



Universidad Nacional Autónoma de México
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

Facultad de Medicina

**Producción de la Glutación transferasa de 26 kDa
recombinante de *Taenia solium*, su caracterización
bioquímica y estructural**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

ANAYETZIN TORRES RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

MÉXICO, 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.

Para mis padres, por todo el trayecto que hemos andado
y el que falta por recorrer...

Y también para mis queridos niños,
que siempre me salvan el día.

Agradecimientos

Mi agradecimiento formal al grupo que opera en el laboratorio de biología molecular de *Taenia solium*, encabezado por el Dr. Abraham Landa Piedra, por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este proyecto.

Hago extensivo este agradecimiento a la Dra. Adela Rodríguez y su equipo de trabajo conformado por Alejandra, Georgina y Deyanira, que de manera generosa me brindaron conocimiento, amistad y guía.

Gracias al Dr. Juan Pablo Pardo por las clases, los consejos, las pláticas, el aliento...por ser el extraordinario ser humano que es.

Mi reconocimiento para todas las personas que se involucraron en este propósito y, que para bien o para mal, hemos consolidado pequeños éxitos pero lazos muy profundos.

Mi eterna gratitud para mis padres, a los que amo profundamente, porque han seguido junto a mí, cariñosamente y a su manera, a pesar de todas las diferencias y malentendidos.

Toda mi lealtad para ti Maricela, que eres la mejor amiga que alguien pueda imaginar, pero mi enorme fortuna es tenerte y no idealizarte. Mil gracias por ser mi sostén y aliento cuando sentía el mundo desvanecerse...

Por supuesto que no olvido Fátima el ánimo que me das cuando espléndida me regalas parte de tu tiempo y espacio. Gracias por escucharme, no juzgarme y seguir a mi lado.

Para mí dúo dinámico, Jonathan y Gere, mi sincero cariño y gratitud por esa nobleza y picardía con la que me han colmado, por esas horas de charla que espero no terminen.

Pero mi círculo perfecto no estaría completo sin me faltarán Charmina, Hugo, Beto, Carmen, Javi, Oli y Lorena que me alegran la vida con su presencia, y por supuesto tampoco me pueden faltar Víctor, Ricardo, y Felipe, que son mis colegas preferidos y grandes amigos, así como la sub conformada por Sergio, Aramis, Oscar, Viri, y el Capo.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* correspondiente al Departamento de Microbiología y Parasitología en el 2do piso del Edificio A en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Ciudad Universitaria en la Ciudad de México, Distrito Federal.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el contrato 43806-M y por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico dentro del Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del contrato IN210603-03.

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de postgrado de doctorado en ciencias mediante el Programa de becas para el Postgrado con número de beca 186255 así como un complemento de beca otorgado por la UNAM a través de la Dirección General de Estudios de Postgrado.

EL COMITÉ TUTORAL:

DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
M. C. KAETHE WILLMS MANNING
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

Portada

Índice

Abstract

Resumen

Introducción

Página

Generalidades del parásito <i>Taenia solium</i> .	9
Taeniosis-cisticercosis. Ciclo de vida. Epidemiología.	10
Cuadro clínico, diagnóstico y tratamiento.	12
Medidas de control.	14
Especies reactivas.	16
Sistema desintoxicante.	16
Metabolismo antioxidante.	17
Metabolismo xenobiótico.	17
Sistema glutatión.	18
Glutatión transferasas.	19

Hipótesis 23

Objetivos 23

Materiales y Métodos

Reactivos.	24
Generación de la enzima recombinante y expresión.	24
Purificación.	24
Ensayos de actividad.	25
Actividades a diferentes pH, temperaturas. y cantidades de enzima.	25
Determinación de parámetros cinéticos.	25
Determinación de los patrones de unión.	26
<i>Ensayos de fluorimetría.</i>	
Determinación de actividad con sustratos alternos.	26
Ensayos de inhibición con marcadores de clase.	26
<i>Tipo de inhibición y constantes.</i>	
Ensayos de inhibición con fármacos antihelmínticos.	27
Determinación del patrón de inhibición del mebendazol.	27
Reacciones cruzadas.	27
Determinación de las condiciones de cristalización.	27
Patrón de difracción y mapa de densidad electrónica.	27
Afinamientos y deposición en el Protein Data Bank.	28

Resultados	Página
Expresión y purificación de la GST26 recombinante.	29
Determinación de los parámetros cinéticos aparentes de la recTs26GST.	30
Determinación de la cooperatividad en la recTs26GST con el CDNB.	31
Actividad con sustratos e inhibidores marcadores de clase.	32
Reconocimiento por anticuerpos.	34
Obtención de la estructura tridimensional de la recTs26GST.	34
Clasificación.	41
Inhibición de la recTs26GST usando antihelmínticos.	41
Patrón de inhibición del mebendazol.	42
Discusión	43
Conclusiones	47
Anexo	55
Bibliografía	48

Palabras clave: Glutación transferasa, *Taenia solium*, cooperatividad positiva, estructura tridimensional, clase ypsilon.

Abstract

Glutathione transferases (GST) are fundamental enzymes for the organisms due to their diverse and important functions. In the beginnings of their study, these proteins were describe as detoxification enzymes and binding proteins, associated to the second phase of the detoxification system, but recently several researches have demonstrated their participation in other processes like synthesis and catabolism of many cellular molecules, signaling, regulation, isomerization and, formation/regulation of ionic channels. Due to this variety of functions the GSTs are involved in a wide spectrum of pathologies.

In some pathogenic organisms, drug resistance to current therapies is associated to the GSH metabolism, specifically to GSTs. On helminthes, these enzymes gain relevance as the main detoxification family because no CYP450 activity has been found in them and so it is probable that the metabolism of many xenobiotics, ecosanoids and other typical CYP450 substrates dealt with by the GST family.

In *Taenia solium*, the etiologic agent of taeniosis/cysticercosis parasitoses, two cytosolic GSTs with similar molecular mass have been described: one with 25 kDa and the other with a molecular mass of 26 kDa (Ts26GST). Cloned Ts26GST was studied in its recombinant form (recTs26GST) by means of activity assays with class markers, catalysis, antibody reactions and obtaining the three dimensional structure of the enzyme.

In the former outcomes, the primary structure of recTs26GST showed to be related with the mu class but the kinetic parameters for CDNB ($V_{max}= 51.5 \mu\text{mol}/\text{minmg}$; $K_M= 1.06 \text{mM}$; $k_{cat}= 22.2 \text{s}^{-1}$) showed it relation with some alpha GSTs. The substrate and inhibitor class markers reaffirmed these bimodal characteristics.

On the other hand, the kinetic curves for CDNB and GSH showed a positive cooperativity that was corroborated using fluorometric assays. Those assays indicate that CDNB binding is highly influenced by GSH, probably by modulation of the Ts26GST conformational ensemble.

Inhibition studies with anthelminths indicate that recTs26GST is sensitive to mebendazole, displaying a non competitive inhibition pattern suggesting that at least two molecules are binding to recTs26GST.

Finally the three dimensional structure of the enzyme obtained by X-ray difracction confirms that recTs26GST belongs to the new class ypsilon related with alpha, mu and pi classes.

Resumen

Las glutatión transferasas (GSTs) son miembros de una familia de enzimas con una gran versatilidad de funciones que las hacen esenciales para todos los organismos. Originalmente fueron descritas como enzimas desintoxicantes de la fase II del sistema de desintoxicación y como proteínas de unión a sustratos endógenos. Sin embargo, estudios recientes demostraron su participación en la síntesis y catabolismo de diversas sustancias endógenas como prostaglandinas, leucotrienos y aminoácidos aromáticos, en isomerización, en los procesos de señalización y regulación, así como en la formación y función de canales iónicos. Es debido a esta gran diversidad de funciones fisiológicas que las GSTs también están asociadas a un amplio espectro de patologías.

En el caso de organismos patógenos, la resistencia a las diversas terapias farmacológicas esta asociada a las enzimas del metabolismo de glutatión (GSH) y específicamente a las GSTs. En helmintos, esta familia cobra vital importancia al ser el principal sistema desintoxicante que poseen, ya que no se ha detectado actividad de los citocromos P450 en ninguno de ellos. Lo anterior implica que al carecer del principal sistema de fase I de desintoxicación, las GST helmínticas deben encargarse del amplio espectro de xenobióticos y tóxicos endógenos.

En *Taenia solium*, agente etiológico de la taeniosis y cisticercosis, se han purificado a partir de extractos de cisticerco dos GSTs citosólicas de masa molecular similar: una de 25 kDa y otra de 26 kDa. Esta última ha sido estudiada a partir de su forma recombinante (recTs26GST) realizando diversas pruebas de actividad con marcadores de clase, de catálisis, de reacción con anticuerpos así como por la obtención del modelo tridimensional de la enzima a partir de un patrón de difracción de rayos X.

Los análisis de la estructura primaria relacionan a la Ts26GST con la clase mu, sin embargo los parámetros cinéticos obtenidos con el sustrato universal 1-Cloro-2,4 dinitrobenzeno ó CNDB, ($V_{max} = 51.5 \mu\text{mol}/\text{minmg}$; $K_M = 1.06 \text{ mM}$; $k_{cat} = 22.2 \text{ s}^{-1}$), son cercanos a los que presentan las GST de clase alpha. Los ensayos bioquímicos con sustratos e inhibidores marcadores de clase, confirmaron sus características híbridas.

Por otra parte, los ensayos cinéticos también demostraron que la Ts26GST despliega un comportamiento cooperativo positivo para CNDB, con un $h = 1.46$, que fue corroborado mediante ensayos de fluorometría. Estos últimos indicaron que la unión del CDNB a la enzima está altamente influenciada por la presencia de GSH, probablemente por un fenómeno de modulación del ensamble conformacional de la Ts26GST.

Respecto a los estudios de inhibición con antihelmínticos, se encontró que la enzima es sensible al mebendazol con un patrón de inhibición correspondiente al tipo no competitivo, donde al menos dos moléculas del fármaco se unen a la enzima.

Por último, el modelo tridimensional de la enzima generado mediante difracción de rayos X confirma que la Ts26GST pertenece a la nueva clase que denominamos ypsilon y que está relacionada con las clases mu, alpha y pi.

Introducción

Generalidades del parásito *Taenia solium*

La especie *Taenia solium* se ubica como miembro del phylum Platyhelminthe, clase Cestoda, del orden Cyclophyllidea de la familia Taeniidae. En general, los miembros de dicha familia se caracterizan morfológicamente por poseer un órgano de fijación ó escólex y un cuerpo de tipo cinta, elongado y segmentado llamado estróbilo. En cada uno de estos segmentos ó proglótidos se encuentran órganos masculinos y femeninos en desarrollo, excepto los últimos, denominados grávidos, en los cuales se encuentran 40,000 huevos, aproximadamente, por proglótido. Además, hay que destacar que ninguno de estos organismos posee un tracto digestivo, por lo que deben absorber sus nutrientes mediante microvellosidades, llamadas microtricas, que recubren la membrana tegumental del parásito (Carpio, 2002; Schmit y Roberts, 2000).

Morfológicamente a *T. solium*, en sus estadios de adulto y larva, le distingue la doble corona de ganchos que se localizan en la parte más alta de su escólex, así como las ramas uterinas en sus proglótidos grávidos que nunca exceden las catorce. Sin estos elementos es muy difícil distinguirlo del resto de los miembros de la familia Taeniidae que poseen las ventosas de anclaje y algún tipo de rostelo que funciona como órgano de sostén. Además, las oncosferas permanecen en huevos de apariencia muy similar, lo que las suele incluir bajo el término de *Taenia* spp (Carpio, 2002; Schmit y Roberts, 2000).

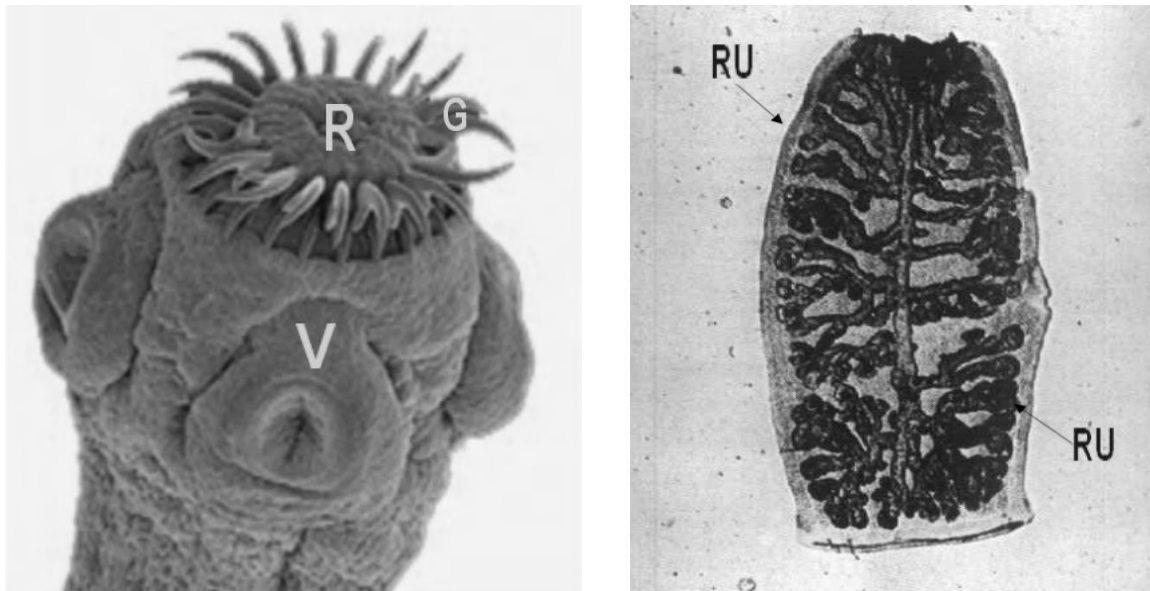


Figura 1. Elementos morfológicos característicos de *T. solium*. (Modificado a partir de www.infovek.sk/predmety/biologia/metodicke/ploskavce/index.php). En el lado izquierdo se aprecia el escólex de una taenia adulta en donde se indica la posición de las ventosas (V), el rostelo (R) y la corona de ganchos (G) que caracteriza a la especie. En el lado derecho se observa el corte de un proglótido grávido en donde se exponen las ramas uterinas (RU), que en *T. solium* no exceden las catorce.

Aunque se considera un organismo poco evolucionado, *T. solium* cuenta con un sistema nervioso no-mielinizado ubicado en el escólex, a partir del cual nervios longitudinales enervan todo el estróbilo desarrollando una función tacto-quimiorreceptiva debido a la circulación de diferentes neurotransmisores serotoninérgicos, colinérgicos, entre otros. (Schmidt y Roberts, 2000)

La superficie externa del parásito está compuesta, aparte de la membrana tegumentaria, de una banda protoplásmica continua y unida al citoplasma de citones tegumentarios (cuerpos celulares). Esta capa externa, denominada tegumento, se encuentra separada del resto de las estructuras parasitarias por una membrana basal. Por debajo de la membrana basal se encuentran varios tipos de células: células flama, miocitos, corpúsculos calcáreos y células de almacenamiento de glucógeno contenidas en una matriz conectiva de tejido fibroso transversal y longitudinal. Cada una de estas células tiene diferentes funciones estructurales, motoras y metabólicas (Schmidt y Roberts, 2000).

Taeniosis-cisticercosis: ciclo de vida. Epidemiología.

A pesar de que el género *Taenia* posee cerca de 20 especies, sólo unas cuantas representan un verdadero peligro para la salud humana y *T. solium* entra dentro de esta categoría. Lo anterior se explica perfectamente con los ciclos de vida de dicho género que consistentemente involucran dos hospederos mamíferos. El primero de tipo carnívoro u omnívoro que actúa como hospedero definitivo al albergar y desarrollar el gusano adulto. En el segundo hospedero, de tipo herbívoro u omnívoro, se desarrolla la fase larvaria ó cisticerco tras ser infectado con oncosferas provenientes de huevos que se encuentran en el ambiente (Hoberg, 2002).

Taenia solium posee un ciclo sencillo que requiere de los humanos como únicos hospederos definitivos del adulto y de los cerdos como hospederos intermediarios al albergar a los cisticercos. Sin embargo, los humanos pueden actuar como hospederos intermediarios accidentales del estadio larvario, siendo la única especie dentro de los ténidos que genera cisticercosis en humanos, a pesar de algunos reportes que incluyen a los cisticercos de *T. crassiceps*, *T. multiceps*, *T. serialis* y *T. taeniaeformis* (García et al, 2003; Pawlowski et al, 2005).

En general, en el desarrollo de este cestodo pueden diferenciarse cuatro estadios:

1) **Gusano adulto:** el estado reproductivo capaz de producir huevos. El estadio adulto de *T. solium*, conocido como "solitaria", habita en el tubo digestivo del ser humano, adhiriéndose a la pared intestinal mediante sus ventosas y ganchos. Cada día, varios proglótidos grávidos se separan del extremo distal del ténido y son expulsados con las heces liberándose al ambiente miles de huevos que permanecen viables durante largo tiempo. En el mundo existen al menos 2.5 millones de portadores de la solitaria.

2) **Huevo:** es el estado responsable de la diseminación del parásito en el ambiente externo. Este contiene a la oncosfera o embrión hexacanto. En lugares donde la eliminación de excretas es inadecuada, los cerdos se alimentan con heces humanas que contienen los proglótidos o los huevos de *T. solium*. Una vez ingeridos por el cerdo, los huevos pierden su cubierta por acción de enzimas digestivas como la tripsina y las sales

biliares, liberándose las oncosferas. Al atravesar la pared intestinal, las oncosferas entran al flujo sanguíneo donde son transportados a los tejidos del cerdo.

3) **Oncosfera**: la larva hexacanto migra del intestino hacia los tejidos internos u órganos dentro del hospedero intermediario. Al atravesar la pared intestinal, las oncosferas entran al flujo sanguíneo donde son transportados a los tejidos del cerdo, principalmente musculatura, vísceras y cerebro, para evolucionar y llegar a transformarse en larvas (cisticercos) viables.

4) **Cisticerco**: metacestodo que parasita los tejidos de los hospederos intermediarios, sean estos cerdos o humanos. Si algún humano ingiere carne de cerdo mal cocida contaminada con cisticercos, muchos de ellos evaginan en el intestino delgado, entonces el escólex se adhiere a la pared intestinal y el parásito comienza a crecer hasta transformarse en una taenia adulta. Este proceso toma aproximadamente 2 meses.

