



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E INMUNOLÓGICA DE LA GST25.5 kDa DE  
*Taenia solium* Y DETERMINACIÓN DE SU EXPRESIÓN BAJO ESTRÉS OXIDANTE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(Biología Experimental)**

PRESENTA:

**RAÚL ARAMÍS ROLDÁN MÉNDEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR  
FACULTAD DE MEDICINA  
DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E INMUNOLÓGICA DE LA GST25.5 kDa DE  
*Taenia solium* Y DETERMINACIÓN DE SU EXPRESIÓN BAJO ESTRÉS OXIDANTE**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**(Biología Experimental)**

PRESENTA:

**RAÚL ARAMÍS ROLDÁN MÉNDEZ**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR  
FACULTAD DE MEDICINA

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2013**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina , en su sesión ordinaria del día 20 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (Biología Experimental)** del alumno **ROLDÁN MÉNDEZ RAÚL ARAMÍS** con número de cuenta 300261606 con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E INMUNOLÓGICA DE LA GST 25.5 kDa DE *Taenia solium* Y DETERMINACIÓN DE SU EXPRESIÓN BAJO ESTRÉS OXIDANTE**", realizada bajo la dirección del DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA:

Presidente: DR. ARMANDO GÓMEZ PUYOU  
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Secretario: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ  
Suplente: DRA. MARIETTA TUENA DE GÓMEZ  
Suplente: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de agosto de 2013



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad de cursar y concluir esta parte de mi educación y mi vida.

Agradecimiento también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto al alumno, mediante una beca asignada con número de CVU/becario 289013/231036, y mediante un proyecto con el contrato CONACyT-80134-M así como a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT IN207507-3).

Agradezco también a los doctores Luis Felipe Jiménez García y Patricia Margarita Tato Zaldívar, quienes junto con el Dr. Landa conformaron el comité tutorial; por su supervisión constante, sus valiosos consejos y su guía para el desarrollo de este trabajo, así como las sugerencias y revisiones realizadas durante cada semestre en la evaluación tutorial.

## **Agradecimientos a título personal**

Mi más profundo agradecimiento para todas las personas que laboran y han laborado durante este tiempo en el grupo del laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* encabezado por el Dr. Abraham Landa Piedra, por haber permitido y contribuído grandemente a la realización de este proyecto.

Mil gracias a mi familia, en particular a mis padres y a mi hermana, sin cuyo cariño y apoyo yo no podría haber concluido esta etapa de mi vida y que siempre me alentaron para alcanzar esta y todas las metas que me he propuesto a lo largo de mi vida, los amo mucho.

A Rey, por estar ahí siempre, por las porras, por la compañía, por ser la parte más especial de mi vida durante estos últimos años, y que pese a todo siempre haber estado a mi lado y hacerme saber que no estuve solo, por reírte conmigo, enojarte cuando algo malo me pasa y por todo lo que pasamos juntos.

A mis mejores amigos: Viridiana, Pascual, Abraham y Serafín, por los muchos momentos de risas, las pláticas importantes, el apoyo durante los momentos difíciles y sobre todo por aceptarme con toda mi peculiar manera de ser, incluyendo las locuras y ridiculeces juntos.

Muchas gracias también a los chicos y chicas del laboratorio; Alice, por tener siempre una respuesta para todas las preguntas, Vera por ser de las mejores compañeras dentro del laboratorio y fuera de él, Oscar por las grandes charlas, Ana por ser algo así como mi segunda mentora en esto de las GSTs, Richi por toda la ayuda y la disposición para echarle ganas en el trabajo... sin olvidar a Felipe, Vic, Capo, Chimis, Julián y Lucía.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>I. Introducción</b>	
I.1 Generalidades de <i>Taenia solium</i>	12
I.2 Ciclo de vida	13
I.3 Teniasis y cisticercosis	
I.3.1 Teniasis	14
I.3.1.1 Diagnóstico y tratamiento	15
I.3.2 Cisticercosis	15
I.3.2.1 Diagnóstico y tratamiento	16
I.4 Epidemiología	17
I.5 El modelo de <i>Taenia crassiceps</i> -ratón	18
I.6 Estrés oxidante y mecanismos de defensa	19
I.7 Antioxidantes y enzimas desintoxicantes	20
I.8 Glutación transferasas	21
<b>II. Objetivo general</b>	<b>25</b>
<b>III. Objetivos particulares</b>	<b>25</b>
<b>IV. Antecedentes</b>	<b>26</b>
<b>V. Materiales y metodología</b>	<b>27</b>
V.1 Expresión y purificación de la enzima recombinante	27
V.2 Purificación de GST a partir de cisticercos	28
V.3 Ensayos de Dicroísmo Circular	28
V.4 Producción de anticuerpos policlonales contra GST	28
V.5 Cultivos de cisticercos	29
V.6 Ensayos de ELISA y Western Blot	29
V.7 Inmunolocalización	30
V.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	30
V.9 Ensayos de actividad enzimática	30
V.10 Purificación de mRNA	31
V.11 Reaccion en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR)	31
V.12 Isoelectroenfoque en geles de doble dimensión	32
<b>VI. Resultados</b>	
VI.1 Ensayos de Dicroísmo Circular	33
VI.1.1 Desplegamiento/replegamiento de la proteína	35
VI.2 Obtención de sueros	36
VI.2.1 Reacciones cruzadas	38
VI.3 Inmunofluorescencia Indirecta	38
VI.4 Determinación de la expresión en presencia de un agente oxidante	39



