5r} y la GST_{26.5} de *T. solium* son enzimas que desempeña un papel de desintoxicación que es esencial para la vida del parásito. El entendimiento de cómo funcionan estas enzimas dentro de la fisiología de este parásito, podrá ayudar a desarrollo fármacos o vacunas específicas y seguras que permitan controlar o eliminar las parasitosis causadas por *T. solium*.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ Se consiguió transformar bacterias *E. coli* de la cepa JM105 con el vector pTrc99A que contiene el inserto para GST_{25.5r}.
- ❖ La GST_{25.5r} se expresó mediante IPTG y se purificó con ayuda de una columna de afinidad de GSH-Sefarosa B4.
- ❖ La proteína obtenida tiene actividad específica con el sustrato universal (CDNB), y esta actividad coincide con lo que se había determinado antes para la enzima.
- ❖ La actividad con marcadores de clase para GST es del mismo orden de magnitud reportado anteriormente.
- ❖ Los valores obtenidos de V_{\max} , K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M para los sustratos CDNB y GSH entran en los rangos reportados previamente para otras GST similares y en lo esperado para enzimas metabólicas.
- ❖ El pI teórico, el pH al que presenta su máxima actividad y la estabilidad de esta enzima ante la temperatura son consistentes con lo reportado en otros organismos invertebrados y presentan ligeras diferencias con la otra forma de la GST en *T. solium*.
- ❖ Con en presente trabajo se aportan datos que ayudan a comprender el funcionamiento de la GST_{25.5r} dentro de sus hospederos y en la relación hospedero-parásito, por lo que abre camino a nuevos estudios que continúen caracterizando a esta enzima, o utilicen sus propiedades para la generación de vacunas o fármacos específicos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Armstrong, R.N. 1994 Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. *Advanced Enzymology* 69: 1-44.
- Armstrong, R.N. 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferases. *Chemical Research Toxicology* 10: 2-18
- Barnes, M.M., James, S.P., Wood, P.B. 1959. Formation of mercapturic acid and the level of glutathione in tissues. *Biochemical Journal* 71: 680-690.
- Booth, J., Boyland, E., Sims, P. 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochemical journal* 79: 516-524.
- Brophy, P.M., Barret, J. 1990. Glutathione transferases in helminths. *Parasitology* 100: 345-349.
- Brophy, P.M., Papadopolus, A., Touraki, M., Coles, B., Körting, W., Barret, J. 1989b. Purification of cytosolic glutathione transferases from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): interaction with antihelminthics and products of lipid peroxidation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 187-196.
- Brophy, P.M., Pritchard D.I. 1992. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance? *Parasitology Today* 8: 419-422.
- Brophy, P.M., Pritchard, D.I. 1994. Parasitic helminth glutathione S-transferase: an update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. *Exp. Parasitol.* 79: 89-99.
- Brophy, P.M., Southan, C., Barret, J. 1989a. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochemical Journal* 262: 939-946.
- Byong-Kuk, N., Jung-Mi, K., Tong-Sook, K., Woon-Mok, S. 2007. *Plasmodium vivax*: molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 116: 414-418.
- Cho, S.G., Lee, Y.H., Park, H.S., Ryoo, K., Kank, K.W., Park, J., Eom, S.J., Kim, M.J., Chang, T.S., Choi, S.Y., Shim, J., Kim, Y., Dong, M.J., Kim, S.G., Ichijo, H., Choi, F.J. 2001. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals

by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biological Chemistry* 276: 12749-12755.

- Clark, A. 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organism. *Comparative Biochemical Physiology* 92: 419-446.
- Cornish-Bowden, A. 2004. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portland Press, London.
- Cox, F.E.G. 1982. *Modern Parasitology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 159 pp.
- Danielson, H.U., Mannervik, B. 1985. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochemical journal* 231: 263-267.
- Dierickx, P.J. 1985. Anionic and neutral glutathione S-transferase isoenzymes in the freshwater worm *Tubifex tubifex* (O.F.M.). *Archives in Int. Biological Biochem.* 93: 193-198.
- Docampo, R. *Antioxidant Mechanisms: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Marr J., M. Muller, Academic Press, San Diego, 1995.
- Douch, P.G., Buchanan, L.L. 1978. Glutathione conjugation of some xenobiotics by *Ascaris sum* and *Moniezia expansa*. *Xenobiótica* 8: 171-176.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K. 1999. Concise review of the Glutathion-S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sciences.* 49: 156-164.
- Espinosa-Aviña, F., Serrano-Garcia, M. 2007. Estrés calórico en el cerdo. *Porcicultores y su entorno.* 10(55): 82-86
- Flisser, A., Madrazo, I., Delgado, H. 1997. *Cisticercosis humana*. Ed Manual Moderno. México, D.F. 1-176.
- Gupta, S., Singh, A., Yadav, M., Singh, K., Rathaur, S. 2007. MALDI mass sequencing and characterization of filarial glutathione S-transferase. *Biochemical and Biophysical Research Community* 356:381-385.
- Habig, W.H., Jakoby W. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferase. *Methods Enzymol.* 77: 398-405
- Habig, W.H., Pabst M.J., Jakoby W. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biol. Chem.* 249: 7130-7139.

- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. 2005. Glutathione transferases. Annual Review Pharmacological Toxicology 45: 51-88.
- Hayes, J.D., Pulford D.J. 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology. 30: 445-600.
- Klion, A., Nutman, T.B. 2002. Immunity to parasitic worms. Encyclopedia of life sciences, 5-8.
- Laemmli, V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Larralde, C., Padilla A., Hernandez, M., Govezenzky, T., Sciutto, E., Gutierrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Sepúlveda, J. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México. 34:(2) 197-210.
- Liebau, E., Bergmann, B., Campbell, A.M., Teesdale-Soittle, P., Brophy, P.M., Lüersen, K., Walter, R.D. 2002. The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 124: 85-90.
- Liebau, E., Müller, V., Lucius, R., Walter, R.D., Henkle-Dürsen, K. 1996b. Molecular cloning, expresión and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. Mol. Biochen. Parasitol. 77: 49-56.
- Liebau, E., Wildenburg, G., Brophy, P.M., Walter, R.D., Henkle-Dürsen, K. 1996a. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. Molecular Biochemical Parasitology 80: 27-39.
- Lightowlers, M.W. 1999. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role of vaccination in pigs. International Journal of Parasitology. 29: 811:827.
- Lightowlers, M.W., Flisser, A., Gaucci, C.G., Heath, D.D, Jensen, O., Rolfe, R. 2000. Vaccination against cysticercosis and Hydatid disease (review). Parasitology Today. 16 (5): 191-196.
- Mannervik, B. 1985. The isoenzymes of glutathione S-transferase. Advanced Enzymology 57: 357-417.

- Mannervik, B., Alin, P., Gutenberg, C., Jansson, H., Kalim-Tahir, M., Warholm, M., Jörnvall, H. 1985. Identification of three classes of glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7202-7206
- Molinari, J.L., Tato, P., Palet, A. 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Revisita Latinoamericana de Microbiologia.* 30: 325-333.
- Morello, A., Repetto, Y., Atias, A. 1982. Characterization of Glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Compendium Biochemical Physiology.* 72B: 449-452.
- O'Leary, K., Hataway, K.M., Tracey, J.W. 1992. *Shistosoma mansoni*: single step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4. *Experimental Parasitology* 75: 47-55.
- Pemberton, K.D., Barret, J. 1989. The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *Int. Journal Parasitology* 19: 875-878.
- Plancarte, A., Rendon, J.L., Landa, A. 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitology Research* 93: 137-144.
- Sarti, E. 1997. La teniosis y cisticercosis en México. *Revista Salud Pública de México.* 39: 225-231.
- Schmidt, G.D., Roberts, L.S. Cestoidea: Form, function and classification of the tapeworms: *Foundations of Parasitology.* 6a Ed. McGraw Hill, USA, 2000.
- Segel, I.H. 1975. *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.* John Wiley & Sons, New York.
- Smith, N.C. 1992. Concepts and strategies for anti-parasites immunoprophylaxis and therapy. *International Journal of Parasitology.* 22(8): 1047-1082.
- Snyder, M.J., Maddison, D.R. 1997. Molecular phylogeny of Glutathione S-transferases. *DNA and cell Biology.* 16 (11): 1373-1384.

- Torres-Rivera, A. 2004. Aislamiento y caracterización del ADNc que codifica para la isoforma de la Glutación S-transferasa de 26.5 kDa de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 57 pp.
- Torres-Rivera, A., Landa, A. 2008. Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica* 105: 99-112.
- Tracy, J.W., Vande, E.A. Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Marr, J., M. Muller. Academic Press, San Diego, 1995.
- Vibanco-Perez, N. 2000. La enzima Glutación S-Transferasa de *Taenia solium*, su caracterización y evaluación de su protección. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. 116pp.
- Vibanco-Perez, N., Landa, A. 1998. Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 40: 73-85.
- Vibanco-Perez, N. Jiménez, L., Merchant, M., Landa, A. 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology*. 85(3): 448-453.
- Vibanco-Perez, N., Jimenez, L., Mendoza-Hernandez, G., Landa, A. 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitology Research* 88: 398-404.
- Walter, J., Crowley, P., Moreman, A. Barret, J. 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Shistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 61: 255-264.
- Wilce, M., Parker, M. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochemical Biophysic Acta* 1205: 1-18.