(Carlos et al, 2006; Carpio, 2002; García et al, 2003; Schmidt y Roberts, 2000)

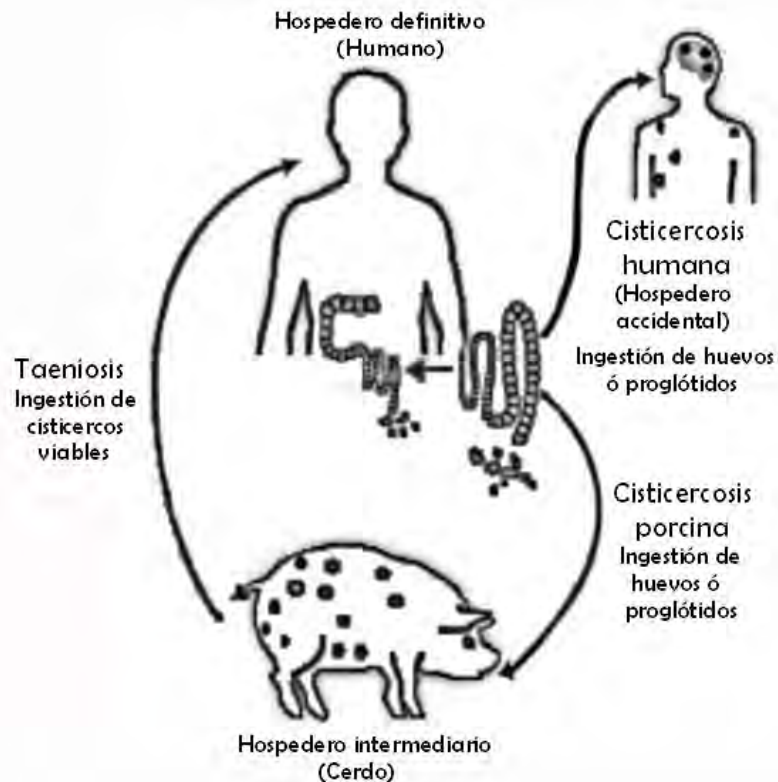


Figura 2. Ciclo de vida de *T. solium* (Tomado y modificado de García et al, Lancet, 2003)

Por otra parte, el hombre también puede convertirse en huésped intermediario de la *T. solium* al ingerir sus huevos y desarrollar cisticercosis humana. El mecanismo por el cual los huevos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos del hombre es similar al descrito en los cerdos. Las formas principales de contagio humano incluyen ingestión de comida y agua contaminada con huevos de *T. solium* y la convivencia con un taeniosico. Además existe la posibilidad de la contaminación ano-mano-boca (auto-

y eosinofilia después de una invasión y diseminación aguda de cisticercos. Si se enquistan en el músculo esquelético la mayor problemática proviene en la pérdida de funcionalidad de la parte afectada, pero cuando se alojan en el sistema nervioso central pueden producir grandes complicaciones por el efecto de masa, respuesta inflamatoria, obstrucción de los orificios encefálicos y/o sistemas ventriculares, lo que causa hidrocefalia por bloqueo del fluido del líquido cefalorraquídeo, o bien, convulsiones por la masa que ocupa en el cerebro. Además, pueden presentarse hipertensión craneal que cause vómito y papiledema, epilepsia focal o generalizada, ataxia, manifestaciones pseudo-apopléjicas, movimientos involuntarios e incluso demencia. También puede cursar sin síntomas (Carpio, 2002; García et al, 2003).

El diagnóstico para la taeniosis se realiza por la identificación de proglótidos excretados, por el análisis de los huevos o por la detección de antígenos mediante métodos coproparasitológicos y serológicos e incluso por algunas técnicas moleculares como la PCR. La desventaja para la aplicación de estas pruebas consiste en la obtención de proglótidos o huevos.

Si se trata de neurocisticercosis, la interpretación correcta de los exámenes de neuroimagen e inmunológicos permite un diagnóstico acertado. Fuera del neuroeje, los cisticercos pueden localizarse en el globo ocular donde son visualizados mediante examen oftalmoscópico, mientras que en los músculos esqueléticos o el tejido celular subcutáneo pueden identificarse mediante radiografías simples o incluso la palpación. Sin embargo, el diagnóstico no es muy sencillo, ya que los síntomas no son específicos, provocando que los estudios que se requieren para la detección de los cisticercos no se realicen y se obtengan dictámenes erróneos. Además, los estudios de neuroimagen como la tomografía computarizada y la imagen por resonancia magnética, no son accesibles a la mayoría de la población a pesar de ser el mejor método de identificación.

Existen varias pruebas destinadas a la detección de anticuerpos anti-cisticercos en suero, saliva y líquido cefalorraquídeo, entre las que destacan el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia. Estas pruebas son un complemento importante de los estudios de neuroimagen, pero nunca deben ser utilizadas en forma aislada para confirmar o descartar el diagnóstico de neurocisticercosis debido al elevado porcentaje de resultados falsos positivos y falsos negativos. De las pruebas serológicas la más sensible es la inmunoelectrotransferencia que utiliza una fracción de glicoproteínas del parásito unidas a una matriz de nitrocelulosa. En la actualidad los sistemas de ELISA e inmunoelectrotransferencia para el diagnóstico de la cisticercosis (muscular y/o cerebral) y de la taeniosis siguen procesos de mejoramiento a través de la búsqueda de nuevos antígenos más específicos que mejoren su sensibilidad y que sean fáciles de purificar (Carpio, 2002; García et al, 2003; Hoberg, 2002; Pawlowski et al 2005).

Con respecto a la terapéutica de estas enfermedades, el fármaco de elección para el tratamiento de la taeniosis había sido la niclosamida, el cual actúa sobre los proglótidos haciéndolos susceptibles a la proteólisis por las enzimas del hospedero. Su administración generó controversias por la posibilidad de causar cisticercosis mediante liberación de los huevos hacia la luz intestinal, por lo que su uso ha sido descontinuado en algunos países donde ahora se utilizan los bencimidazoles ó el prazicuantel (este último en una dosis única de 10 mg/Kg). El prazicuantel tampoco es un fármaco muy seguro, ya que en dosis más altas produce reacciones indeseables cuando hay cisticercos alojados en el sistema nervioso central. Otra opción ha sido usar el albendazol y la niclosamida en combinación, con los que se obtienen buenos resultados, sin embargo en la actualidad

se prefiere la utilización del albendazol solo. Este fármaco es utilizado para el tratamiento de la neurocisticercosis en dosis de 15 mg/kg/día durante 8 días, destruyendo del 75% a 90% de los cisticercos parenquimatosos, usándose más que el prazicuantel por su menor costo, un aspecto importante si se considera que la cisticercosis usualmente afecta a gente de bajos recursos económicos.

Otros fármacos de uso continuo son el resto de los elementos de la familia de bencimidazoles, como el mebendazol, tiabendazol, febendazol y oxfendazol. En el caso de cisticercos ventriculares móviles, éstos pueden ser removidos por exéresis quirúrgica o por aspiración endoscópica.

Existen indicaciones absolutas para el uso simultáneo de corticosteroides y antihelmínticos, incluyendo a pacientes con quistes subaracnoideos gigantes, quistes ventriculares y quistes localizados en la médula espinal. En la mayoría de estos casos, los corticosteroides deben ser administrados antes, durante y después del tratamiento antihelmíntico con el objeto de disminuir el riesgo de infartos cerebrales, hidrocefalia o edema medular, respectivamente, como consecuencia de la labor del sistema inmunológico (Carpio, 2002; García et al, 2003; Pawlowski et al, 2005, WHO 2003).

Medidas de control.

Estrategias reportadas.

Las principales estrategias de control que se han realizado consisten en:

1) Quimioterapia comunitaria. Se ha demostrado en diversos estados de la República Mexicana (Sinaloa, Guerrero, Morelos) y en algunos países latinoamericanos, como Ecuador y Perú, que la administración de una dosis única de prazicuantel o albendazol disminuye temporalmente los casos de taeniosis en la población y la de cisticercosis en ganado porcino. No obstante, después de un año o dos de haber sido administrado el tratamiento el número de taeniosicos y cisticercosos en la población humana y en la porcina volvía a incrementarse en igual o mayor magnitud que antes de la administración (Sarti et al, 2000; González et al, 2001).

2) Campañas educativas. En las comunidades de la República Mexicana donde se implementaron campañas de educación se encontró una importante reducción de casos de taeniosis y cisticercosis porcina. También existe el reporte en una comunidad donde se administró un antihelmíntico (prazicuantel) y montó una campaña de educación de manera simultánea demostrando mejores resultados en el control de la cisticercosis porcina y en la cantidad de taeniosicos con respecto a la administración del fármaco solo, y con una duración mayor en el efecto ya que en este estudio el escaso número de infectados se mantuvo bajo aún después de cuatro años de haberse realizado (Pawlowski et al, 2005; Sarti et al, 1997).

3) Desarrollo de una vacuna. El desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina parece una estrategia viable si se toma en consideración los estudios con otros ténidos en roedores (*T. crassiceps*), ovinos (*T. ovis*) y bovinos (*T. saginata*), que han demostrado que se puede generar un buen nivel de protección contra la enfermedad.

Este hecho ha motivado el desarrollo de vacunas utilizando extractos completos de cisticercos, antígenos purificados de extractos del metacestodo, péptidos sintéticos o proteínas recombinantes. Los análisis de las investigaciones realizadas demuestran que las vacunas proveen un alto grado de inmunización. Sin embargo al contemplar aspectos como el costo de la vacuna, el bajo nivel económico de los propietarios de cerdos, los gastos logísticos de distribución y aplicación de una vacuna en forma masiva, entre otros, hace que las posibilidades de montar alguna campaña de vacunación aún sean bajas (Aluja et al, 2005; Lightowlers, 2003; Montresor y Palmer, 2006; Pawlowski et al, 2005).

Nuevos planteamientos.

A pesar de los esfuerzos mencionados anteriormente, la erradicación del parásito no ha sido posible, por lo que nuevas visiones para el control del problema se han adicionado a las estrategias ya revisadas como son: la generación de nuevos antihelmínticos, el mejoramiento de las pruebas diagnósticas y el mejoramiento en los datos de epidemiología de la taeniosis/ cisticercosis.

La propuesta de obtención de nuevos antiparasitarios obedece a múltiples causas, una corresponde a la mala posología llevada para los antihelmínticos actuales y su uso excesivo que ha conducido a la aparición de helmintos resistentes a diferentes fármacos. Tampoco debe olvidarse la toxicidad asociada a estos fármacos, que aunque ha sido poco revisada, se sabe que el uso continuo debido a re-infecciones es causante de diversas alteraciones celulares. Para la elaboración de una nueva generación de antihelmínticos se ha recurrido al diseño de fármacos que inhiban enzimas vitales de estos parásitos sin afectar a las de los hospederos (Bennet et al, 1997; Geerts y Gryseels, 2000; Dayan, 2003; Torres-Rivera y Landa, 2008a).

Otro punto central del control de dichas enfermedades es el diagnóstico. Como se mencionó, la estrategia consiste en la búsqueda de nuevos antígenos fáciles de obtener, purificar y estabilizar sobre una prueba diagnóstica que deberá ser fácil de realizar, sensible y específica para ser usada de manera masiva y en condiciones de campo.

Para poder diseñar y aplicar las estrategias de control a un problema, definitivamente es necesario conocer el problema lo mejor posible. Aunque las estadísticas epidemiológicas han tratado de ser mejoradas en últimas fechas, aún distan de podernos dar cifras contundentes acerca de la dinámica de la taeniosis/ cisticercosis de manera global. El responder preguntas sobre el número de casos activos de la enfermedad, en estado de remisión y los casos resueltos tanto en humano como en ganado porcino, el porcentaje de pacientes que presentan síntomas, el número de fallecimientos causados por neurocisticercosis entre otras preguntas, requiere de una mejor implementación de los sistemas de detección, medición y registro de la infección (Hobarg, 2002; Pawlowski et al, 2005).

Especies Reactivas.

El término de especies reactivas (RS) se refiere a moléculas con distinto grado de oxidación que van a tomar uno o más electrones, o protones, produciendo intermediarios parcialmente reducidos. Estas moléculas al ser más reactivas van a provocar un daño parcial o total en las células. Las RS pueden además amplificar las lesiones mediante reacciones en cadena que generan nuevas RS. El oxígeno, nitrógeno y algunos halógenos están involucrados en la formación de estos compuestos. Si bien para los organismos aeróbicos el oxígeno cobra elevada importancia al actuar como aceptor final de electrones en la producción de ATP durante la respiración, éste es un elemento tóxico con dos electrones desapareados dispuestos a captar los electrones faltantes, creando iones, radicales y compuestos como el ión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\bullet), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros. Aparte del oxígeno, el nitrógeno, como radical óxido nítrico (NO^\bullet) y el peroxinitrito ($ONOO^-$) así como los halógenos cloro y bromo en el estado de ácido hipocloroso e hipobromoso, respectivamente, son capaces de generar más electrófilos que favorecen el daño celular (Halliwell y Gutteridge, 2007; Sorg, 2004). Las RS lesionan a las células porque cambian la conformación, estructura y funcionalidad de polisacáridos, lípidos, proteínas e inclusive ADN; su interacción con dichos componentes forman una gran cantidad de moléculas oxidadas y oxidantes, así como radicales que terminan por desajustar el equilibrio entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes, dando paso al fenómeno conocido como estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007; Sorg, 2004).

En el caso de los helmintos los ambientes de oxígeno son realmente pobres, no obstante se encuentran expuestos a estrés oxidativo por los diversos mecanismos de defensa que monta el hospedero en su contra, como es la liberación de RS por parte de algunas células del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos por citar algunos) y el ataque de otros xenobióticos. Para detener un exceso de RS que pudieran desequilibrar el balance redox los organismos, incluidos los helmintos, han montado defensas antioxidantes capaces de detectar las RS, removerlas catalíticamente, disminuir su formación y contenerlas “físicamente” por acarreo o por inmolación. Este conjunto de moléculas enzimáticas y no enzimáticas se agrupa en el sistema desintoxicante (Brophy y Barret, 1990; Docampo, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2007; Tracy y Vande Waa, 1995).

Sistema desintoxicante.

El sistema desintoxicante es el conjunto de procesos metabólicos de defensa dispuestos para el rearrreglo o la descomposición química de diversas sustancias tóxicas (xenobióticos o metabolitos) favoreciendo su eliminación.

Los helmintos, como *T. solium*, al igual que otros organismos han desarrollado defensas contra las RS (de oxígeno o nitrógeno) y contra diversos xenobióticos (como lo son los fármacos antihelmínticos entre otros), en las que pueden identificarse moléculas de tipo enzimático y tipo no enzimático.

Dentro del tipo no enzimático se encuentran los compuestos de bajo peso molecular como la vitamina E, el ácido ascórbico, el piruvato, el urato, la bilirrubina, el glutatión (GSH), la tiorredoxina, el NADH y el NADPH, que actúan directamente sobre las RS y se oxidan rápidamente con el fin de preservar las biomoléculas de mayor importancia. Muchos de estos antioxidantes también actúan como cofactores de los sistemas enzimáticos desintoxicantes.

En el caso del sistema enzimático, las RS y los xenobióticos se metabolizan mediante mecanismos distinguibles como el metabolismo antioxidante y el metabolismo xenobiótico. Sin embargo, para facilidad de su estudio, el sistema desintoxicante se divide en las fases I, II y III, que integran una vía (casi) secuencial en la inactivación y eliminación de cualquier tóxico (Halliwell y Gutteridge, 2007; Sorg, 2004).

Metabolismo antioxidante.

Este metabolismo se constituye del conjunto de moléculas enzimáticas y no enzimáticas destinadas a la conservación de la relación oxidante/ antioxidante en la célula mediante el equilibrio entre la tasa de producción del oxidante y su degradación. En su componente enzimático se encuentran principalmente las moléculas de la fase I del sistema desintoxicante.

La fase I, conocida también como reacciones de funcionalidad, realiza una biotransformación de los grupos funcionales susceptibles en las moléculas tóxicas mediante oxidación, reducción ó hidrólisis, haciendo más polares a estos compuestos. De las tres clases de reacciones antes mencionadas, las de oxidación son las más comunes, y aunque en otros organismos la familia de los citocromos P450 llevan a cabo esta catálisis, en *T. solium* como en otros parásitos, no se ha registrado actividad de tal variedad de mono-oxigenasas. No obstante, el parásito cuenta con otras enzimas que llevan a cabo la oxidación de los xenobióticos y de las RS como son la superóxido dismutasa, la xantina oxidasa, la glutaredoxina, la peroxiredoxina y la monoamino oxidasa, por mencionar algunas. Cabe señalar que *T. solium* carece también de actividad de catalasa.

Las reacciones de reducción son escasas siendo los grupos carbonilo, azo y nitro susceptibles a estas reacciones para formar grupos hidroxilos y aminos. Las enzimas encargadas de estas reacciones son azoreductasa, nitroreductasa, aldehído y cetona reductasas. Las reacciones de hidrólisis son llevadas a cabo por o- y N-desacetilasa, arilsulfatasa, fosfatasas alcalinas y probablemente por alguna epóxido hidrolasa. Estas enzimas junto con las reductasas aún no han sido investigadas en el ténido (Barret, 1998; Docampo, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2007).

Metabolismo xenobiótico.

Este es un metabolismo capaz de procesar diversos xenobióticos (sustancias extrañas a las funciones metabólicas normales) a compuestos con una mayor solubilidad acuosa, esta biotransformación permite su eliminación de la célula, pero en algunos casos contribuye en el aumento de su toxicidad. Abarca principalmente a las fases II y III del sistema desintoxicante, aunque en algunos organismos como los mamíferos, hay enzimas de la fase I que intervienen en esta biotransformación, un ejemplo son los citocromos P450.

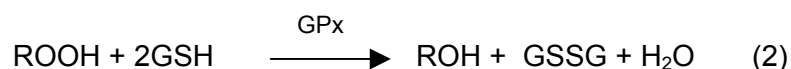
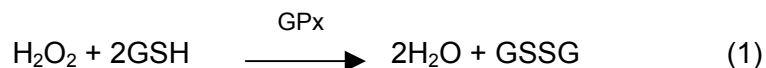
En la fase II se cataliza la adición de pequeñas moléculas a los xenobióticos generando nuevos enlaces covalentes, por lo que las reacciones se denominan como “reacciones de conjugación”, siendo el GSH, el ácido uridin-5-difosfo- α -D-glucorónico (UDPG), los acetiles, la S-adenosilmetionina (SAM) y el 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfato (PAPS) los cosustratos más comunes. Las enzimas que catalizan tales conjugaciones son la glutatión transferasa (GST), la uridin-5-difosfato-glucoronil-transferasa ó UDP-glucoronil-transferasa, la N-acetil transferasa, la metil-transferasa y la sulfo-transferasa, respectivamente. Para *T. solium* las reacciones de conjugación con glutatión son las de mayor importancia, no sólo por la abundancia del cosustrato y de las enzimas, sino también por la versatilidad que ofrecen y porque se han postulado como el principal mecanismo desintoxicante en helmintos ante la carencia de otros sistemas. Por último, se encuentran el conjunto de proteínas que permiten la transportación, compartimentalización y/o excreción de los conjugados o aniones orgánicos a eliminar y que constituyen la fase III, como las proteínas de resistencia a múltiples drogas ó MRPs (multidrug-resistance protein) y los transportadores de aniones orgánicos Oats (organic anion transporters). En *T. solium* aún no han sido estudiados este tipo de transportadores (Halliwell y Gutteridge, 2007; Precious y Barret, 1989; Torres-Rivera y Landa, 2008a; Tracy y Vande Waa, 1995).

Sistema Glutatión.