VI.4.1 Ensayos de actividad enzimática	39
VI.5 Cuantificación de la expresión por RT-PCR	41
VI.6 Isoelectroenfoque en geles de doble dimensión	41
<b>VII. Discusión</b>	<b>43</b>
<b>VIII. Conclusiones</b>	<b>46</b>
<b>IX. Literatura citada</b>	<b>47</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Morfología del adulto de <i>Taenia solium</i>	12
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	14
Figura 3. Mapa de distribución mundial de <i>Taenia solium</i>	18
Figura 4. Modelo tridimensional de una GST de tipo mu	23
Figura 5. Mapa resumen de las técnicas usadas en el trabajo	27
Tabla 1. Condiciones experimentales para determinación de clases de GST	31
Figura 6a. Dicroísmo circular de rTsGST25.5 a diferentes temperaturas	33
Tabla 2a. Desconvolución de las gráficas de la figura 5a	34
Figura 6b. Dicroísmo circular de rTsGST25.5 a diferentes puntos de pH	34
Tabla 2b. Desconvolución de las gráficas de la figura 5b	34
Figura 6c. Dicroísmo circular de rTsGST25.5 a diferentes concentraciones de HCu	35
Tabla 2c. Desconvolución de las gráficas de la figura 5c	35
Figura 7. Ensayo desplegamiento/replegamiento de la rTsGST25.5	36
Figura 8a. Ensayo de ELISA en la titulación de los sueros $\alpha$ -rTsGST25.5	37
Tabla 3. Absorbancias detectadas en el ensayo de ELISA	37
Figura 8b. Ensayo de Western Blot con los sueros $\alpha$ -rTsGST25.5	37
Tabla 4. Reacciones cruzadas de rTsGST25.5 y el suero $\alpha$ -rTsGST25.5 con otras GST	38
Figura 9. Inmunofluorescencias en cortes de cisticerco de <i>T. solium</i>	38
Figura 10. SDS-PAGE de la FGST de <i>T. crassiceps</i>	39
Figura 11. Actividad de la FGST de <i>T. crassiceps</i> con a)CDNB, b)DCNB y c) ETA	40
Figura 12. RT-PCR de mRNA para GST25.5, GST26.5 y SOD de <i>T. crassiceps</i>	41
Figura 13. Western Blot de un SDS-PAGE en doble dimensión (2-D)	42

## Resumen

Las glutatión transferasas son enzimas cuya función principal consiste en transferir el grupo tiol del GSH a moléculas hidrofóbicas potencialmente dañinas para la célula, con el fin de facilitar su eliminación. Se tienen reportes de que estas enzimas participan en diversos procesos celulares además de la desintoxicación, tales como el transporte de moléculas, la modulación de cascadas de señalización mediante la unión a cinasas, la formación y control de canales iónicos, el catabolismo de algunos aminoácidos aromáticos e intervienen en la síntesis de diferentes moléculas como leucotrienos, prostaglandinas y flavonoides.

Estas enzimas son de vital importancia para la célula en organismos como los helmintos, ya que estos carecen del sistema de enzimas CYP 450 (citocromo 450), por lo que se convierten en el principal sistema desintoxicante del parásito contra agentes xenobióticos; se sabe que llegan a representar del 3-4% de proteína soluble total en diversos organismos, lo que indica su importancia dentro del metabolismo.

En *Taenia solium*, el agente etiológico de la teniasis y la cisticercosis se han descrito tres GST de pesos moleculares similares entre sí: una de 26 kDa (TsGST26) y dos de 25 kDa (TsGST25 y TsGST $\sigma$ ). Las tres enzimas han sido estudiadas en sus propiedades cinéticas y marcadores de clase que permiten ubicarlas en diferentes categorías dentro del universo de las GST, y las proteínas de 25 (clase  $\mu$ ) y 26 kDa han sido estudiadas en sus formas recombinantes (rTsGST25 y rTsGST26 respectivamente), y se han determinado las condiciones óptimas para su actividad.

En el presente trabajo se determinó que la rTsGST25 posee una estructura secundaria conformada principalmente por  $\alpha$ -hélices; las condiciones del medio (temperatura y pH) no afectan de forma significativa su estructura, aunque si lo hacen con la actividad de la enzima, al igual que concentraciones letales del oxidante hidroperóxido de Cumeno (HCu). Se concluyó también que al llevar a la enzima a temperaturas críticas (70°C) ocurre un desplegamiento irreversible de la estructura que coincide con una pérdida de la actividad enzimática la cual tampoco logra restablecerse al regresar a las condiciones iniciales.