El GSH es una molécula ubicua y está constituida por ácido glutámico, cisteína y glicina en el orden L- γ -glutamil-L-cisteínil-glicina. Posee un papel importante en la defensa antioxidante, en el metabolismo de xenobióticos, en la diferenciación y proliferación celular, en la regulación de vías de señalización, en la expresión de algunos genes y como almacén de cisteínas, lo que explica su abundancia dentro de la célula en concentraciones que van de 0.1 a 10 mM. La parte más importante del GSH para la catálisis es la cisteína, que tiene el grupo tiol necesario para las reacciones redox así como para la restauración y mantenimiento de sulfhidrilos encontrados en enzimas, coenzimas y otras proteínas (Dickinson y Forman, 2002; Ketterer, 1986; van Blanderén, 2000).

Existen diversas condiciones por las que la cantidad de GSH en la célula decae, por ejemplo, la presencia de metales pesados, las concentraciones altas de glucosa, la presencia de RS, xenobióticos y metabolitos como los ecosanoides, así que es necesario regenerarlo. La reposición del GSH puede darse a partir de la reducción de GSSG (glutatión oxidado) mediante NADPH en una reacción catalizada por la glutatión reductasa, o por la síntesis *de novo*, donde intervienen la glutamato-cistein ligasa y la glutatión sintetasa. El GSH no suele reaccionar directamente con las moléculas a las que se une, sin embargo, en condiciones de estrés puede actuar como “agente de sacrificio” al interponerse entre las RS y otras biomoléculas, es por ello que también se le considera un biosensor, ya que al cambiar drásticamente el cociente GSH:GSSG se encienden diversas señales anti-estrés para tratar de regular el nivel de sulfhidrilos celulares. Además, el GSH actúa como cofactor de una serie de enzimas que se encargan de catalizar su oxidación o su conjugación con diversos xenobióticos como la glutatión peroxidasa, las glutaredoxinas y las GST (Dickinson y Forman, 2002; van Blanderén, 2000).

Las glutatión peroxidadas (GPx) se encargan de reducir H_2O_2 e hidroperóxidos orgánicos (ROOH) en agua y alcohol, respectivamente (reacciones 1 y 2), y se catalogan en dos clases principales: las selenio-dependientes y las no selenio-dependientes.



Aunque no se consideran enzimas pertenecientes al sistema de glutatión, las peroxirredoxinas son capaces de utilizar GSH para catalizar la reducción de diversos hidroperóxidos, por una vía diferente a la usada por las GPxs.

Las glutaredoxinas son enzimas de reciente estudio y muestran actividad tanto de peroxidasa como de transferasa. Hasta el momento no hay estudios que reporten su presencia en este cestodo (Chen et al, 2000; Collinson y Grant, 2003; van Blanderén, 2000).

Las GST constituyen una familia de enzimas que en general se encargan de catalizar la conjugación de GSH a una gran variedad de xenobióticos a fin de inactivarlos (reacción 3). Este grupo de proteínas se encuentra en todos los organismos y *T. solium* no es la excepción (Dickinson y Forman, 2002; Ketterer, 1986; van Blanderén, 2000).



Glutatión transferasas.

Las glutatión transferasas (GSTs; E.C. 2.5.1.18) integran una familia de enzimas que promueve la inactivación, degradación y excreción de una amplia diversidad de tóxicos, catalizando el ataque nucleofílico del GSH a sustratos electrofílicos. Estas enzimas se encuentran principalmente en tres áreas: las membranas, las mitocondrias y el citosol, pero también existe el reporte de GSTs extracelulares (Armstrong, 1994; Hayes et al, 2005; Jakobsson et al, 1999; Mannervik, 1985; Samiec et al, 2000; Torres-Rivera y Landa, 2008a).

En el caso particular de las GST citosólicas, éstas llegan a representar en diversos organismos del 3-4% de la proteína soluble total, indicando su alto nivel de expresión y lo necesario que son para la célula, no sólo como agentes desintoxicantes sino además, como lo han demostrado estudios recientes, en el transporte de moléculas; en la modulación de las cascadas de señalización por unión a cinasas; en la formación de canales iónicos y su modulación; en el catabolismo de algunos aminoácidos aromáticos así como la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas (Armstrong, 1997; Board et al, 2004; Cho et al, 2001; Herve, 2003; Mannervik, 1985; Tsuchida et al, 1987).

Al considerar exclusivamente su acción desintoxicante, las funciones que se establecen para las GSTs son: 1) La unión del GSH y la activación del grupo sulfhidrilo; 2) la unión del sustrato; 3) el establecimiento de las condiciones que permitan la conjugación del GSH y el xenobiótico. Dado que las especies reactivas son muchas y muy variadas, el tipo de reacción que se da con el GSH también es diverso, así que entre el tipo de catálisis identificadas se encuentran la sustitución nucleofílica aromática, la apertura de anillos de epóxidos, la adiciones reversibles tipo Michael a cetonas y aldehídos α , β insaturados e isomerizaciones. Con estas reacciones pueden neutralizarse una gran diversidad de compuestos, aunque también pueden formarse otras especies reactivas como los intermediarios de ión episulfonio cuando se conjuga GSH con haloalquenos (Armstrong, 1994; Hayes et al, 2005; Wilce y Parker, 1994).

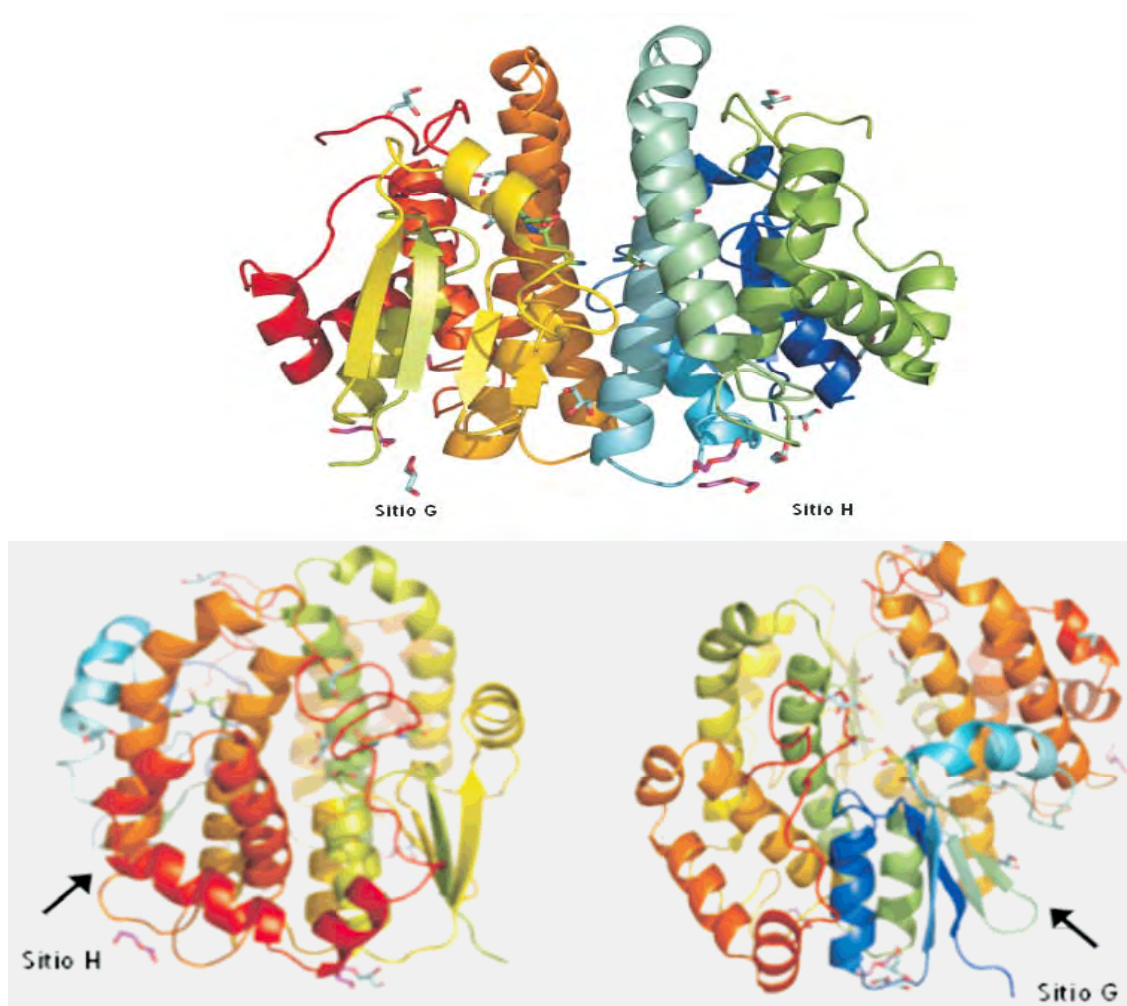


Figura 4. Distintas perspectivas de la estructura secundaria asociada a los sitios G y H de la GST de *T. solium* de masa 26 kDa. En la vista frontal el sitio G se muestra en color amarillo y en el se aprecia el plegamiento tipo tiorredoxina $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, por otra parte se muestra el sitio H en colores azul y verde el cual está compuesto sólo de hélices α ; en vista lateral los sitios H y G son señalizados con flecha.

Aunque el ataque nucleofílico se dirige principalmente hacia los átomos de carbono de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, haluros alquílicos y arílicos, así como de carboxilatos, este ataque también puede dirigirse hacia los átomos de nitrógeno en ésteres de nitrato, los sulfuros en los tiocianatos orgánicos o disulfitos y el oxígeno en hidroperóxidos orgánicos (Clark, 1989; Wilce y Parker, 1994).

En la topología de estas enzimas diméricas con monómeros de masas aproximadas de 23 a 28 kDa, se encuentra un área de unión al GSH en el dominio N-terminal que se conoce como sitio G y, en el mismo monómero, una zona de unión a electrófilos localizada en el dominio C-terminal denominada sitio H (Figura 4). También puede reconocerse un área entre la interfase dimérica que probablemente sea utilizado como sitio de unión para el transporte de moléculas o para los conjugados de GSH.

De los dos dominios existentes en cada monómero, el sitio G tiene una estructura conservada y parecida al plegamiento de las tioredoxinas que consiste en cuatro hojas β y tres hélices α en una sucesión β - α - β - α - β - α (Figura 4). El núcleo del dominio se constituye por el motivo $\beta\alpha\beta$ y se relaciona con la activación del grupo tiol del GSH, mediante el uso del grupo hidroxilo de aminoácidos como la serina (clase theta y zeta) y la tirosina (clases mu, pi, sigma), o bien por la coordinación entre tirosina y arginina (clase alpha) o el grupo tiol de la cisteína (clase omega). El motivo $\beta\beta\alpha$ también es un sitio muy importante debido a que se relaciona con el reconocimiento y unión de la porción γ -glutamil del GSH, además, en la hélice α_3 se reconoce la secuencia de aminoácidos SNAIL/ TRAIL que sirve como motivo consenso característico de las GST citosólicas de mamíferos y que en parásitos tiene ligeras variaciones sinónimas a dicho motivo. En su conjunto el sitio G abarca aproximadamente los primeros 80 aminoácidos que se conectan con el sitio H por un pequeño lazo compuesto de 5 a 7 residuos (Armstrong, 1997; Frova, 2006; Hayes et al, 2005; Sheehan et al, 2001; Torres-Rivera y Landa, 2008a; Wilce y Parker, 1994).

El dominio H se estructura sólo de hélices α , que en número pueden ir de cuatro (como en las clases Pi) hasta siete (como en Omega). La cifra de residuos va de 90 a 140 aminoácidos, que contribuyen en la diversidad de interacciones y afinidades por los sustratos y por ende las diferencias que existen entre los sitios H de las GST. Por lo tanto, cada monómero tiene un sitio catalíticamente activo y podría actuar de manera independiente, no obstante en la naturaleza la actividad de estas enzimas sólo se da cuando el dímero está formado.

Otras particularidades estructurales de las GST citosólicas que cabe destacar son las que se presentan entre los dominios N-terminal y C-terminal y caracterizan a ciertos grupos de GST. Por ejemplo, las clases Pi, Mu y Alpha contienen en el dominio H residuos de fenilalanina que sobresalen de la cadena e interactúan con la hélice α_2 y con la hoja β_3 del dominio G formando una especie de "llave-cerradura" en la interfase del dímero. Por el contrario las clases Sigma y Theta no contienen estos residuos, pero forman una interacción de tipo hidrofílico que establece puentes de hidrógeno entre las subunidades. Aparte de estas características ciertas clases poseen estructuras que las identifican, por ejemplo, el lazo localizado entre la hoja β_2 y la hélice α_2 del dominio G de la clase Mu, o la hélice extra en el sitio H llamada hélice α_9 en la clase Alpha; ambas estructuras aumentan la estabilidad del dímero (Armstrong, 1997; Frova, 2006; Hayes et al, 2005; Sheehan et al, 2001; Torres-Rivera y Landa, 2008a; Wilce y Parker, 1994).

Las propiedades de las GSTs ya mencionadas -estructura primaria, estructura terciaria y cuaternaria- aunadas a las propiedades cinéticas (especificidad al sustrato, sensibilidad al inhibidor), su localización en el genoma, la estructura de los genes que las codifican (secuencia nucleotídica, número y tamaño de intrones y exones) y la respuesta inmunológica que producen han permitido el reconocimiento, diferenciación y ordenamiento de diversas GST en clases, las cuales pueden ser organismo-específico o bien encontrarse dispersas en todos los reinos. Entre las GST citosólicas ubicuas se hallan a las clases mu (M), alfa (A), pi (P), theta (T), sigma (S), zeta (Z) y omega (O) de las cuales mu, sigma y pi son las clases más recurrentes en parásitos aunque se han identificado algunas GSTs de clase alfa y omega.

Aunque esta clasificación se da apegada a los parámetros y valores encontrados para las GSTs de mamíferos, las GSTs de parásitos tienden a poseer características que no concuerdan con lo ya reportado, como estructuras tridimensionales con sus sitios de unión o de interfase más expuestas al solvente que su contraparte en mamíferos o bien, valores en su actividad con diversos sustratos que tampoco se parecen a lo descrito. Es por tal motivo que muchas GSTs parasitarias no pueden ser asignadas a ninguna de las clases descritas en mamíferos, como en el caso de *Plasmodium falciparum*, ó han generado una nueva clase específica como recientemente sucedió en nematodos al encontrarse un nuevo tipo de GSTs denominadas Nu (Armstrong, 1997; Frova, 2006; Liebau et al, 2002; Schuller et al, 2005; Sheehan et al, 2001; Torres-Rivera y Landa, 2008a; Wilce y Parker, 1994).

En *T. solium* se han purificado a partir de extractos de cisticerco dos GSTs citosólicas de masa molecular similar: una de 25 kDa y otra de 26 kDa y algunas de sus propiedades bioquímicas ya han sido detalladas; además de demostrarse que estas enzimas son buenos blancos para reducir la carga parasitaria (Vivanco-Pérez et al, 1999; Vivanco-Pérez et al, 2002; Plancarte et al, 2004). En el caso de la GST de masa 26 kDa, que es la más abundante en el extracto parasitario, se produjo en forma recombinante (recTs26GST) para ser sometida a diversas pruebas de actividad, de catálisis, de reacción con anticuerpos, así como la generación del modelo tridimensional de la enzima a partir de un patrón de difracción de rayos X. Todos estos ensayos mostraron que la enzima puede categorizarse dentro de una nueva clase sin dejar de estar estrechamente relacionada con las existentes. La finalidad de estos estudios es sentar bases para el diseño de estrategias específicas para la inhibición o modificación del funcionamiento de la enzima, con el objetivo de hacer susceptible a *T. solium* al ataque farmacológico sin causar daños al hospedero.

Hipótesis

La caracterización bioquímica y estructural de la Ts26GST permitirá reconocer las diferencias con respecto a las GST de sus hospederos, lo cual ofrecerá datos que podrían servir como base para el diseño racional de nuevos fármacos contra la enzima.

Objetivos

- **General:**

Caracterizar bioquímica y estructuralmente la glutatión transferasa de 26 kDa de *Taenia solium* en su forma recombinante y establecer las diferencias respecto a las GST de su hospedero definitivo.

- **Particulares:**

- 1) Generar la recTs26GST.
- 2) Caracterizar bioquímicamente esta enzima.
- 3) Establecer su clase mediante reacciones antígeno-anticuerpo.
- 4) Realizar los ensayos de inhibición y su análisis (inhibidores clásicos y antiparasitarios).
- 5) Determinar la estructura tridimensional de la recTs26GST por cristalografía en rayos X.

Materiales y Métodos

Reactivos

Glutati3n reducido (GSH), 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), bromosulfaleina (BSF), 1,2-Dicloro-4-nitrobenceno (DCNB), 3cido ethacrinico (ETA) 1,2-Epoxy-3-(p-nitrofenoxo) propano (EPNP), hidroper3xido de cumeno (CHP), los alquenos trans-2-nonenal y hexa-2,4-dienal; inhibidores como Azul de Cibracron (CB), cloruro de trifeniltin (TFC), los antiparasitarios Albendazol, Mebendazol (MBZ), Tiabendazol y Prazicuantel fueron comprados a Sigma-Aldrich (ST. Louis, MI, USA). Las cepas de *Escherichia coli* C600hfl, TOP10 y JM105, las endonucleasas *Nco*I, *Bgl*II, y el vector pCRII (TOPO-TA Cloning kit Dual Promotor) fueron adquiridas a Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Las membranas de nylon y nitrocelulosa (Hybond), el estuche Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Sequencing, y los cebadores sentido y reverso para M13, as3 como el is3topo ³²P-dCTP se consiguieron en Amersham Bioscience (Buckinghamshire, UK). El estuche de cristalizaci3n con 48 condiciones diferentes de pH, amortiguadores y agentes precipitantes Crystal Screen 2 y cubreobjetos siliconizados fueron adquiridos a Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA). El resto de los reactivos utilizados fueron adquiridos con grado anal3tico a diferentes fuentes locales.

Generaci3n de la enzima recombinante y expresi3n.

Despu3s de obtener el ADNc para la Ts26GST, la regi3n codificadora de la enzima fue amplificada con los oligonucle3tidos GSTNco (5'-CAT-GCC-ATG-GAT-AAG-TAC-AAA-TTC-GCC) y GST27-X2 (5'-GGA-AGA-TCT-TCC-TTA-TCT-TTT-TTT-AGG-GG) con los sitios de restricci3n para las endonucleasas *Nco*I y *Bgl*II, respectivamente. Los primeros cuatro amino3cidos, MNKY, no fueron encontrados en el ADNc para la Ts26GST, pero 3stos ya hab3an sido determinados previamente a trav3s de la degradaci3n de Edman de una parte del N-terminal de la enzima (Vivanco-P3rez et al, 2002), por lo que fueron adicionados al oligo GSTNco. Por medio de la RT-PCR usando ARNm del par3sito y los oligos antes mencionados se amplific3 la regi3n codificante para la Ts26GST. Este fragmento ligado al vector pCRII-TOPO para su secuenciaci3n (y analizado con el programa PC/GENE) fue digerido con las enzimas *Nco*I y *Bgl*II. El fragmento de Ts26GST obtenido fue subclonado en el pl3smido de expresi3n pTR99A, previamente digerido con las mismas endonucleasas. La construcci3n nombrada GST26-pTR99 fue utilizada para transformar c3lulas *E. coli* de la cepa JM105.

Para su expresi3n, un cultivo de bacterias transformadas se creci3 en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con ampicilina (50 μ g/mL) durante toda la noche a 37°C. Este cultivo fue transferido a 500 mL de medio LB-ampicilina nuevo y se mantuvo en crecimiento a 37°C y con agitaci3n hasta alcanzar una lectura OD_{600nm} de 0.6. Entonces se adicion3 el Isopropil- β -d-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentraci3n final de 2mM y se dej3 crecer el cultivo a 37°C por 3.5 horas con agitaci3n constante. Despu3s de este tiempo, el cultivo se centrifug3 a 1034g durante 10 minutos, se descarto el sobrenadante y el precipitado bacteriano se lav3 tres veces con PBS.

Purificaci3n.

El precipitado bacteriano fue resuspendido con amortiguador de suspensi3n (0.15M NaCl, 0.1 M de fosfato de potasio, pH 7.4, 1% triton, 0.5M EDTA) y se lis3 por sonicaci3n. El proceso fue llevado a cabo a 4°C en tres periodos de tres minutos de duraci3n: 1 minuto

de sonicación y 2 minutos de reposo y enfriamiento entre cada sonicación. La suspensión fue centrifugada a 8804g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante generado fue diluido con amortiguador de columna (PBS con 1% de triton, pH 7.4) con una relación 1:2 y filtrado a través de una membrana con poro de 0.45- μm . El filtrado se cargó en una columna de Sepharose-GSH previamente equilibrada con amortiguador de columna y vuelto a pasar a través de ella en tres ocasiones. Posteriormente la columna se lava con PBS hasta que ninguna proteína es detectada en el lavado cuando se lee espectroscópicamente a 280 nm. La proteína unida a la Sepharose-GSH es eluída con amortiguador de elusión (50mM Tris-HCl, 5mM GSH, pH 8.0). La fracción eluída se concentra por ultrafiltración usando el equipo Amicon ultrafiltration system (Millipore, USA).

La cuantificación de la recTs26GST se realizó por espectroscopia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de 38390 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima (<http://www.expasy.org/>; Pace *et al*, 1995) y por el método de Lowry leyendo a una longitud de onda de 600 nm. Las lecturas se realizaron en el equipo Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Bioscience). La pureza de la enzima fue determinada en geles de poliacrilamida al 12.5% (Laemmli, 1970) teñidos con azul de Coomassie (Gibco-BLR).

Ensayos de actividad.

La actividad de la recTs26GST fue determinada de acuerdo al método de Habig (Habig & Jacoby, 1981) usando el sustrato universal para las GSTs, el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) ($\Delta\epsilon=9.6 \text{ m M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) disuelto en 1.5% etanol (v/v). La reacción fue seguida por espectroscopia a 340 nm en el amortiguador de reacción (0.1M de fosfato de potasio, pH=6.5, 1mM GSH) durante 3 minutos, tiempo promedio en el cual ocurre la relación lineal de dicha reacción. La actividad específica se calculó con la fórmula:

$$V \left(\frac{A_2 - A_1}{\Delta \epsilon (t_2 - t_1)(\ell)(w)} \right)$$
 siendo V el volumen total de la reacción en mL, A_2 y A_1 las

absorbencias en el tiempo final e inicial t_2 y t_1 que fue medido en segundos, $\Delta\epsilon$ el coeficiente de extinción del sustrato ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), ℓ el paso de luz en la celda (cm) y w la cantidad de proteína (mg).

Actividades a diferentes pHs, temperaturas y cantidades de enzima.

Los ensayos de actividad con diferentes condiciones se realizaron en tres grupos. En el primer grupo, el pH fue variado en un intervalo de 4 a 12 con lecturas cada 0.5 unidades. Los tres amortiguadores usados fueron: citratos para el intervalo 4-6; fosfatos para el intervalo 6.5-8.5 y Tris-base para el intervalo 9-12. En el otro grupo, la temperatura fue variada de 4 a 90°C tomando lecturas en las siguientes temperaturas: 4, 30, 40, 50, 70, 90°C. Finalmente, también fueron consideradas diferentes cantidades de proteína al cuantificar la actividad de la enzima empezando en 0.78 μg hasta llegar a 15.6 μg , doblando la cantidad de proteína en cada lectura (0.78, 1.95, 3.9, 7.8 y 15.6 μg).

Determinación de parámetros cinéticos.

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó en dos grupos. En el primer grupo de ensayos el GSH se mantuvo en la mezcla de reacción a una concentración constante de 5mM, mientras que para el CDNB las concentraciones variaron de 0 a 7.5 mM. En el segundo grupo de ensayos, la concentración del CDNB se fijó en 7mM, mientras que la concentración de GSH cambió en un intervalo de 0.1 a 6 mM. Para el grupo de ensayos

en donde se varió la concentración de CDNB las temperaturas de reacción fueron 25°C y 37°C. Las curvas procesadas con el software Origin (OriginLab Corporation) fueron analizadas con las pruebas estadísticas F y Akaike usando el software GraphPad Quickcals (<http://www.graphpad.com/welcome.htm>) a fin de comparar los modelos Michaelis-Menten y Hill. El número de Hill fue calculado con la ecuación de Hill que se encuentra en el programa Origin.

Determinación de los patrones de unión. Ensayos de fluorimetría.

Los cambios en la fluorescencia intrínseca de la enzima al adicionar CDNB y en ausencia de GSH fue seguida para determinar el patrón de unión del sustrato hidrofóbico. La longitud de onda de excitación para la proteína fue de 290nm con un espectro de emisión de 337nm (el CNDB no tiene un patrón de emisión interferente con la enzima al presentar una longitud de onda de 320nm). Las concentraciones usadas de CDNB están en un intervalo de 0 a 0.45mM. Las medidas fueron realizadas en condiciones isotérmicas a 25°C por 4 minutos en una celda de cuarzo con paso de 1 cm usando un amortiguador de fosfatos a 0.1M, pH 6.5 y con 50 µg de GST. Las mediciones fueron realizadas en el espectrofluorómetro ISS K2 (ISS K2, Illinois, USA) y los datos fueron procesados con la siguiente ecuación: $1 - \left(\frac{Fp' - Fb}{(Fp - Fb) \left(\frac{Vb}{Vt} \right)} \right)$ donde Fp es la fluorescencia de la proteína en

condiciones iniciales, Fp' es la fluorescencia de la proteína en condiciones del ensayo, Fb es la fluorescencia del amortiguador, Vb es el volumen del amortiguador en la reacción con la enzima adicionada y Vt es el volumen total en la cuba de reacción.

También se determinó la influencia del GSH en la unión del CDNB a través del apagamiento en la fluorescencia de la enzima cuando diferentes concentraciones de CDNB fueron adicionadas a la mezcla de reacción con diferentes concentraciones de GSH (0.1, 0.5 y 5 mM). Los datos fueron procesados con la ecuación descrita anteriormente. En todos los ensayos la contribución del amortiguador más el CDNB fue medida en las mismas condiciones usadas para la medición de la proteína y fueron sustraídas a cada uno de los ensayos.

Determinación de actividad con sustratos alternos.

Las actividades con ETA, BSF y los alquenes (nonenal y hexadienal) fueron determinadas usando el procedimiento de Habig y Alin (Alin et al, 1985). La determinación de las actividades con CHP fue mediante ensayos acoplados según las descripciones hechas por Lawrence (Lawrence & Burk, 1976) usando 1.2 mM CHP, 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH y 1U GSH reductasa en amortiguador de fosfato de potasio 0.1M, pH 7.0. La reacción se inicia con la adición del CHP. Todas las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro a temperatura ambiente (23°C ± 1°C).

Ensayos de inhibición con marcadores de clase. Tipo de inhibición y constantes.

Los ensayos de inhibición con CB, TPC y BSF se realizaron fijando el GSH a 5mM y variando las concentraciones de CDNB a 0.5, 1, 2, 5 y 7 mM. Para los dos primeros inhibidores las concentraciones usadas fueron 0.5, 1, 5 µM. Para el BSF las concentraciones fueron 1, 5, 10, y 15 µM. A partir de estos ensayos se determinó el tipo de inhibición, los valores de IC₅₀ en condiciones saturantes (7mM) y no saturantes (1mM) de CDNB, así como el valor de Ki.

Ensayos de inhibición con fármacos antihelmínticos.

Los ensayos de inhibición con praziquantel, albendazol, tiabendazol y mebendazol se realizaron a concentraciones fijas de GSH (1mM) y CDNB (1mM). Las cantidades utilizadas de cada antihelmíntico fueron 100, 250 y 500 μ M. Los tiempos de incubación usados fueron 10 y 30 minutos.

Determinación del patrón de inhibición del Mebendazol.

Los ensayos de inhibición para mebendazol se llevaron a cabo con una concentración de 5mM de GSH y con concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 3.5, 5 y 7 mM de CDNB. El mebendazol fue disuelto en etanol para generar una suspensión y usado a 50, 100, 250 y 500 μ M para construir el gráfico de Dixon.

Reacciones cruzadas.

Para la caracterización de la clase de la recTs26GST usando anticuerpos, ésta se confrontó con varios sueros específicos policlonales obtenidos de conejos. Se inmunizó con tres diferentes clases de GST de humano (alpha subclase 1 (A1), mu subclase 1 (M1) y pi subclase 1 (P1)) y con la GST26 de *Schistosoma mansoni*. El esquema de generación de los sueros fue mediante cuatro inmunizaciones usando 200 μ g de enzima más 200 μ L de adjuvante completo (1^a inmunización) e incompleto (resto de las inmunizaciones) de Freund. Del mismo modo, el suero anti-recTs26GST a diluciones 1:1000, 1:500 y 1:100 fue confrontado con las GSTs de humano (A1, M1 y P1) y con la GST26 de *S. mansoni* transferidas a una membrana de nitrocelulosa a partir de un gel desnaturante de acrilamida al 12.5% calculando cargar 1 μ g de enzima por cada mm longitudinal de membrana a usar (técnica de inmunoelectrotransferencia).

Determinación de las condiciones de cristalización.

La generación del cristal se realizó mediante la metodología de difusión de vapor por gota colgante usando como solución madre una mezcla de Tris-HCl 0.1M a pH 8.5 como amortiguador, cloruro de níquel hexahidratado 0.01M y polietilenglicol 2000 al 20% como agentes precipitantes. Esta composición forma parte de las 48 condiciones del estuche Crystal Screen 2 de Hampton Research. En la gota colgante se mezclaron 4 μ L de solución madre y 4 μ L de recTs26GST con una concentración de 3 mg/mL. Después de mes, a una temperatura aproximada a los 18°C, se observó la formación de pequeños cristales rectangulares con apariencia de aguja.

Patrón de difracción y Mapa de densidad electrónica.

El patrón de difracción de rayos X del cristal se generó en el Sincroton NLSL (National Synchrotron Light Source, Brookhaven, N.Y., U.S.A) a una temperatura de 100 K. Los datos de difracción fueron analizados posteriormente con el programa MOSFLM. El escalamiento de los datos se hizo mediante el programa SCALE contenido en la suite de programas de CCP4. El problema de las fases fue resuelto mediante reemplazo molecular usando el programa MOLREP perteneciente al software CCP4 y usando como molécula molde una GST de rata, clase mu, subclase 3 (con código de entrada al Protein Data Bank 6GSV), obteniendo así los mapas de densidad electrónica y un primer modelo de construcción.

Afinamientos y deposición en el Protein Data Bank (PDB).

El afinamiento del primer modelo y de los subsecuentes se realizó con los programas REFMAC de la suite de CCP4 y con CNS (versión 1.1). Para los afinamientos con REFMAC se usó restricción de parámetros en cuerpo rígido más dos TLS, mientras que para CNS fue utilizado el afinamiento del factor B individual. Los afinamientos se llevaron a cabo después de cada mejoramiento y justificación de las densidades electrónicas observadas y trabajadas en el programa QUANTA. El modelo final fue procesado con el archivo xtal_submission del programa CNS y su calidad verificada con el programa PROCHECK antes de ser depositado en el Protein Data Bank.

Resultados

Expresión y purificación de la GST26 recombinante.

Mediante el sistema de expresión GST26-pTR99 fue posible obtener en un solo paso de purificación a la recTs26GST después de que el extracto crudo bacteriano ha sido procesado. El resultado del paso de este extracto por la columna de afinidad Sepharose-GSH, es un enriquecimiento en la actividad de la enzima con un rendimiento aparente 1000% (Tabla 1). Aunque no se sabe exactamente la causa de esta activación, el resultado fue consistente en todos los lotes que se ensayaron.

La pureza obtenida para la recTs26GST, con respecto al extracto crudo, se comprobó en geles desnaturizantes de acrilamida al 12.5% (SDS-PAGE) como el que se aprecia en la figura 5, donde se observa una banda por encima del marcador de 24.5 kDa (ver último carril) que corresponde al monómero de la enzima que en estado natural es dimérica. Esta migración era la esperada, pues la predicción de su masa molecular hecha a partir de la secuencia de aminoácidos y usando herramientas bioinformáticas arrojó una masa aproximada de 25908 Da.

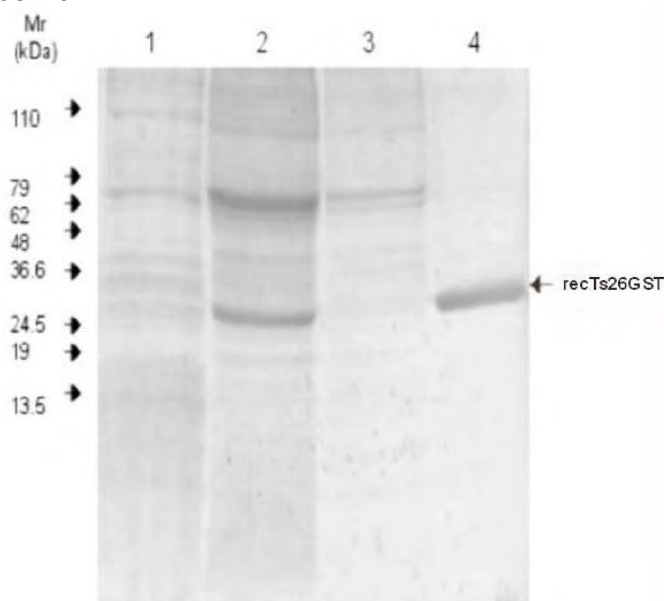


Figura 5. Purificación de la recTs26GST: Carril 1) Se observa el extracto bacteriano sin inducción de la proteína; Carril 2) El extracto bacteriano después de la inducción con IPTG; Carril 3) El extracto bacteriano con la proteína inducida después de haber sido pasado por la columna de sepharosa-GSH; Carril 4) Se muestra la proteína eluída.

Tabla 1. Resumen de la purificación

Muestra	Volumen (mL)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (U)	Rendimiento aparente (%)
Extracto bacteriano	10	80.5	0.25	20.12	100
recTs26GST	2	14.8	13.61	201.43	1001

Determinación de los parámetros cinéticos aparentes de la recTs26GST.

Con los valores de actividad específica a saturación de GSH y CDNB, alternadamente y en serie de tres repeticiones, se construyeron diferentes gráficos que manifestaron una cinética no-hiperbólica, tal y como se muestra en la gráfica directa de actividad (panel A), en la gráfica de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos, panel B) y en el gráfico de Eadie-Scatchard (panel C) de la figura 6. En todos los gráficos se despliega un comportamiento no-Michaeliano, por lo que estos datos fueron sometidos a pruebas estadísticas para encontrar el modelo que mejor predijera su comportamiento.

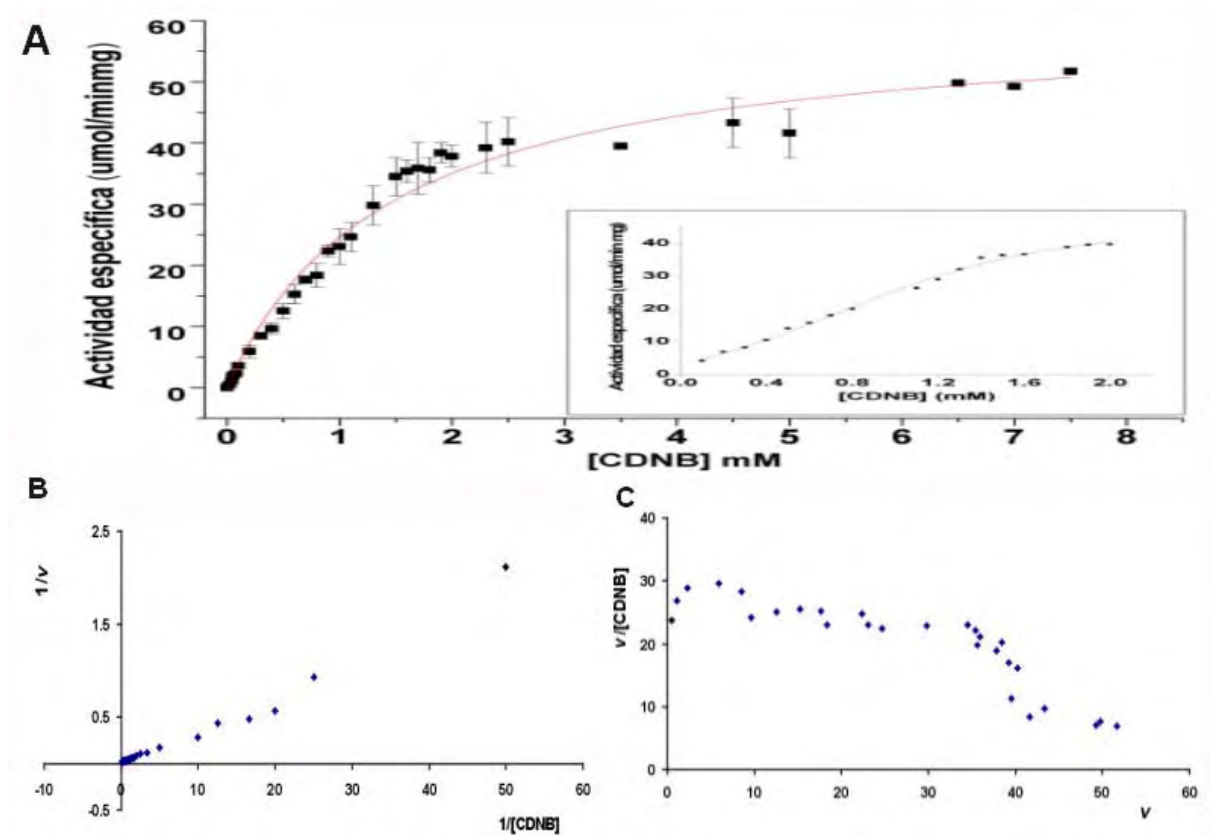


Figura 6. Gráficos de actividad de la recTs26GST en concentraciones saturantes de GSH y variando las concentraciones de CDNB. Panel A Gráfico directo de actividad. Panel B Doble recíproco y panel C Grafico de Scatchard.