Se generaron sueros que reconocen específicamente a la rTsGST25 y con los cuales se determinó la localización de la enzima, encontrándola principalmente en el tegumento de cisticercos de *T. crassiceps*. Se determinó también que cultivos de cisticercos expuestos a HCu no alteran la expresión de la TsGST25 a nivel de proteína, pero sí de mRNA.

Finalmente, se encontró que la fracción de GST en *T. crassiceps* contiene al menos 6 isoformas de la enzima GST25, de entre las que al menos dos de ellas las más abundantes coinciden con el punto isoeléctrico teórico calculado (pH 6.1) para la proteína recombinante rTsGST25 de *T. solium*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo servirán para entender mejor las interacciones entre el sistema GST en *T. solium* y su hospedero, con el fin de desarrollar vacunas y/o fármacos específicos que puedan eliminar selectivamente al parásito o impedir que continúe con su ciclo de vida.

## Abstract

Glutathione transferases are enzymes whose main function is transfer the GSH thiol group to hydrophobic molecules potentially harmful to the cell, facilitating their elimination. There are reports that these enzymes participate in several cellular processes besides detoxification, such as transport of certain molecules, modulation of signaling cascades through kinase-binding, control and formation of ionic channels, catabolism of certain aromatic aminoacids and they participate in synthesis of a variety of other molecules such as leukotrienes, prostaglandins and flavonoids.

These enzymes are vital to the cell in organisms such as helminths, because of the lack of the CYP 450 (cytochrome 450) system, becoming the main detoxifying system in the parasite against xenobiotic agents; it has been reported that they may represent a 3-4% of the total soluble protein in many organisms, which indicates their importance in metabolism.

In *Taenia solium*, etiologic agent for taeniosis and cisticercosis there have been described three GST with similar molecular weights: one of 26 kDa (TsGST26) and two of 25 kDa (TsGST25 and TsGST $\sigma$ ). The three enzymes have been studied for their kinetic properties and the class-markers which allow them to be classified in different categories in the whole GST group, and the 25 ( $\mu$ -class) and 26 kDa have been studied in their recombinant forms (rTsGST25 and rTsGST26 respectively), determining their optimal conditions for activity.

In this work, it was found that rTsGST25 has a secondary structure conformed mainly for  $\alpha$ -helices; environmental conditions (temperature and pH) do not affect significantly its structure, but they impact on enzyme activity, as does lethal concentrations of the oxidant Cumene hydroperoxide (CHP). It was also concluded that when the enzyme was carried to critical temperatures (70°C) it occurs an irreversible unfolding that matches losing of enzymatic activity, which doesn't restore when carrying back to initial conditions.

Sera that recognizes specifically rTsGST25 were created and with those, the localization of the enzyme was determined, finding it mainly in *T. crassiceps* tegument. It was also found that cisticercii cultures exposed to CHP do not alter expression of TsGST25 at a protein-level, but it does at a mRNA-level.

Finally, GST fraction of *T. crassiceps* was found to have at least 6 isoforms of the GST25 enzyme, from which at least two of them are well-represented and one matches the isoelectric theoretical calculated point of (pH 6.1) for the recombinant form rTsGST25 of *T. solium*.

Results derived from this work can serve for a better understanding on the host-parasite GST-system, which may lead to development of drugs and/or vaccines that specifically can eliminate the parasite, or interrupt its life-cycle.

## I. Introducción

### I.1 Generalidades de *Taenia solium*

*Taenia solium* es un helminto (Platyhelminthes: Cestodea) que pertenece a la familia Taeniidae, la cual se caracteriza porque sus miembros poseen un órgano de fijación o escólex y un cuerpo segmentado en forma de cinta llamado estróbilo. En cada uno de estos segmentos o proglótidos se encuentran órganos sexuales femeninos y masculinos los cuales hacia la parte más distal del organismo se encuentran sexualmente maduros y pueden ser fecundados, albergando alrededor de  $40 \times 10^3$  huevos cada uno. Estos organismos carecen de sistema digestivo, por lo cual deben absorber nutrientes de su medio circundante mediante un tegumento compuesto por vellosidades denominadas microtricas las cuales se recubren de la membrana tegumentaria del parásito; por debajo de esta membrana, existe una banda protoplásmica continua formada por el citoplasma y orgánulos de sus citones tegumentarios. Este tegumento se encuentra delimitado del resto de las estructuras por la membrana basal, y por debajo de ésta, se encuentran diversos tipos celulares tales como las células flama, miocitos, células formadoras de corpúsculos calcáreos y de almacenamiento de glucógeno, todas contenidas en una matriz de tejido fibroso. (Schmidt & Roberts, 2000).

El adulto de *T. solium* se caracteriza porque su escólex se encuentra coronado por una doble hilera de ganchos (que van de 22 a 32), además de las 4 ventosas que también poseen los otros miembros de la familia Taeniidae (Fig. 1A). El escólex mide aproximadamente 1 mm de largo, mientras que la longitud del organismo completo varía entre 2 y 5 m. Al escólex le sigue una región denominada “cuello” conformado por células pluripotenciales que son las encargadas de generar los proglótidos. Dependiendo de su localización y estado de madurez reproductiva, los proglótidos se pueden clasificar en tres variedades: los proglótidos inmaduros son aquellos que se encuentran más cerca del escólex y se caracterizan porque sus órganos sexuales aún no se encuentran desarrollados; les siguen los proglótidos maduros, en los cuales se pueden apreciar las estructuras tanto de los testículos como de los ovarios; hacia el extremo más apical del organismo se hallan los proglótidos grávidos, los cuales ya se encuentran fecundados y en donde se puede apreciar otro rasgo distintivo de *T. solium*, que es el número de ramas uterinas, las cuales pueden ser de 12 a 14, siendo mayor este número en *T. saginata* una especie cercana y muy relacionada; las ramas uterinas contienen a los huevos (Fig. 1B), los cuales les dan apariencia arboriforme (Schmidt & Roberts, 2000; Tay, J. 2002).

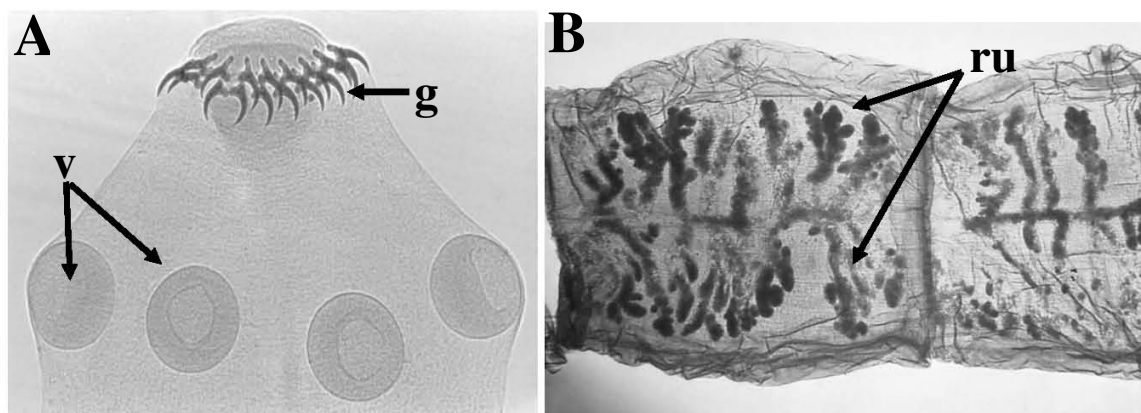


Fig. 1.- Morfología del adulto de *Taenia solium* mostrando las 4 ventosas (v) y la doble hilera de ganchos (g) en el escólex (A) y proglótidos grávidos (B) donde se aprecian las ramas uterinas (ru) cargadas de huevos. (Tomado de [http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031208/15dc7a2463b842c69afc2db6c07f7b9f/5262\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031208/15dc7a2463b842c69afc2db6c07f7b9f/5262_lores.jpg) y [http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031208/187a6fd698804c1c851fceb20cd01c63/5261\\_lores.jpg](http://phil.cdc.gov/PHIL/Images/20031208/187a6fd698804c1c851fceb20cd01c63/5261_lores.jpg)).

El huevo es la estructura de resistencia y está conformado por el embrióforo, la membrana oncosférica y de la oncosfera o embrión hexacanto, que recibe ese nombre debido a los tres pares de ganchos que presenta. Una vez liberada del embrióforo, la oncosfera se establece y pasa al estado larval conocido como cisticerco, que es una vesícula ovoidal llena de fluido y con un escólex invaginado (Schmidt & Roberts, 2000).

## **I.2 Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *T. solium* requiere de un hospedero definitivo (el ser humano) y un hospedero intermedio (el cerdo) para poder mantenerse. El ciclo comienza en el ser humano, en donde el estadio adulto o reproductivo comienza a generar huevos, los cuales son expulsados dentro de los proglótidos hacia el medio ambiente por medio de las heces. Una vez fuera del humano, los huevos pueden ser ingeridos por el cerdo, debido a sus hábitos de forrajeo y a la falta de condiciones sanitarias adecuadas para su cría; dentro del cerdo, el embrióforo se digiere por las enzimas digestivas y sales biliares, asimismo activan a la oncosfera liberada que atraviesa la pared intestinal y llega al torrente sanguíneo, tiene tropismo hacia zonas con alta irrigación sanguínea como es el músculo esquelético, lengua, ojo y sistema nervioso central, incluyendo el cerebro (Molinari et al, 1988).

Una vez establecido, la oncosfera se convierte en metacestodo o cisticerco en donde se mantiene por un cierto tiempo, y si algún ser humano ingiere la carne de cerdo contaminada y mal cocida, los cisticercos llegan al intestino delgado donde evaginan, se convierten en el adulto y se adhieren a la pared intestinal para reiniciar el ciclo. Sin embargo, el ser humano puede también convertirse en hospedero intermedio accidental al ingerir huevos de tenia, y entonces ocurre el mismo proceso que en el cerdo; los embriones son liberados y se mueven por medio del sistema circulatorio hacia los mismos sitios donde lo harían dentro del cerdo. El principal medio de contagio del ser humano por cisticercos es la convivencia con individuos infectados con el adulto del parásito, la ingestión de agua o alimentos contaminados con los huevos de *T. solium*, y también se han reportado autoinfecciones en el ciclo ano-mano-boca, aunque no se conoce bien la frecuencia de este fenómeno (Cox, 1982).