Las pruebas estadísticas *F* y Akaike fueron usadas para comparar el ajuste de datos en los modelos Michaelis-Menten y Hill, y ambas pruebas estadísticas arrojaron que la ecuación de Hill tenía una probabilidad entre 95 al 99.85% de ser el modelo correcto para la descripción con respecto al modelo Michaelis-Menten.

Para ambos sustratos, CDNB (figura 6) y GSH (figura 7), así como en los ensayos a 25°C y a 37°C (gráficos no mostrados), el mismo patrón ligeramente sigmoidal fue observado y confirmado mediante las pruebas estadísticas. En estas curvas de actividad el número de

Hill fue de 1.46 y se obtuvo directamente de las iteraciones calculadas en el programa Origin.

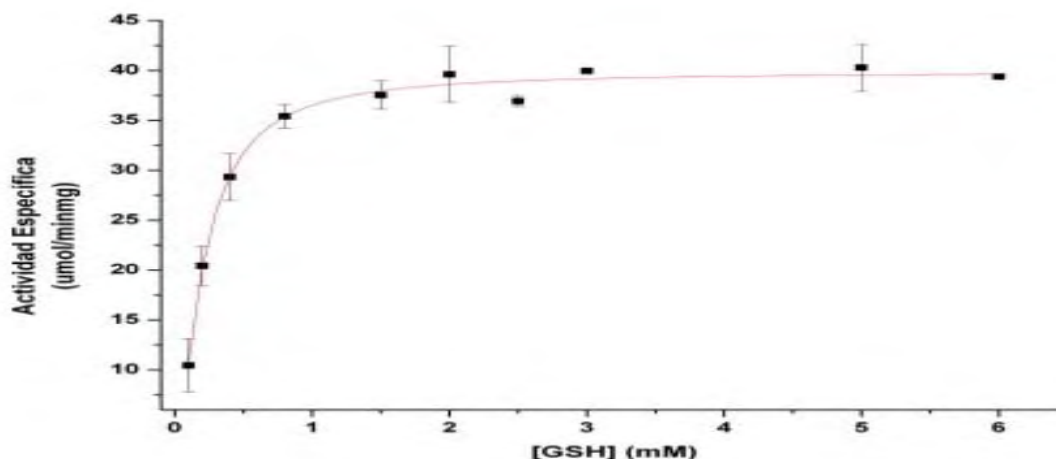


Figura 7. Gráfico de actividad de la recTs26GST en concentraciones saturantes de CNDB variando las concentraciones de GSH.

Los análisis de ambas curvas definen los parámetros de catálisis de la enzima que se resumen en tabla 2:

Parámetro cinético	recTs26GST
$V_{max_{ap}}(CNDB)$	$51.5 \pm 1.66 \mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$K_M(CNDB)$	$1.06 \pm 0.06 \text{ mM}$
$k_{cat}(CNDB)$	22.2 seg^{-1}
$k_{cat}/K_M(CNDB)$	$2.1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$
$V_{max_{ap}}(GSH)$	$39.9 \pm 0.55 \mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$K_M(GSH)$	$0.20 \pm 0.01 \text{ mM}$
Número de Hill h	1.46 ± 0.13

Al comparar los valores de V_{max} , K_M y k_{cat} para CNDB de la recTs26GST con los valores reportados para otros organismos se observa que éstos son similares a los obtenidos para las GSTs clase alpha de *Pagrus major* y de *Rivulus marmoratus* (Konishia et al, 2005; Lee et al, 2006).

Determinación de la cooperatividad en la recTs26GST con el CNDB.

Con la finalidad de establecer la causa de las cinéticas no-hiperbólicas en la recTs26GST, se escogió, dentro de diversas opciones, distinguir entre un sistema cooperativo o un mecanismo al azar en estado estacionario, debido a que éstos son los principales mecanismos catalíticos descritos para las GSTs citosólicas (Jakobson et al, 1977; Liebau et al, 2005; Ricci et al, 2004). Al medir la unión del CNDB con la enzima, monitoreando el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la recTs26GST, se identificó el mecanismo que generaba tales cinéticas.

Nuevamente una curva sigmoïdal fue obtenida, tal como se aprecia en la figura 8 (panel A). Aplicando la ecuación de Hill a los datos de la curva se obtuvo una $h= 1.58$ confirmando un proceso con cooperatividad positiva.

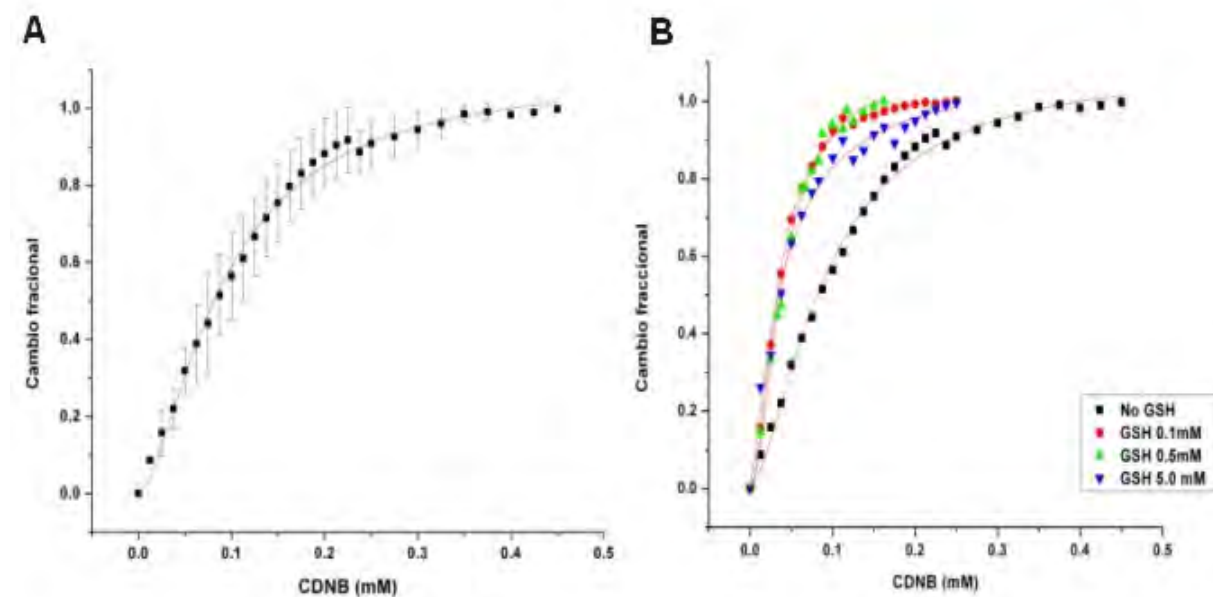


Figura 8. Gráficas del apagamiento de la fluorescencia de la recTs26GST. En el panel A se muestra la curva promedio de apagamiento en los ensayos realizados en presencia sólo de CDNB. El panel B muestra la influencia del GSH a diferentes concentraciones (■ Sin GSH; ● 0.1 mM GSH; ▲ 0.5 mM GSH y ▼ 5 mM GSH) sobre las curvas de apagamiento al adicionar CDNB.

También se determinó la influencia del GSH en la unión del CDNB a la recTs26GST siguiendo el apagamiento de la fluorescencia de las tirosinas. El resultado nos muestra que inclusive a bajas concentraciones de GSH, las curvas tienen desplazamientos hacia la izquierda del cuadrante (ver panel B de la figura 8), indicándonos un posible cambio en la afinidad de la enzima por el sustrato, en este caso el CDNB.

Actividad con sustratos e inhibidores marcadores de clase.

Como parte de la caracterización de la enzima era importante establecer la clase a la cual puede pertenecer, debido a que es la clase, e inclusive la subclase, la que determina su preferencia por ciertas funciones y sustratos, haciendo distinguible su comportamiento. Con ese objetivo se escogieron diversos compuestos que al ser usados como sustratos o inhibidores pueden dar indicios sobre la clase de GST a la que podría pertenecer la recTs26GST. Los resultados se resumen en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Actividad específica con marcadores de clases de GST.

Sustrato	Marcador de clase	Actividad específica (umol/minmg)
CNDB	Todas(menos T)	51.5 ± 1.66
1,2-Epoxi-3-(p-nitrofenoxi)-propano	T	No detectada
3,4-Dicloro-4-nitrobenceno	M	0.22 ± 0.03
Bromosulfataleína	M	No detectada
2,4-Hexadienal	A, estrés	0.53 ± 0.09
<i>trans</i> -2-Nonenal	A, estrés	0.4 ± 0.09
Hidroperóxido de cumeno	A	2.48 ± 0.0
Ac. Etacrínico	P, A	3.51 ± 0.64

T= theta, M= mu, A= alpha, P= pi.

En el caso de los sustratos marcadores de clase (Tabla 3) es apreciable que la enzima muestre una actividad mayor con los marcadores de la clase alpha, como son el CPH y el ETA, que con el resto de los sustratos. En menor medida, la recTs26GST muestra actividad con los marcadores de estrés, los alquenes.

En la tabla 4 se muestran los ensayos realizados para tres inhibidores que son marcadores para las clases alpha y mu. Los valores de K_i se obtuvieron mediante gráficos de Dixon (no mostrados), construidos con datos de tres series de ensayos para cada uno de los inhibidores. Las I_{50} se obtuvieron mediante gráficos de actividad porcentual contra la concentración del inhibidor bajo condiciones no saturantes ($[CNDB]=1mM$) y saturantes ($[CNDB]=7mM$).

Tabla 4. Ensayos de actividad de GST con inhibidores clásicos

Inhibidor	Marcador de clase	Actividad específica (umol/minmg)	K_{ii} (um)	K_{is} (um)	I_{50} Sat (um)	I_{50} No sat. (um)	Patrón de inhibición
CNDB (sustrato)	Todas	18.43	----	----	----	----	----
Ensayo sin inhibidor	(menos T)						
Azul de cibacrón	M	3.79	1.5	1.6	0.07	0.20	Mixta
Cloruro de trifeniltín	M	7.01	2.3	1.5	5.39	0.95	Mixta
Bromosulfataleína	A	5.52	3.4	1.41	6.05	2.29	Mixta

T= theta, M= mu, A= alpha.

Como se aprecia, la recTs26GST resultó más sensible a CB y al CTF que a la BSF, los dos primeros marcadores de la clase mu, el último marcador de la clase alpha.

Reconocimiento por anticuerpos.

Otra forma de clasificar a las GSTs es mediante el reconocimiento por anticuerpos específicos de clase. Para esto se usaron anticuerpos policlonales en contra de las clases alpha, mu y pi de mamífero y contra una GST26 de *Schistosoma mansoni* que posee una identidad del 40% con la recTs26GST. La dilución utilizada de los sueros en los ensayos fue de 1:50, 1:100 y 1:500. El resumen de los resultados con la dilución 1:50 se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Ensayos de reacción cruzada

Ag	Sueros (1:50)				
	α recTs26GST	α GSTM1	α GSTA1	α GSTP1	α GSTSm
recTs26GST	+++	-	-	-	-
GSTM1	-	+++	-	-	-
GSTA1	-	-	+++	-	-
GSTP1	-	-	-	+++	-
GSTSm	+	-	-	-	+++

(+++)= reconocimiento fuerte, (+) = reconocimiento débil, (-) = sin reconocimiento

Los datos anteriores muestran que los anticuerpos anti-recTs26GST reconocen a la recTs26GST, débilmente a la GST de *S. mansoni* y no reconocen a las GSTs clases alpha (A1), mu (M1) y pi (P1) de mamífero. Por otra parte, los anticuerpos dirigidos contra las GSTs de mamífero y de *S. mansoni* no reconocen a la recTs26GST de tal manera que no hay reacción cruzada entre la recTs26GST con las GSTs de mamífero y con la GST26 de *S. mansoni*.

Obtención de la estructura tridimensional de la recTs26GST.

De las 48 condiciones probadas con el estuche Crystal Screen2 sólo en tres hubo crecimiento de cristales. No obstante, en dos de esas tres condiciones los cristales no tenían el tamaño ni la forma requerida para ser manipulables en la siguiente etapa del proceso, por ello únicamente se difractó el cristal que por su crecimiento en la condición ya descrita en la sección de "Materiales y Métodos" podía resistir el proceso de recolección de datos.

El resumen del proceso de colección de datos generados en la difracción, así como los resultados de la estadística obtenida en los diversos procesos de afinamiento, se describen en la tabla 6, de donde se desprende el grupo espacial encontrado para el cristal que es el P212121 con valores de celda en a = 64.82, en b = 74.48 y en c = 95.56 con ángulos de $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Dentro de la celda unitaria se encontró un homodímero que corresponde a la unidad biológica en la que las GSTs citosólicas suelen plegarse para realizar su actividad.

Tabla 6. Colección de datos y estadística del afinamiento

Grupo espacial	P212121
Dimensiones de la celda (Å)	a = 64.82 b = 74.48 c = 95.56 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Reflexiones totales	464846
Reflexiones únicas totales	74108
Reflexiones usadas para el afinamiento	70291
Reflexiones usadas para el cálculo de Rfree	3743
Límites de resolución (Å)	49 -1.5
I/ σ	21 (2.7)
Rmerge	0.054 (0.37)
Integridad de los datos (%)	99.2 % (95.5%)
Redundancia	6.3 (3.6)
Porcentaje probable de solvente	45 %
Rfactor	0.196
Rfree	0.220
No. de átomos proteicos	3793
Promedio del factor B	17.1
No. átomos de ligantes	123
No. átomos del solvente	442
Desviaciones (rms) de la geometría ideal	
Distancias de unión	0.010
Ángulos de unión	1.5
Gráfico de Ramachandran	
Residuos en las regiones más favorecidas (%)	92.8 %
Residuos en regiones permitidas (%)	7.2 %
Residuos en regiones no permitidas (%)	0 %

Después de la colección de datos, escalamiento e integración, se procedió a generar el modelo tridimensional de la recTs26GST a través del mapa de densidad electrónica obtenido por reemplazo molecular. El resultado global de este proceso se muestra en las figuras 9 a 13, en donde se reconoce la presencia de una molécula proteica con un plegamiento global característico de las GSTs citosólicas (Dirr et al, 1994; Wilce & Parker, 1994). El modelo final de la estructura de la recTs26GST fue ingresada al Protein Data Bank (PDB) el 13 de febrero del 2009 y le fue asignado el código de registro (ID) 3G9S.

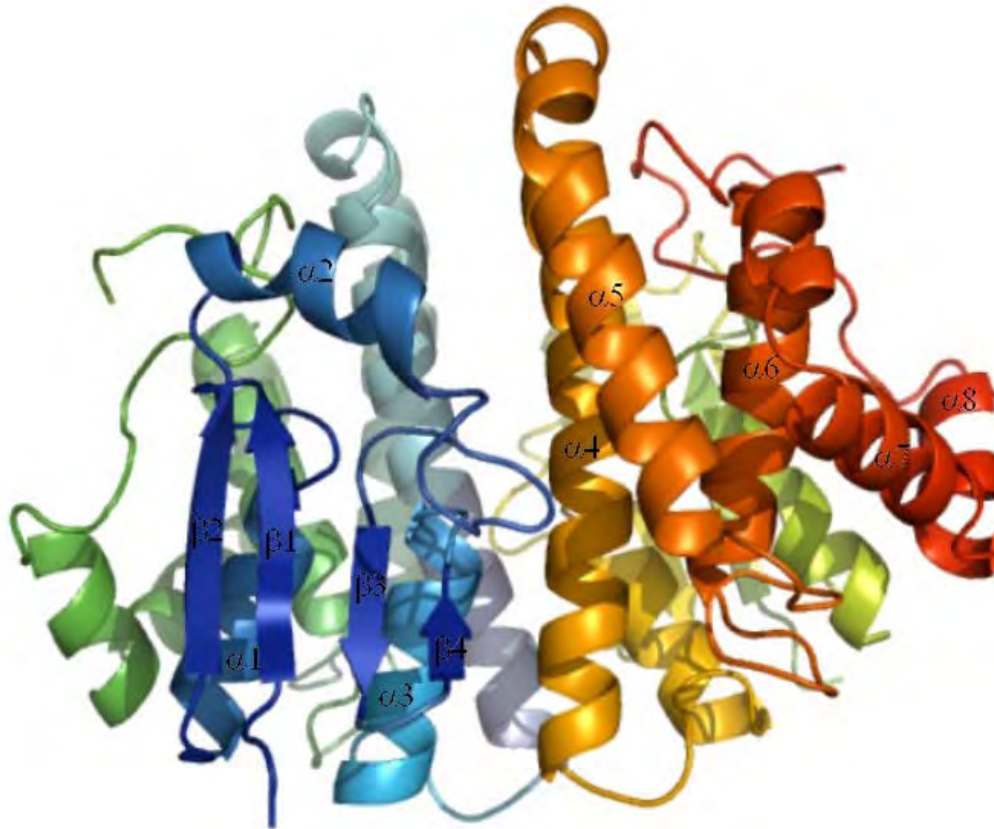


Figura 9. Representación en cintas de la recTs26GST dimérica. En tonos azules se presenta el sitio G conformado por 3 hélices alpha y 4 hojas beta, mientras que el sitio H esta conformado por 5 hélices alpha se presenta en tonos naranjas.

La estructura de la recTs26GST (Figura 9) presenta como el resto de las GSTs citosólicas un sitio de unión a GSH (sitio G) y uno de unión a electrófilos (sitio H). En el sitio G se observa el plegamiento tipo tioredoxina conformado por dos pares de hojas beta, las cuales corren en forma paralela y anti-paralela, además de 3 hélices alfa que las conectan. El sitio H está formado de 5 hélices alfa de diversa longitud. En el plegamiento global de la recTs26GST no se observa ninguna estructura secundaria peculiar que pudiera ubicarla dentro de alguna clase conocida para las GSTs citosólicas, como pudiera ser un lazo o una hélice extra (Dirr et al, 1994).