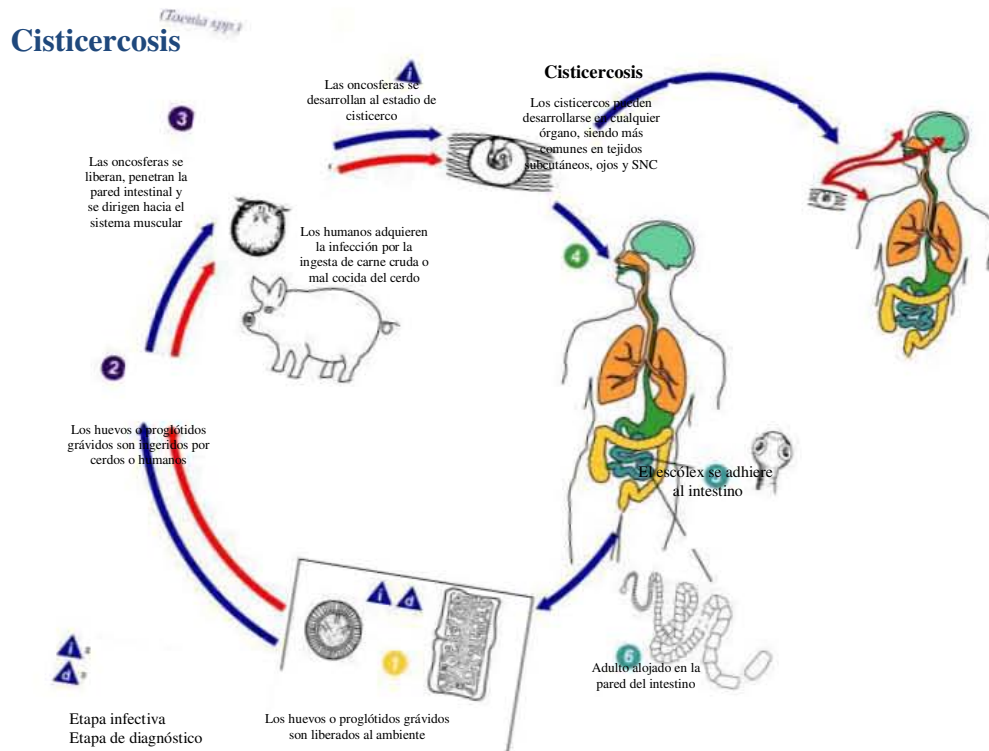


Fig. 2.- Ciclo de vida de *Taenia solium*. Modificado de <http://phil.cdc.gov/Images /8/83/Cysticercosis/by/Taenia/solium3387/lores.jpg>

### I.3 Teniasis y cisticercosis

La infección y enfermedades asociadas a *T. solium* son endémicas en países en vías de desarrollo donde se crían cerdos para consumo humano, especialmente en América Latina, Asia, África y partes de Oceanía. Sin embargo, cada vez son más frecuentes los casos o brotes aislados en países desarrollados, debidos a la inmigración de personas parasitadas desde zonas endémicas (Schantz et al, 1998). En México, la prevalencia de la teniasis es del 0.2 al 3.4% (Sarti, 1997), mientras que la cisticercosis alcanza en promedio del 1.1-1.4% (Larralde et al 1992).

#### I.3.1 Teniasis

La teniasis solamente ocurre en el hospedero humano, posterior a la ingestión de carne de cerdo mal cocinada infectada con cisticercos. Alrededor de dos meses después de la infección, los proglótidos grávidos comienzan a desprenderse del estróbilo en su parte distal y son expulsados juntos con las heces; cada uno de estos proglótidos contiene alrededor de  $40 \times 10^3$  huevos fértiles (Flisser, 1994).

Como la tenia se adhiere a la mucosa intestinal por medio de sus ganchos y ventosas, sólo se genera una ligera inflamación localizada en el sitio, sin provocar un daño sustancial al intestino. Los síntomas incluyen dolor abdominal, distensión, diarrea y náuseas, pero ha sido difícil establecer una correlación entre estos síntomas y la infección debido a que en la mayoría de los individuos que se presenta, esta enfermedad es asintomática. La identificación y oportuna detección de la infección por *T. solium* se vuelve importante debido al riesgo latente de infecciones por cisticercosis en el propio hospedero o en hospederos cercanos a su ambiente (Flisser, 1994; Schantz et al, 1998). El tiempo de vida del adulto de *T. solium* no se

conoce del todo; los libros de texto reportan de 20 a 25 años en base a casos anecdóticos, pero estudios recientes sugieren un rango mucho menor, probablemente de menos de 5 años (Allan et al, 1996).

### **I.3.1.1 Diagnóstico y tratamiento**

Existen dos problemas principales con el diagnóstico de infección por teniasis: la poca sensibilidad de las técnicas parasitológicas y la similitud entre los huevos de *T. solium* y *T. saginata*. La morfología de los genitales en proglótidos maduros, así como el número de ramas uterinas de proglótidos grávidos teñidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina constituyen un método de identificación de la especie; sin embargo, los proglótidos grávidos rara vez se hallan disponibles (Mayta et al, 2000).

El mejor diagnóstico para teniasis intestinal es la detección de coproantígenos mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la cual detecta moléculas específicas del parásito dentro de las muestras fecales; esta técnica tiene una sensibilidad reportada de alrededor de 95% y una especificidad mayor al 99% (Allan et al, 1990). También se ha reportado el uso de técnicas serológicas y de biología molecular (mediante el uso de PCR con marcadores específicos) que otorgan buenos resultados en cuanto al diagnóstico de la infección, sin embargo, suelen ser pruebas costosas no aplicables para la mayor parte de la población, sobre todo en zonas endémicas de alta pobreza (González et al, 2000).

Los dos medicamentos utilizados para el tratamiento de la teniasis son la niclosamida y el praziquantel. De estas dos, el praziquantel puede ser absorbido a través de la mucosa intestinal y atacar también la infección por cisticercos si ésta se encuentra presente, por lo que se debe administrar en dosis adecuadas. La dosis normal de praziquantel es de 5-10 mg/kg por vía oral (Flisser et al, 1993).

### **I.3.2 Cisticercosis**

La cisticercosis es causada por el estadio larvario de *T. solium*, cuando el ser humano accidentalmente ingiere los huevos del parásito, los cuales viajan a través del tubo digestivo, las enzimas digestivas y las sales biliares destruyen el embrióforo, liberan y activan a las oncosfera. Ésta penetra en el torrente sanguíneo y viaja al músculo y otras zonas densamente irrigadas del hospedero; en donde se establecen y enquistan en forma de cisticercos, alcanzando su tamaño máximo de 0.5-1 cm en aproximadamente dos meses (Allan et al, 1990).

Las manifestaciones clínicas dependen del órgano destino del cisticerco; fuera del sistema nervioso central, la cisticercosis no suele presentar síntomas de notoriedad. La cisticercosis subcutánea se presenta en forma de nódulos pequeños, móviles e indoloros que suelen notarse más en los brazos y el pecho. La cisticercosis subcutánea es rara en América Latina pero es muy común en Asia y África. Una biopsia o citología tomada a partir de los nódulos ayuda a confirmar este tipo de infección. La cisticercosis muscular es el padecimiento más común, se forman calcificaciones puntuales o elipsoidales en los muslos o en los brazos. En algunos casos (alrededor del 5%) el corazón también se convierte en blanco del cisticerco, sin embargo, suele ser un padecimiento asintomático (Rahalkar et al, 2000).

La cisticercosis oftálmica ocurre en 1-3% de los casos, lo que hace de *T. solium* el parásito intraorbital mas común. Los cisticercos intraoculares son frecuentemente hallados flotando



libremente en el humor vítreo o en el espacio subretinal; la perturbación visual está relacionada al grado de tejido retinal o el desarrollo de uveitis crónica. La ultrasonografía orbital es el método de diagnóstico más eficaz e inofensivo (Cardenas et al 1992).

La neurocisticercosis ocurre cuando el parásito infecta el sistema nervioso central, ocasionando un desorden pleomórfico y clínico. Los signos y síntomas dependen del número, la cantidad y estado de los cisticercos (es decir si están o no calcificados) y no suelen ser específicos. Los ataques epilépticos suelen ser la presentación más común de la neurocisticercosis, y en muchos casos, son el primer y único síntoma; estos ataques ocurren en el 50-80% de los pacientes con quistes parenquimales o calcificaciones en el cerebro (Chopra, et al, 1981; Del Brutto, et al 1992).

Tal parece que existen diferencias geográficas en cuanto a los síntomas que se presentan en relación a la neurocisticercosis; en países asiáticos, es común encontrar una sola lesión cerebral, mientras que en América Latina son frecuentes las infecciones de múltiples con cisticercos viables, pero sin signos de inflamación (Rabiela et al. 1982).

### **I.3.2.1 Diagnóstico y tratamiento**

Hasta hace poco, la prueba estándar para detectar cisticercosis y neurocisticercosis por serología era la prueba de ELISA con antígenos crudos del parásito, sin embargo, esta prueba presenta reacciones cruzadas con los parásitos *Hymenolepis nana* y *Echinococcus granulosus* (Diwan et al. 1892), por lo que se prefieren muestras de fluido cerebroespinal antes que de suero, aunque esto conlleva la dificultad de efectuar una punción lumbar en el paciente. Los ensayos de inmunoblot con glicoproteínas del cisticercos reportan la mejor sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, pero tiene la desventaja de que los anticuerpos perduran mucho tiempo en el organismo, aún cuando la infección haya cedido, además que requiere más reactivos, equipo costoso y personal capacitado en el manejo de estas pruebas. Los ensayos de detección de antígenos pueden detectar a los parásitos cuando aún están con vida, y por consiguiente pueden ser herramientas para el tratamiento y el monitoreo, especialmente aquellos que se realizan con anticuerpos monoclonales, los cuales se desempeñan bien en comparación con otras pruebas en fluido cerebroespinal (Correa et al, 1989).