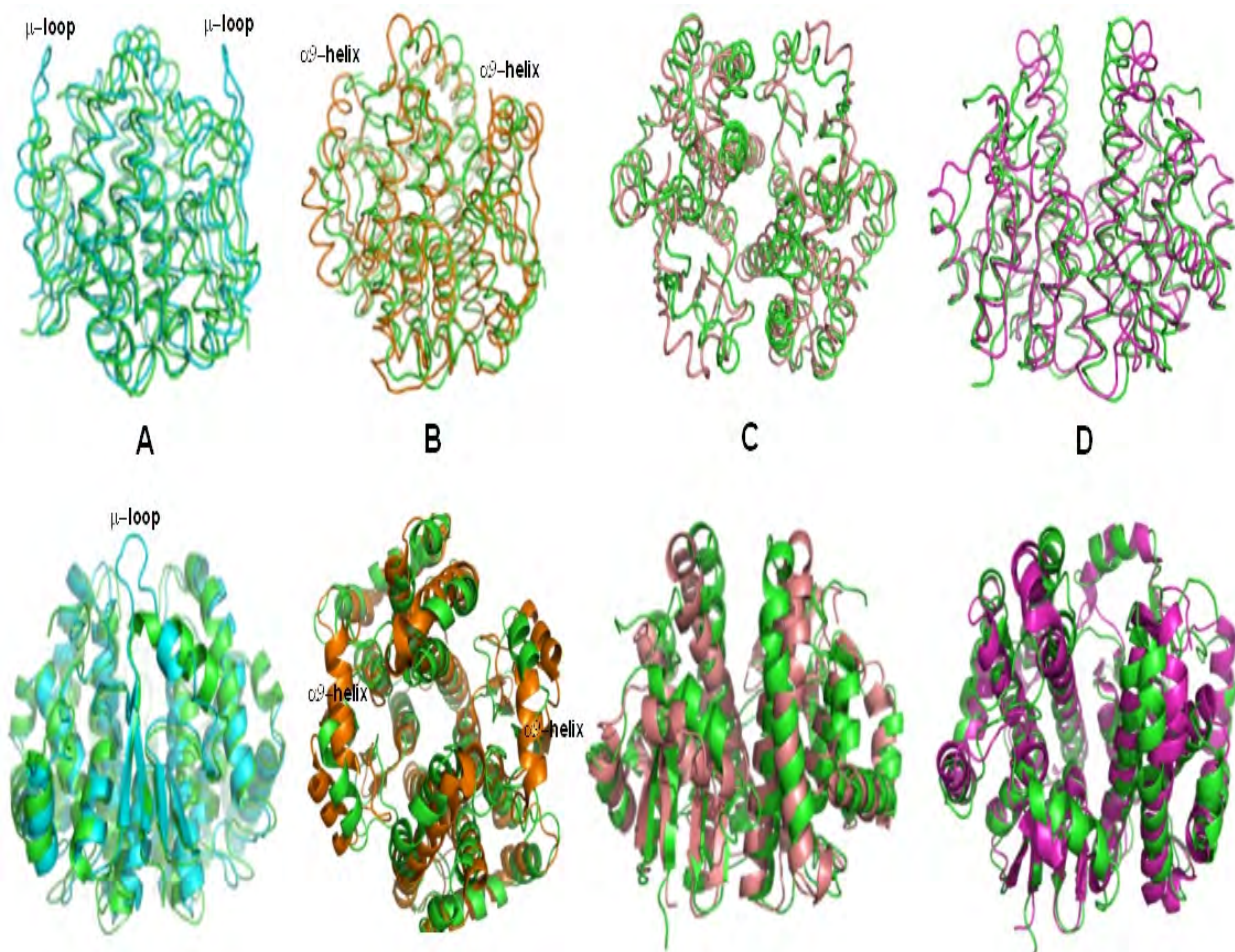


Figura 10. Comparativos de las estructuras secundarias y terciarias entre la recTs26GST y GST de diversas clases mostradas en representaciones tipo cinta. En el panel A se muestra la comparación entre la recTs26GST (estructura en verde) y la 6GSV (GSTM3 de *Rattus norvegicus*, estructura en azul) que se usó como estructura molde para el reemplazo molecular. En ambas representaciones puede apreciarse la falta del “lazo mu” En el panel B se muestra el alineamiento estructural de la recTs26GST con una GST A3 de humano (1TDI, estructura en naranja) donde es visible que la recTs26GST carece de la “hélice-9”. En los cuadros C y D la recTs26GST está alineada con GSTs de la clase pi, una de humano (8GSS, estructura en rosa) y una GST del nematodo *Onchocerca volvulus* (1TU7, estructura en púrpura), en ambos casos hay un buen empate entre las estructuras.

El resultado de los alineamientos estructurales de los esqueletos de carbono con 12 moléculas representativas de las clases alpha, mu y pi de mamíferos, así como de GSTs de parásitos, se exponen en la tabla 7. Los valores que se aprecian en la tabla denotan la gran distancia que hay entre estas estructuras a pesar de que con todas la recTs26GST mantiene similitudes. Algo similar es observado en la figura 10, donde la GST del ténido muestra una arquitectura semejante a la clase pi. En esa misma figura se observa la falta del “lazo mu” en la recTs26GST que es una estructura exclusiva de las cinco subclases mu, así como la ausencia de la “hélice-9” presente en las 4 subclases alpha.

Tabla 7. Medición de las diferencias entre la recTs26GST y otras GSTs

Estructura comparada y clase de GST	Organismo	Distancia r.m.s. (Å)
6GSV (M3-3)	<i>Rattus norvegicus</i>	1.8715
1XW6 (M1A-1A)	<i>Homo sapiens</i>	2.0792
1GTU (M1A-1A*)	<i>Homo sapiens</i>	1.9679
1XW5 (M2-2)	<i>Homo sapiens</i>	1.8968
4GTU (M4-4)	<i>Homo sapiens</i>	1.7888
1GSD (A1-1*)	<i>Homo sapiens</i>	2.3219
1TDI (A3-3)	<i>Homo sapiens</i>	2.2767
1TU7 (Pi)	<i>Onchocerca volvulus</i>	1.8940
1TW9 (Nu)	<i>H. polygyrus</i>	2.6926
1Y6E	<i>Schistosoma japonicum</i>	1.9103
1ZL9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	2.9177
1FHE*	<i>Fasciola hepatica</i>	1.4200

* Estructura apo

•Alineamiento con el monómero

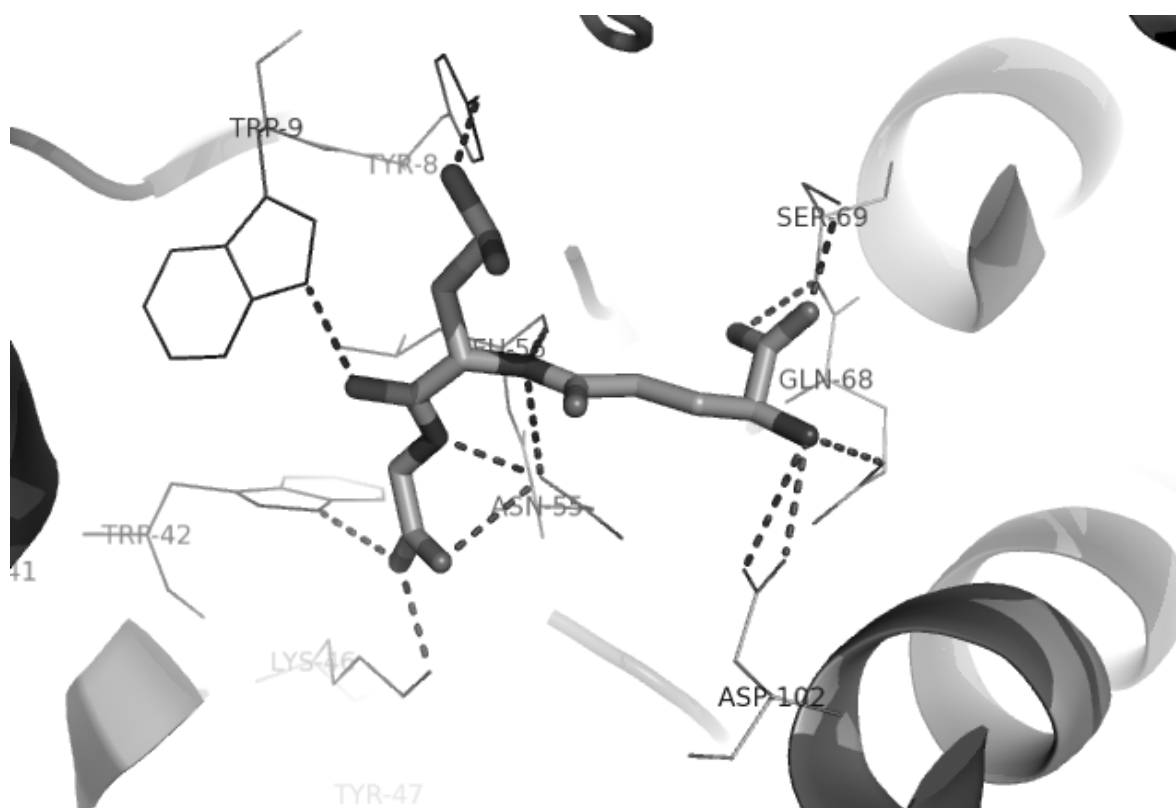


Figura 11. Representación del sitio G. Contactos polares del GSH (oxidado como ácido sulfínico) con las cadenas laterales de diversos residuos de la recTs26GST.

A pesar de lo observado en la estructura global, los contactos polares que utiliza la recTs26GST para unir y activar el GSH en el sitio G, con escasa diferencia, son los mismos que usan las clases mu de mamíferos en posiciones equivalentes. Como se aprecia en la figura 11, para la recTs26GST los contactos de unión se hacen con el Trp9, Tyr8 (para la activación del GSH que en este caso está oxidado en su forma sulfínica), Trp42, Lys46, Asn55, Leu56 (C=O), Gln68, Ser69 y Asp102; sólo falta el contacto correspondiente a la Arg42 del lazo mu en las clases de mamíferos, pero como se mencionó anteriormente la recTs26GST no tiene tal lazo y no presenta esta interacción (Dirr et al, 1994; Wilce & Parker, 1994).

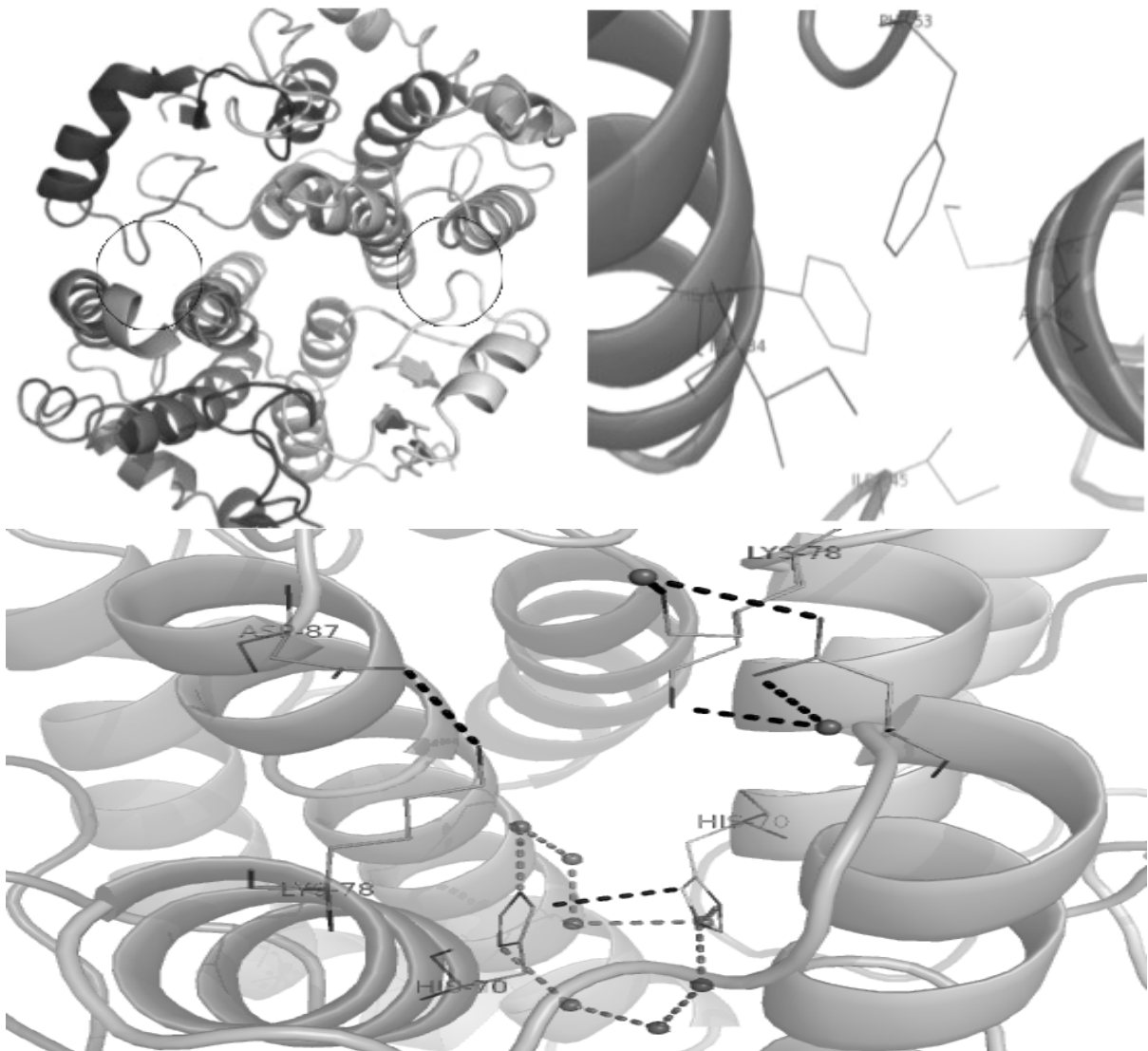


Figura 12. Interacciones hidrofóbicas y electrostáticas en la interfase de la recTs26GST. En el panel superior se muestra la interacción hidrofóbica tipo "ball-socket" y los aminoácidos involucrados. En la parte inferior se aprecian los aminoácidos que componen las interacciones electrostáticas más la interacción de las H70 de ambas subunidades.

Otras interacciones que caracterizan a las distintas clases de GSTs son las que se encuentran entre las interfases, que para las clases mu/alpha/pi se dan de dos tipos: la hidrofóbica tipo “ball-socket” y la electrostática. La primera variedad distingue a estas clases del resto, mientras que el tipo de aminoácidos que hacen los contactos las identifica entre sí. Para la recTs26GST se aprecia la existencia de la interacción hidrofóbica “ball-socket” en donde intervienen los aminoácidos Phe53, Met92, Ala96, Phe137, Ile134, estas interacciones son semejantes a las que presentan la clase alpha (Sheehan et al, 2001; Stenberg et al, 2000; Vargo et al, 2004).

Por otro lado, los aminoácidos de la recTs26GST que realizan las interacciones electrostáticas son la Lys78 y el Asp87, la lisina está en lugar de la arginina que suele encontrarse en las clases alpha/mu/pi. Adicionalmente y cercana a las interacciones electrostáticas se encuentran las His70 de ambos monómeros que hacen contacto de manera directa y también a través de moléculas de agua.

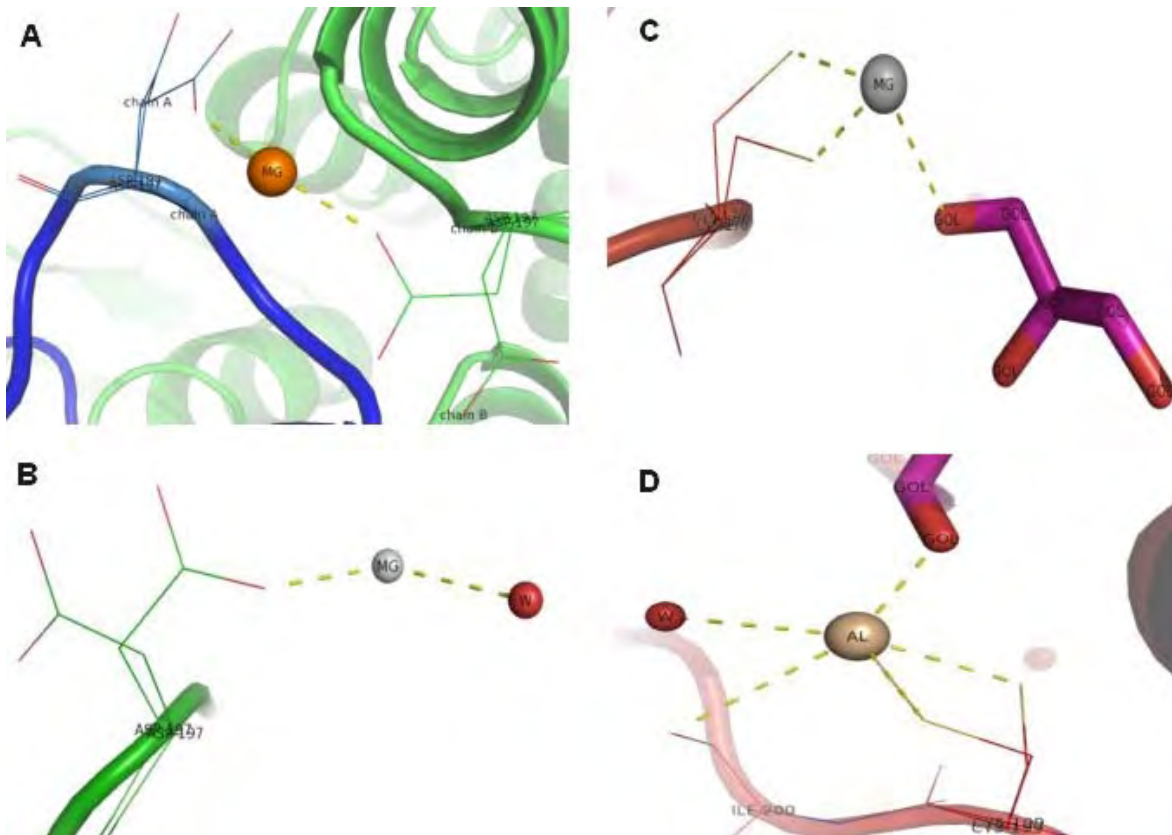


Figura 13. Interacciones propuestas para la recTs26GST con iones metálicos. En el panel A, se observa la coordinación entre un átomo de Mg con el D197 del monómero A y el D197 de la subunidad B de simetría, mientras que, en el panel B se muestra la coordinación entre el mismo átomo de Mg con el D197 del monómero A y un agua. En el panel C se observa la C170 de B que coordina, junto con un glicerol, a un átomo de Mg (II). El panel D muestra a la C199 de B junto con el carboxilo de la Ile200, una molécula de glicerol y una de agua coordinando a un átomo de Al (III). Estas son algunas de las interacciones propuestas para las densidades observadas en las cisteínas expuestas y para el ácido aspártico 197 (ver texto).

Aparte de lo indicado anteriormente, dentro de la estructura se encontró que 4 de las 6 cisteínas que tiene este homodímero (tres por monómero) se encuentran expuestas al solvente y coordinando un ión metálico proveniente de las impurezas del GSH usado en la purificación. Estos podrían corresponder a átomos de Mg (II) y Al (III) unidos a las Cys170 y a las Cys199. Completan la coordinación de éstos metales algunas moléculas de agua, glicerol u otros átomos en la cadena principal como son los oxígenos del carboxilo de las isoleucinas en posición 200 de ambos monómeros. La distancia promedio de los enlaces es de 2.4 ± 0.3 Å, lo cual va acorde a las distancias de coordinación en solución esperadas para estos metales (Rezabal et al, 2006).

Adicionalmente un átomo de Mg (II) se coordina con el Asp197 de una subunidad A y con una molécula de agua, pero es capaz de coordinarse también con el Asp197 de la subunidad B perteneciente a la estructura de simetría de la enzima, tal y como se aprecia en la figura 13, con una distancia promedio de coordinación de 2.2 ± 0.2 Å.

Clasificación.