Puesto que es muy importante saber el número, tamaño y localización de los parásitos y de las lesiones, los estudios de imagenología siempre han tenido un papel importante en el diagnóstico de las variedades de cisticercosis, en especial cuando se localiza en sistema nervioso central. Las dos técnicas utilizadas a este respecto son la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (Vasconcelos, 1990). La RMN es la mejor técnica para determinar el número, localización y estado del desarrollo del parásito, además de que permite visualizar los cambios degenerativos del parásito así como quistes muy pequeños, aquellos localizados en ventrículos, tallo cerebral, cerebelo, ojo y vesículas racimosas basales (Martinez et al. 1989). La mayor desventaja de esta técnica es su alto costo y su limitada disponibilidad para la mayor parte de los casos.

La cisticercosis fuera del SNC se considera un padecimiento benigno y en muchos casos no requiere siquiera de un tratamiento; sin embargo, la neurocisticercosis se asocia a morbilidad y mortalidad sustanciales. Durante muchos años, la mejor opción era la remoción quirúrgica de los quistes o el tratamiento con esteroides para disminuir la inflamación; el praziquantel fue el primer fármaco en ser administrado efectivamente como medicamento en estas infecciones y tiempo después, el albendazol se convirtió en la mejor opción, por su

efectividad y bajo costo (Sotelo et al. 1988). Los esquemas aceptados actualmente son 8 días de tratamiento con albendazol a una dosis de 15mg/kg/día en conjunto con esteroides, o de 15 días de praziquantel a dosis de 50 mg/kg/día. Tratamientos rápidos de 1 día con praziquantel o 3 días con albendazol parecen ser efectivos en pacientes infectados con un solo quiste (Corona et al. 1996; Sotelo et al. 1990).

#### **I.4 Epidemiología**

La teniosis y la cisticercosis afectan a miles de individuos en los países en vías de desarrollo, y representan también un problema en países desarrollados, pero con alta tasa de inmigración (Fig. 3). En zonas endémicas la teniosis/cisticercosis es muy común, se han documentado alguna áreas en donde más del 10% de la población general son seropositivos a *T. solium* (Schantz et al. 1994). Por otro lado, reacciones seropositivas transitorias y casos de neurocisticercosis calcificada asintomática son consistentes en un esquema donde el parásito puede ser eliminado por su hospedero, siendo esto potencialmente determinado por la gravedad de la infección, el estado inmune del hospedero, la edad de la infección o una combinación de éstos (Verastegui, 2000).

Existen pocos datos de la epidemiología para el gusano adulto, pero se sabe que la cría doméstica de cerdos, la teniosis y la cisticercosis están íntimamente interrelacionadas. Muchas personas en países en desarrollo no poseen recursos para comprar una vaca, pero sí pueden comprar unos cuantos cerdos, los cuales son más baratos y fácilmente comerciados, convirtiéndolos tanto en fuente de alimento como de ingresos. Más aún, pocas veces se invierte en su alimentación dado que los cerdos naturalmente forrajean entre el pasto y la basura. Sumado a esto, en países en vías de desarrollo pocos cerdos van a rastros formales y en muchos casos, el único control que se ejerce sobre ellos es la revisión de la lengua en busca de quistes. Sólo los portadores del gusano (estadio adulto) y los cerdos infectados son importantes en términos de transmisión de la enfermedad; los individuos que padecen neurocisticercosis son de interés médico y no constituyen un elemento de riesgo para la salud pública, a menos que sean portadores del adulto.

En países desarrollados, se ha logrado erradicar a *T. solium* mediante el mejoramiento de las condiciones sanitarias y el control de la crianza doméstica de cerdos, pero dado que las expectativas de crecimiento y mejora socioeconómicos en países no desarrollados son casi nulas, hacen falta urgentemente medidas de control para la erradicación del parásito (Schantz et al. 1993). En México, la educación para la salud ha sido evaluada, pero los resultados aunque prometedores, son insuficientes, ya que si bien la información respecto a estas enfermedades ha mejorado, las prácticas relacionadas positiva o negativamente a la transmisión de la infección (lavarse las manos, no defecar al aire libre, controlar y delimitar el espacio y la ingesta de los cerdos) no han cambiado, sobre todo en las zonas rurales. Otro medio para controlar la infección es el tratamiento masivo de los cerdos, o en un futuro, mediante la administración de una vacuna de bajo costo y efectiva. Probablemente la mejor estrategia sea una combinación de las antes mencionadas, con especial énfasis en la educación, pero se trata de un trabajo que debe proyectarse a largo plazo dada la situación social en la que actualmente nos encontramos (Flisser, 1997; Lightowers, 2000).