Como se mencionó anteriormente, el criterio considerado para designarle una clase a una GST abarca las comparaciones de su estructura primaria, su estructura génica, sus propiedades cinéticas, su especificidad a ciertos sustratos y su sensibilidad con algunos inhibidores, relación inmunológica mediante reconocimiento antigénico, su estructura terciaria y cuaternaria y la identificación de las interacciones en los sitios activos y en las interfases. Considerando todo lo anterior, menos la estructura génica, así como los resultados observados para la recTs26GST, es posible notar que no puede ser asignada a ninguna de las clases citosólicas de GST descritas con anterioridad.

Inhibición de la recTs26GST usando antihelmínticos.

Con la intención de encontrar moléculas que puedan servir como inhibidores, se realizaron los ensayos correspondientes usando 4 diferentes antihelmínticos, dos de ellos muy utilizados para el tratamiento de la cisticercosis humana: el prazicuantel y el albendazol. El tiabendazol y el mebendazol, al igual que el albendazol, pertenecen a la familia de los bencimidazoles y son usados para tratar diversas parasitosis (Geerts y Gryseels, 2000; Dayan, 2003). Los resultados de los primeros ensayos para conocer la actividad inhibitoria de estos antihelmínticos, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Inhibición por antihelmínticos

Inhibidor	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{minmg}$)	Ki (μM)
CNDB (sustrato) 1mM	12.69	----
Albendazol (500 μM)	10.42	ND
Prazicuantel (500 μM)	12.97	ND
Tiabendazol (500 μM)	11.46	ND
Mebendazol (500 μM)	7.1	65

ND: No Determinada

Debido a que a altas concentraciones, sólo el MBZ mostró una reducción significativa en la actividad de la enzima, fue con este antihelmíntico que se realizaron las determinaciones del patrón de inhibición y obtención de la K_i .

Patrón de inhibición del Mebendazol.

El valor de K_i para el MBZ se obtuvo con el gráfico de Dixon construido con datos de tres series de ensayos donde la concentración del mebendazol se varió y el CNDB se usó como sustrato fijo variable. En el gráfico de la figura 14 se aprecia que el patrón de inhibición que describe el MBZ es de tipo no competitivo. Al regraficar las pendientes de cada recta, que representa una serie hecha contra la concentración de inhibidor, obtenemos un gráfico parabólico que nos indica que la inhibición del MBZ sobre la recTs26GST es total y sugiere que al menos dos moléculas del inhibidor se pegan a la enzima.

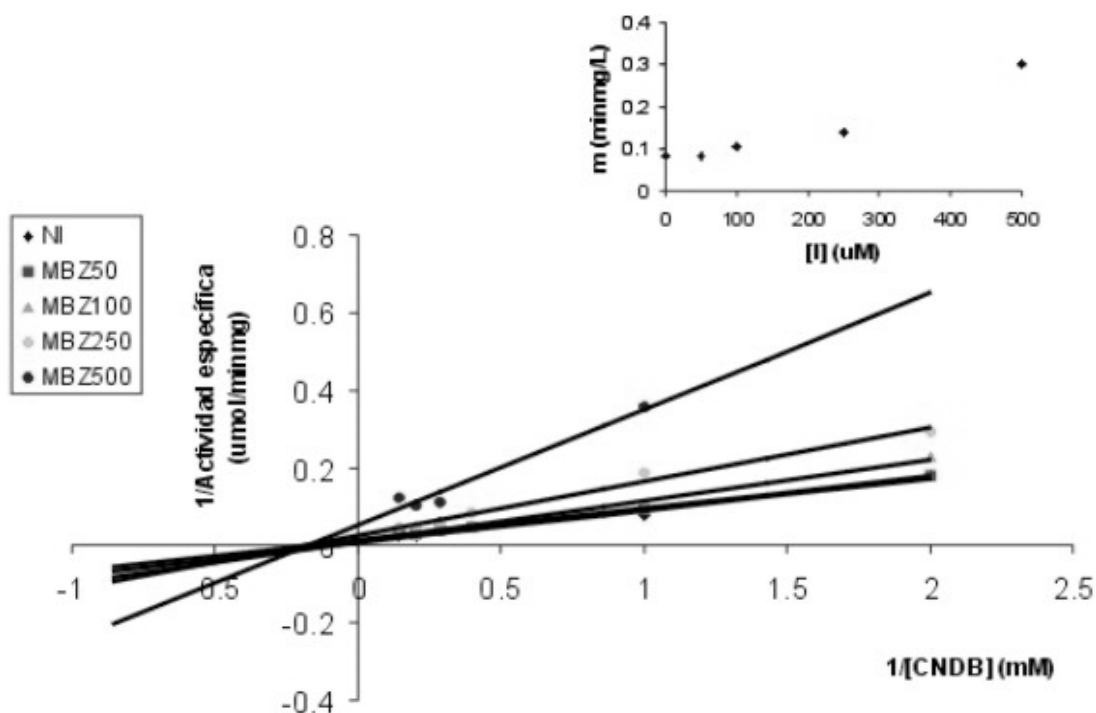


Figura 14. Patrón de inhibición del MBZ sobre la recTs26GST. El gráfico de dobles recíprocos muestra un patrón no competitivo del MBZ en la actividad de la recTs26GST: \blacklozenge NI (sin inhibidor), \blacksquare MBZ50 (50 μ M mebendazol), \blacktriangle MBZ100 (100 μ M mebendazol), \bullet MBZ250 (250 μ M mebendazol) y \bullet MBZ500 (500 μ M mebendazol).

Discusión

El análisis de la estructura primaria de la recTs26GST mostró que la enzima posee una mayor identidad con las secuencias de las GSTs clase mu, aunque carecía del lazo mu característico de dicha clase. Al mismo tiempo, entre los últimos residuos del C-terminal se encontraron 11 aminoácidos que podrían formar una hélice extra como ocurre en las GSTs clase alpha (Torres-Rivera & Landa, 2008b). Con este antecedente, más la caracterización de la recTs26GST mediante la identificación de su actividad con diferentes sustratos, donde se observó su preferencia a los marcadores de la clase alpha, así como en los ensayos con los inhibidores marcadores de clase, en donde fue más sensible a los marcadores mu, y la determinación de sus parámetros cinéticos, con valores cercanos a lo observado para las clases alpha, se reforzó la sospecha de su carácter bimodal, así como la imposibilidad de ser definida en sólo una de estas clases.

Con la finalidad de tener un resultado que permitiera definir la clase para la recTs26GST, sumando los resultados obtenidos con anterioridad, se recurrió al reconocimiento antigénico por parte de anticuerpos específicos para las clases mu, alpha y pi. Sin embargo, como se muestra en los resultados, no hubo reconocimiento de los anticuerpos anti-alpha, ni de los anti-mu y los anti-pi sobre la enzima, ni tampoco de los anticuerpos anti-recTs26GST contra las GSTs alpha, mu y pi de humano. Este resultado volvía a dejar indefinida la clase de la enzima, pero por otro lado abrió la posibilidad de diferencias estructurales importantes entre la recTs26GST con las GSTs de su hospedero, lo cual es conveniente para etapas futuras de investigación en el desarrollo de inhibidores específicos.

Este comportamiento polimodal ya ha sido observado también para otros parásitos como *Moensia expansa*, *Plasmodium falciparum* y *Heligmosomoides polygyrus*, por mencionar algunos, en los cuales la clasificación por estos medios tampoco ha sido posible o han generado una nueva clase que explique las características que la definen (Brophy et al, 1989; Brophy et al, 1994b; Deponte & Becker, 2005; Liebau et al, 2002; Schuller et al, 2005).

La parte de la caracterización estructural de la recTs26GST mediante la generación del modelo tridimensional de la enzima aportó pruebas contundentes sobre la naturaleza múltiple de la enzima y sobre como podría ser clasificada. En primer término tenemos que la estructura global de la recTs26GST tiene una arquitectura muy similar a la que presentan las clases pi, tal y como se aprecia en la figura 10, donde no existen ni lazo-mu ni hélice-9 que expliquen la hibridización en actividades catalíticas que presenta la recTs26GST. A pesar de esta semejanza topológica con la clase pi, el alineamiento de los esqueletos de carbono alpha de la recTs26GST con GSTs de la clase pi, mu, alpha de mamíferos y de varios parásitos indican que son estructuras lejanas al reportar un r.m.s entre 1.8 a 2.2 Å, aproximadamente. Para algunos autores la distancia de los C α entre las GSTs de mamíferos y de parásitos es justificable por el bajo nivel de identidad entre las secuencias de aminoácidos que suele existir entre éstas GSTs, por lo tanto, las estructuras parasitarias con estos r.m.s., no deberían considerarse de diferente clase. Un ejemplo de lo anterior podría representarlo la diferencia entre la GST P1 de humano y la

GST de *Onchocerca volvulus* (Perbandt et al, 2005) con un r.m.s. de 1.5 Å. Sin embargo, otros estudios muestran que entre miembros de la misma clase el valor del r.m.s. global no debe exceder los 0.9 Å y que la desviación entre los carbonos alpha reportados para el alineamiento de las estructuras entre las clases mu-pi, alpha-mu, y pi-alpha va de los 1.5 a los 2 Å (Wilce & Parker, 1994; Rossjohn et al, 1997). Este aporte demuestra que la recTs26GST no estaría relacionada con las clases alpha, mu y pi de mamífero, así como otras clases en parásitos como la nu (ver tabla 7).

En segunda instancia se buscaron las interacciones de unión del GSH, que son diferentes entre las clases alpha, mu y pi a pesar de que las tres clases usan una tirosina del N-terminal (8 para las alpha, 6 para las mu y 7 para las pi) para hacer la activación de este sustrato. El análisis de la recTs26GST demostró que las interacciones usadas para unir el GSH son con los residuos Tyr 8, Trp9, Trp42, Lys46, Asn55, Leu56, Gln68, Ser69, y la Asp 102 del sitio H de la otra subunidad, que son casi los mismos que usan las GSTs de la clase mu (Dirr et al, 1994; Wilce & Parker, 1994), con excepción de una Arg en la posición 42 que se encuentra ausente debido a la carencia que lazo mu que presenta esta GST parasitaria.

Como otro elemento de identificación se encuentran las interacciones hidrofóbicas en la interfase, que si llegan a ser de tipo "ball-socket", permiten distinguir entre las diversas variedades de GSTs a las clases alpha, mu y pi, que son las únicas que poseen este tipo de interacción. Además los aminoácidos que rodean la Phe del giro-β del N-terminal (Phe 47 ó 50 pi; Phe 52 ó 55 alpha; Phe 56 ó 60 mu) son diferentes entre estas clases (Hearne & Colman, 2006; Stenberg et al, 2000; Vargo et al, 2004). La recTs26GST posee la interacción tipo "ball-socket" usando los residuos Phe53, Met92, Ala96, Phe137 e Ile134 equivalentes a los residuos Phe 52, Met 94, Gly96, Phe 136 y Val139 que usan las GSTs clase alpha.

Otras interacciones importantes en la interfase para la dimerización en las clases alpha, mu y pi, pero no tan específicas, son las de tipo electrostático. En este tipo de interacciones participa el grupo guanidino de una Arg en la hélice 3 (Arg 69 alpha; Arg 70 pi; Arg 77 mu) con la cadena lateral de un Asp en la hélice 4 (Asp 92 o Glu97 alpha; Asp 90 pi; Asp 97 mu). Sin embargo, en la recTs26GST la interacción electrostática se da entre la Lys78 con el Asp87 de manera directa o con la participación de una molécula de agua (Dirr et al, 1994; Hearne & Colman, 2006; Vargo et al, 2004). Adicionalmente en la interfase de la recTs26GST y cercana a esta unión electrostática, se encontró una interacción entre los anillos de las His70 de ambas subunidades, tanto de manera directa como a través de moléculas de agua. Sería interesante verificar si dicha interacción, que parece ser específica para la recTs26GST, tiene la misma relevancia sobre la interfase como es el caso de las fenilalaninas de la interacción hidrofóbica, o los residuos que participan en la formación de los puentes salinos de la interacción electrostática y que inciden en el equilibrio monómero-dímero y sobre la función catalítica (Hearne & Colman, 2006; Sayed et al, 2000; Vargo et al, 2004).

De manera complementaria a lo analizado en la estructura de la recTs26GST se confrontaron las posiciones de los 26 aminoácidos invariantes reportados para las clases alpha, mu y pi (Dirr et al, 1994) con las posiciones de los mismos residuos en la recTs26GST, encontrándose que de los 26 residuos 14 coincidían con lo reportado para

la clase alpha, 2 para la pi y 9 para la mu, entre ellos la *cis*-Pro203 de la recTs26GST que es equivalente a la *cis*-Pro206 de las clases mu (ver anexo 1). Al agrupar todos estos resultados podemos asegurar que la Ts26GST no puede ser considerada como una GST de clase mu, pi ó alpha, sino que nos encontramos ante una nueva clase que hemos denominado arbitrariamente **ypsilon**.

Un hecho a resaltar de los primeros resultados, y que no está relacionado con la identificación de clase para la recTs26GST, es la cinética no-hiperbólica que manifestó la enzima en los ensayos de actividad como resultado de un comportamiento de cooperatividad positiva que por pruebas a 25 y 37°C, así como por los ensayos de fluorescencia, nos permite afirmar que no se trata de artificios del ensayo (Figuras 6, 7 y 8). Al mismo tiempo, los ensayos de fluorescencia nos permitieron demostrar que la cooperatividad para el sustrato CDNB es influenciada notablemente por la presencia del GSH. Este suceso podría explicarse mediante la alostería delimitada por los confórmeros “correctos” de un ensamble de confórmeros, es decir, la unión del GSH a la recTs26GST generaría interacciones que estabilizarían un número determinado de conformaciones, éstas favorecerían la unión del CDNB. El proceso puede darse de igual forma a la inversa cuando la unión del CDNB establezca confórmeros que facilitarían la unión del GSH. En otros estudios se ha descrito que este tipo de alostería tiene efecto sobre la catálisis de la enzima; como sucede con la dehidrofolato reductasa o la alcohol deshidrogenasa (Freire 1999; Pan et al, 2000).

A pesar de la existencia de otras GSTs en mamíferos con un comportamiento similar a la recTs26GST, y para las cuales la explicación del fenómeno se basa en la comunicación intersubunidades con el fin de preservar la actividad de la enzima ante la presencia de inhibidores (Ricci et al, 2003), posteriores estudios cristalográficos y de dinámica molecular encontraron que el ligando sí induce cambios conformacionales en estas enzimas, lo cual está más relacionado a lo descrito para la recTs26GST (McCallum et al, 2000; Torres-Rivera & Landa, 2008b; Zhan & Rule, 2004).

La importancia de un fenómeno de cooperatividad positiva para esta enzima en el contexto del parásito podría ser la de modular su actividad de acuerdo a la concentración de xenobióticos que haya en el ambiente, lo cual le permitiría al parásito adaptarse a los cambios en el nivel de toxicidad ambiental mediante el procesamiento eficiente de estos sustratos por parte de la Ts26GST.

Este enfoque es remarcado por otro aspecto interesante en el análisis de la estructura de la enzima y que es la coordinación de metales como Mg(II) y Al(III) mediante las Cys170 y Cys199 de ambos monómeros. Otras estructuras de diversas GSTs, encontradas en el PDB, también presentan unión de metales, pero tales interacciones parecen inespecíficas, ya que se encuentran en un solo monómero, o bien, coordinándose con aminoácidos distintos cuando hay más de un átomo metálico en la molécula. Esta capacidad de las GSTs para unir metales pesados como cadmio, plomo, zinc, cobre, vanadio, entre otros, ha sido mostrado en algunos estudios con diversos efectos sobre la actividad de tales enzimas, ya que dependiendo del tiempo de exposición, o si la acción se ejerce por un metal o por un combinado de iones metálicos, puede haber un incremento de la actividad de las GSTs (Casalino et al, 2004; Iscan et al, 1995; Yoshinaga et al, 2007; Wiergosz-Kowalewska et al, 2006).

Este es un aspecto importante desde el punto de vista de adaptación, donde se ha comprobado que la resistencia a la contaminación por metales que presentan algunos organismos se debe al sistema glutatión-glutatión transferasa, donde la enzima juega un rol activo en la homeostasis y desintoxicación de metales (Casalino et al, 2004; Iscan et al, 1995; Yoshinaga et al, 2007; Wiergosz-Kowalewska et al, 2006). Si se aplica esta perspectiva en el contexto, se reafirma el beneficio que le proporcionaría la Ts26GST al parásito cuando existen cambios en el ambiente tisular de su hospedero ante la presencia de metales y las moléculas tóxicas generadas por su presencia.

Sin embargo, la determinación de la estructura tridimensional no sólo obedecía a la clasificación de la Ts26GST, sino a la posibilidad de encontrar sitios blanco que en futuras investigaciones sirvan para el diseño racional de inhibidores específicos, ya que se ha demostrado en estudios anteriores que las GSTs parasitarias son blancos viables para este fin (Brophy & Pritchard, 1994a; Capron et al, 2005; Jao et al, 2006; McTigue et al, 1995; Nathan et al, 2005). Una opción para tal desarrollo proviene de los ensayos de inhibición con mebendazol, el cual podría ser tomado como molécula molde una vez que se conozca el lugar donde se une a la enzima, sobre todo si se considera que la inhibición por MBZ también se ha presentado en *Echinococcus granulosus*, otro cestodo (Feng et al, 1995).

Por todo lo expuesto, este estudio plantea nuevos aspectos a desarrollar como la identificación, síntesis y análisis de inhibidores que generarían fármacos antihelmínticos; estudios de asociación de esta proteína con otras del citosol del parásito para la descripción de nuevas funciones distintas a la desintoxicación; estudio de la dinámica de esta molécula sin los ligandos, con ambos ligandos o con un inhibidor, entre tantas otras posibilidades que podrán ser estudiadas y comprendidas gracias a la información bioquímica y estructural.

Conclusiones

- Disponer de la recTs26GST permitió definir su mecanismo de catálisis, su comportamiento bioquímico, la resolución de su estructura y la identificación de su clase.
- La recTs26GST es el primer miembro de la nueva clase **ypsilon**, que guarda relación cercana con las clases alpha/ mu/ pi.
- El mecanismo de conjugación de la recTs26GST se da por cooperatividad positiva y esta influenciado por la presencia de GSH.
- La enzima está capacitada para actuar sobre productos del estrés así como también sobre algunos xenobióticos.
- La recTs26GST, mediante las Cys170 y Cys199, tiene interacciones específicas con metales, como aluminio y magnesio, lo que podría tener implicaciones en la desintoxicación.
- El mebendazol mostró tener actividad inhibitoria sobre la recTs26GST con una $K_i = 65 \mu\text{M}$, por lo que podría ser considerado como molécula molde para la generación de inhibidores específicos en contra de la misma.
- El estudio de la recTs26GST muestra que ésta posee diferencias significativas respecto a las GST humanas, por lo que el diseño de inhibidores específicos contra la enzima es posible.

Aminoácidos invariantes en las estructuras de las GSTs citosólicas.

Residuos				Posible función, ambiente, efectos en la mutación*
pi	mu	alpha	recTs26GST	
Y7	6	8	8	Desprotona el GSH y estabiliza el anión tiolato; se localiza en el sitio activo y su reemplazo inhibe casi por completo la actividad enzimática pero no afecta la unión del GSH.
R11	10	12	12	Las interacciones con el dominio H estabiliza el lazo del sitio activo; su reemplazo disminuye la función catalítica e incrementa la sensibilidad a inhibidores.
G12	11	13	13	Mantiene una conformación funcional en la cadena principal del lazo del sitio activo.
R18	17	19	19	Se encuentra en $\alpha 1$ y su cadena lateral forma un puente salino con E30(pi)/29(mu)/31(alpha); su reemplazo reduce la estabilidad de la proteína y su actividad de conjugación.
L20	19	21	20	Miembro del núcleo hidrofóbico del dominio G, se encuentra en $\alpha 1$.
L21	20	22	22	Parte de la interfase; se localiza en $\alpha 1$.
E30	29	31	30	En la $\beta 2$, forma un puente salino con la R18(pi)/17(mu)/19(alpha)
F47	56	51	53	Parte de la interfase, su cadena lateral es anclada entre las $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de la subunidad vecina del dímero; se localiza en un giro.
P51	60	55	53	Precede a la $\beta 3$, tiene una configuración <i>cis</i> que permite mantener en una conformación funcional al sitio activo.
Q62	71	66	68	Localizado en un giro entre la $\beta 4$ y la $\alpha 3$ del sitio activo, la cadena lateral interactúa con el GSH anclándolo; tiene ángulos de torsión anormales; su reemplazo reduce la actividad y estabilidad de la enzima y su afinidad por el GSH.
I66	75	70	72	Localizado en $\alpha 3$ y debajo del sitio G en el núcleo del N-terminal; su reemplazo por Y rompe el núcleo e inactiva la enzima.
L76	85	80	82	Segmento conector entre $\alpha 3$ y $\alpha 4$ y se localiza en la hendidura hidrofóbica en la interfase.
G78	87	82	84	Segmento conector entre $\alpha 3$ y $\alpha 4$, cerca del N-terminal de $\alpha 4$.
E83	92	87	D89	Localizado en $\alpha 4$, su cadena lateral hace puente de hidrógeno con el nitrógeno de la amina de algún residuo.
D88	97	92	---	En $\alpha 4$, su cadena lateral da a la interfase y forma puentes de hidrógeno con R o Y; su reemplazo con E o N disminuye su actividad catalítica.
D96	105	100	102	En $\alpha 4$, su cadena lateral da hacia el sitio G donde interactúa en la unión del GSH; su reemplazo con L o A reduce la actividad de la enzima y su afinidad por el GSH.
L104	110	108	I107	Localizado en $\alpha 4$, participa en el plegamiento de las $\alpha 4$ y $\alpha 5$.
L131	141	139	143	Localizado en el C-terminal de $\alpha 5$, es parte del núcleo hidrofóbico formado por $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$; genera interacciones de van der Waals con la L174(pi)/180(mu)/180(alpha).
G143	149	149	151	Localizado en un giro entre $\alpha 5$ y $\alpha 6$.
D150	156	156	158	En $\alpha 6$, su cadena lateral se encuentra en una hendidura hidrofóbica donde hace puentes de hidrógeno con la S153(alpha)/147(pi)/Thr153(mu) y con los nitrógenos de la L147(alpha)/Val141(pi)/F147(mu); su reemplazo con Ala reduce la termoestabilidad de la enzima.
L157	163	163	159	Miembro del núcleo hidrofóbico entre $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$; agrupado con la L31,F171 y L174(pi) (con residuos equivalentes para las clases mu y alpha)
F171	177	177	174	Ver L157.
P172	178	178	175	Localizado en el N-terminal $\alpha 7$.
L174	180	180	177	Ver L131 y L157.
R180	186	186	E183	Localizado en $\alpha 7$; forma puentes de hidrógeno con los oxígenos del carboxilo de A139, G137, Q138(pi); D145(alpha), P145(mu); su reemplazo aumenta la sensibilidad de la enzima hacia los inhibidores.
P200	206	206	203	Localizado en el C-terminal del polipéptido; vuelta <i>cis</i> -Pro (mu)

* Tomado de Durr et al, 1994

Abreviaturas y simbología

Å	Angstrom
ABZ	Albendazol
Ab	Anticuerpo
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
B	Factor isotrópico de temperatura
BSF	Bromosuftaleína
°C	Grados centigrados
CB	Azul de cibacrón
CHP	Hidroperóxido de cumeno
CTF	Cloruro de trifelnitín
CNDB	1-Cloro-2,4 dinitrobenceno
DCNB	1,2-Dicloro-4 nitrobenceno
EPNP	1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propano
ETA	Ácido Etacrínico
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa ó tiempo de gravitación
GSH	Glutati3n (reducido)
GST	Glutati3n transferasa
<i>h</i>	Número de Hill
IPTG	Isopropil-β-d-tiogalactopiranosido
kcat	Constante catalítica
kcat/ K_M	Eficiencia catalítica
K_i	Constante de inhibici3n
K_M	Constante de Michaelis
LB	Medio Luria-Bertani
mL	Mililitro
uL ó μL	Microlitro
mM	Milimolar
uM ó μM	Micromolar
MBZ	Mebendazol
OD	Densidad óptica
PQZ	Prazicuantel
Rfactor	Error entre las fases observadas y las calculadas
Rfree	Validaci3n cruzada del Rfactor
Rmerge	Medici3n del valor de las intensidades en reflexiones equivalentes
RS	Especies reactivas
RT-PCR	Reacci3n en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
TBZ	Tiabendazol
Ts26GST	GST de 26 kDa de <i>Taenia solium</i>
recTs26GST	GST de 26 kDa de <i>T. solium</i> recombinante
Vmax	Velocidad máxíma

Bibliografía:

Alin, P., Danielson, U.H., Mannervik, B. 1985. 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. FEBS Lett., 179, 267-70.

Aluja, A.S., Villalobos, N. M., Nava, G., Toledo, A., Martínez, J.J., Plancarte, A., Rodarte, L.F., Fragoso, G., Sciutto, E.; 2005. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. Vaccine, 23, 4062-4069.

Armstrong R.N.; 1994. Glutathione S-transferases: Structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. Adv. Enzymol., 69, 1-44.

Armstrong R.N.; 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the Glutathione S-transferases. Chem. Res. Toxicol., 10, 2-18.

Barrett, J.; 1998. Cytochrome P450 in parasitic protozoa and helminths. Comp. Biochem. Physiol. Part C, 121, 181-183.

Bennett, J.L., Day, T., Feng-Tao, L., Ismail, M., Farghaly, A.; 1997. The Development of resistance to anthelmintics: A perspective with an emphasis on the antischistosomal drug Praziquantel. Exp. Parasitol., 87, 260-267.

Board, P.G., Coggan, M., Watson, S., Gage, P.W., Dulhunty, A.F.; 2004. CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptorCa²⁺ release channels. Int. J. Biochem. & Cell Biol., 36, 1599-1612.

Brophy, P. M., Southan, C., Barrett, J.; 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. Biochem. J., 262, 939-946.

Brophy, P. M., Barrett, J.; 1990. Glutathione transferases in helminths. Parasitology, 100, 345-349.

Brophy, P. M., Pritchard, D.I.; 1994a. Parasitic helminth glutathione S-transferase: An update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. Exp. Parasitol., 79, 89-99.

Brophy, P. M., Ben-Smith, A., Brown, A., Behnke, J.M., Pritchard, D.I.; 1994b. Glutathione S-transferase from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. Comp. Biochem. Physiol., 109, 585-592.

Capron, A., Riveau, G., Capron, M., Trottein, F.; 2005. Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. Trends Parasitol., 21, 143-149.

Carlos, E., de Balogh, K., Lubroth, J., Amanfu, W., Speedy, A., Battaglia, D., Domenech J.; 2006. Veterinary public health activities at FAO: Cysticercosis and echinococcosis. Parasitol. Int., 55, 305-308.

- Carpio A.; 2002. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect. Dis.*, 2, 751-762.
- Casalino E., Sblano C., Landriscina V., Calzaretti G., Landriscina C.; 2004. Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology*, 200, 29-38.
- Cheng, J.W., Dodia, C., Feinstein S.I., Jain M.K., Fisher, A.B.; 2000. 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *J. Biol. Chem.*, 275, 28421-28427.
- 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. *J. Biol. Chem.*, 276, 12749-12755.
- Clark, A.; 1989. The comparative enzymology of the Glutathione S-transferase from non-vertebrate organism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92, 419-446.
- Collinson, E.J., Grant, C.M. 2003. Role of yeast glutaredoxins as Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, 278, 22492-22497.
- Dayan, A.D.; 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86, 141-159.
- Deponte, M., Becker, K.; 2005. Glutathione S-transferase from malarial parasites: Structural and functional aspects. *Met. Enzymol.*, 401, 241-253.
- Dickinson D.A., Forman H.J.; 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharm.*, 64, 1019-1026.
- Dirr H., Reinemer P., Huber R.; 1994. X-ray cristal structures of cytosolic glutathione S-transferases: Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.*, 220, 645-661.
- Docampo R. Antioxidant Mechanisms: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Marr J., Muller M., Academic Press, San Diego, 1995.
- Eaton, D.L., Bammler, T.K.; 1999. Concise review of the Glutathione S-Transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sciences*, 49, 156-164.
- Feng, J.J., Guo, F.H., Yao, M.Y., Xiao, S.H.; 1995. Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on glutathione S-transferase and superoxide dismutase of *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 16, 297-300.
- Freire, E.; 1999. The propagation of binding interactions to remote sites in proteins: Analysis of the binding of the monoclonal antibody D1.3 to lysozyme. *PNAS*, 96, 10118-10122.

Frova, C.; 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Engineering*, 23, 149-169.

García H.H., Gonzalez A.E., Evans C.A., Gilman R.H.; 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*, 362, 547-556.

Geerts, S., Gryseels, B.; 2000. Drug resistance in human helminths: Current situation and lessons from livestock. *Clinical Microbiology reviews*, 13, 207-222.

Gonzalez, A.E., Gavidia, C., Falcon, N.; 2001. Protection of pigs with cysticercosis from further infections after treatment with oxfendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 15-18.

Habig, W.H., Jacoby, W.B.; 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology*, 77, 398-405.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Idem, 4a, Oxford University Press, USA, 2007.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51-88.

Hearne J.L., Colman R.F.; 2006. Catalytically active monomer of class Mu glutathione transferase from rat. *Biochem.*, 45, 5974-5984.

Herve, M. 2003. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur. J. Immunol.*, 33, 2764-2772.

Hoberg E.P.; 2002. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes & Infection*, 4, 859-866.

Iscan M., Coban T., Eke B.C., Iscan M.; 1995. Differential responses of hepatic monooxygenases and glutathione S-transferases of mice to a combination of cadmium and nickel. *Camp. Biochum. Physiol.*, 3, 61-68.

Jakobson, I., Askelof, P., Warholm, M., Mannervik, B. 1977. A steady-state-kinetic random mechanism for Glutathione S-transferase A from rat liver. A model involving kinetically significant enzyme-product complexes in the forward reaction. *Eur. J. Biochem.*, 77, 253-262.

Jakobsson, P.J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., Persson, B.; 1999. Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.*, 8, 689-692.

Jao, S.C., Chen, J., Yang, K., Li, W.S.; 2006. Design of potent inhibitors for *Schistosoma japonica* glutathione S-transferase. *Bioorg Med Chem.*, 14, 304-318.

Ketterer, B.; 1986. Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, 16, 957-973.

Konishia, T., Katoc, K., Arakia, T., Shirakid, K., Takagib, M., Tamaru, Y.; 2005. Molecular cloning and characterization of α -class glutathione S-transferase genes from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. Comp. Biochem. and Physiol., Part C, 309-320.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

Lawrence, R.A., Burk R.F.; 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 71, 952-958.

Lee, Y., Seo, J., Jung, S., Kim, I. Lee, J.; 2006. Molecular cloning and characterization of θ -class glutathione S-transferase (GST-T) from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus* and biochemical comparisons with α -class glutathione S transferase (GST-A). Biochemical and Biophysical Research Communications, 346, 1053-1061.

Liebau, E., Bergmann, B., Campbell, A.M., Teesdale-Spittle, 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., De Maria, F., Burmeister, C., Perbandt, M., Turella, P., Antonini, G., Federici, G., Giansanti, F., Stella, L., Lo Bello, M., Caccuri, A.M., Ricci G.; 2005. Cooperativity and Pseudo-cooperativity in the Glutathione S-Transferase from *Plasmodium falciparum*. J. Biol. Chem., 280, 26121-26128.

Lightowers M.W.; 2003. Vaccines for prevention of cysticercosis. Acta Tropica, 87, 129-135.

Mannervik B.; 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. Adv. Enzymol., 57, 357-417.

McCallum S.A., Hitchens T.K., Torborg C., Rule G.S.; 2000. Ligand-induced changes in the structure and dynamics of a human class Mu Glutathione S-transferase. Biochem., 39, 7343-7356.

McTigue, M., Williams, D.R., Tainer, J.A.; 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. J. Mol. Biol., 246, 21-27.

Montresor, A., Palmer, K.; 2006. Taeniasis/cysticercosis trend worldwide and rationale for control. Parasitol. Int., 55, 301-303.

Nathan, S.T., Mathew, N., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K. 2005. Structure of glutathione S-transferase of the filarial parasite *Wuchereria bancrofti*: a target for drug development against adult worm. J. Mol. Model., 11, 194-199.

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T.; 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Protein Sci., 4, 2411-2423.

Pan, H., Lee, J.C., Hilser, V.J.; 2000. Binding sites in *Escherichia coli* dihydrofolate reductase communicate by modulating the conformational ensemble. PNAS, 97, 12020-12025.

Pawlowski Z., Allan J., Sarti E.; 2005. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. Int. J. Parasitol., 35, 1221-1232.

Plancarte, A., Rendon, J.L., Landa, A.; 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. Parasitol. Res., 93, 137-144.

Perbandt, M., Höppner, J., Betzel, C., Walter, R.D., Liebau, E.; 2005. Structure of the major cytosolic Glutathione S-Transferase from the parasitic nematode *Onchocerca volvulus*. J. Biol. Chem., 280, 12630-12636.

Precious, W., Barret, J.; 1989. The possible absence of cytochrome P-450 linked xenobiotic metabolism in helminths. Biochem. et Biophys. Acta, 992, 215-222.

Rezabal E., Mercero J.M., Lopez X., Ugalde J.M.; 2006. A study of the coordination shell of aluminum(III) and magnesium(II) in model protein environments: Thermodynamics of the complex formation and metal exchange reactions. J. Inorg. Biochem., 100, 374-384.

Ricci, G., Caccuri, A.M., Lo Bello, M., Parker, M.W., Nuccetelli, M., Turella, P., Stella, L., Di Iorio, E.E., Federici, G., 2003. Glutathione transferase P1-1: Self-preservation of an anti-cancer enzyme. Biolchem. J., 376, 71-76.

Ricci, G., Turella, P., De Maria, F., Antonini, G., Nardocci, L., Board, P.G., Parker, M.W., Carbonelli, M.G., Federici, G., Caccuria, A.M. 2004. Binding and kinetic mechanisms of the Zeta class Glutathione transferase. J. Biol. Chem., 279, 33336-33342.

Rossjohn, J., Feil, S.C., Wilce, M.C.J., Sexton, J.L., Spithill, T.W., Parker, M.W.; 1997. Crystallization, structural determination and analysis of a novel parasite vaccine candidate: *Fasciola hepatica* Glutathione S-transferase. J. Mol. Biol. , 273, 857-872.

Samiec P.S., Dahm L.J., Jones D.P.; 2000. Glutathione S-Transferase in Mucus of Rat Small Intestine. Toxicol. Sciences, 54, 52-59.

Sarti, E., Flisser, A., Schantz, P.M.; 1997. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg., 56, 127-32.

Sarti, E., Schantz, P.M., Avila, G., Ambrosio, J., Medina-Santillan, R., Flisser, A. (2000). Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 94, 85-89.

Sayed Y., Wallace L.A., Dirr H.W.; 2000. The hydrophobic lock-and-key intersubunit motif of glutathione transferase A1-1: implications for catalysis, ligandin function and stability. FEBS, 465, 169-172.

Schmidt G.D., Roberts L.S. Cestoidea: Form, function, and classification of the tapeworms: Foundations of parasitology. Idem. 6^a, McGraw Hill, USA, 2000.

Schuller D.J., Liu Q., Kriksunov I.A., Campbell A.M., Barrett J., Brophy P.M., Hao Q.; 2005. Crystal structure of a new class of Glutathione Transferase from the model human hookworm nematode *Heligmosomoides polygyrus*. Proteins, 61, 1024-1031.

Sheehan D., Meade G., Foley V.M., Dowd C.A.; 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classifications of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J., 360, 1-16.

Sorg O.; 2004. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? C.R. Biologies, 327, 649-662.

Stenberg G., Abdalla A., Mannervik B.; 2000. Tyrosine 50 at the subunit interface of dimeric human glutathione transferase P1-1 is a structural key residue for modulating protein stability and catalytic function. Biochem. & Biophys. Res. Comm., 271, 59-63.

Torres-Rivera A., Landa A.; 2008a. Glutathione transferase from parasites: A biochemical view. Acta Tropica, 105, 99-112.

Torres-Rivera A., Landa A.; 2008b. Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. Archives of Biochem. & Biophys., 447, 372-378.

Tracy J.W., Vande Waa E. A.; 1995. Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Marr J., Muller M., Academic Press, San Diego.

Tsuchida, S., Izumi, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Hatayama, I., Satoh, K., Sato, K.; 1987. Purification of a new acidic glutathione S-transferase, GSTYn1Yn1, with a high leukotriene-C4 synthase activity from the rat brain. Eur. J. Biochem., 170, 159-164.

van Bladeren, P.J.; 2000. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. Chemo-Biol. Interactions, 129, 61-76.

Vargo M.A., Nguyen L., Colman R.F.; 2004. Subunit Interface Residues of Glutathione S-Transferase A1-1 that Are Important in the Monomer-Dimer Equilibrium. Biochem., 43, 3327-3335.

Vibanco-Pérez N., Jiménez L., Merchant M.T., Landa A.; 1999. Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. J. Parasitol., 85, 448-453.

Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Mendoza-Hernández, G., Landa, A.; 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. Parasitol. Res., 88, 398-404.

Yoshinaga M., Ueki T., Michibata H.; 2007. Metal binding ability of glutathione transferases conserved between two animal species, the vanadium-rich ascidian *Ascidia sydneiensis* samea and the schistosome *Schistosoma japonicum*. *Biochem. et Biophys. Acta*, 1770, 1413-1418.

Wiergosz-Kowalewska R.S., Bednarska A., Kafel A.; 2006. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants. *Chemosphere*, 65, 963-974.

Wilce, M., Parker, M.; 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochem. et Biophys. Acta*, 1205, 1-18.

World Health Organization; 2003. Control of neurocysticercosis. Provisional agenda of the 56 World Health Assembly, 1-5.

Zhan Y., Rule G.S.; 2004. Glutathione induces helical formation in the Carboxy terminus of human Glutathione transferase A1-1. *Biochem.*, 43, 7244-7254.