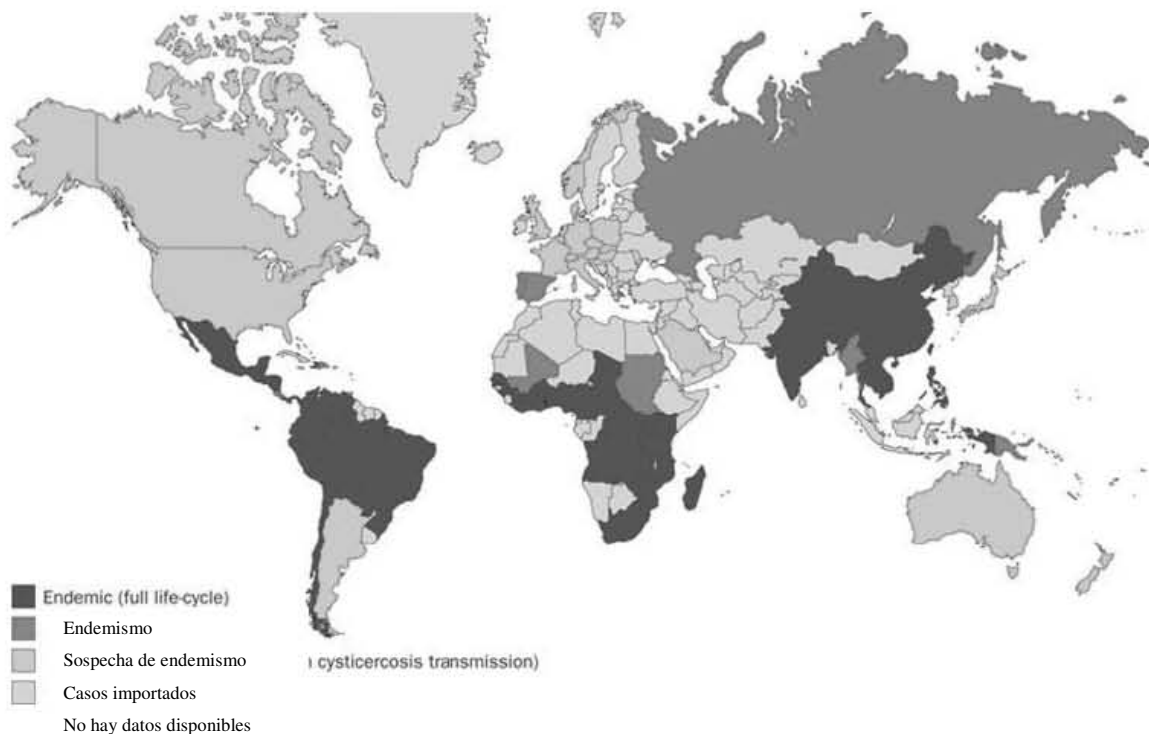


Fig. 3.- Mapa de distribución mundial de la teniosis/cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* en seres humanos. Tomado de [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_cysticercosis\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_cysticercosis_2009.png)

### 1.5 El modelo de *Taenia crassiceps*-ratón

*Taenia crassiceps* es un céstodo parásito de zorros, lobos y perros, mientras que su hospedero intermediario son diferentes especies de roedores. En el ciclo natural, los cisticercos se localizan en el tejido subcutáneo de estos roedores, así como las cavidades pleural y peritoneal (Freeman 1962). Estos cisticercos son capaces de reproducirse asexualmente por gemación dentro de la cavidad peritoneal del roedor, lo que ha permitido su uso como modelo experimental en el laboratorio, debido a que la infección puede ser mantenida por tiempo indefinido mediante inoculaciones seriales en nuevos hospederos.

La ultraestructura de los estadios larval y adulto de *T. crassiceps* no difiere de forma significativa de la reportada para otros ténidos, el subtegumento contiene citones tegumentarios, células flama, miocitos, corpúsculos calcáreos y células de reserva de glucógeno y muchas de sus moléculas muestran correspondencia y epítopes relacionados a los de *T. solium*, lo que ocasiona que pueda haber reacciones cruzadas entre los anticuerpos producidos en su contra. Además, en contraste con otros ténidos este parásito no utiliza al ser humano como hospedero, lo cual favorece su uso como modelo de laboratorio (Heldwein et al. 2006).

Por microscopía electrónica, se ha observado que existen gránulos que rodean a los núcleos en los cisticercos, los cuales aparentan ser células indiferenciadas, con abundantes ribosomas y algunas mitocondrias localizadas irregularmente bajo la capa de citones tegumentarios. Tales células pueden ser precursores de citones que eventualmente se insertan en el tegumento, contribuyendo al crecimiento continuo del tejido. Asimismo, se observaron células con núcleos de forma irregular que también contenían numerosas microvesículas, que pueden corresponder a citones tegumentarios diferenciados antes de que estos se inserten en el tegumento (Wilms & Zurabian, 2010).

La reproducción asexual sin embargo, tiene ciertas consecuencias negativas debido a la falta de variación genética, como en el caso de la cepa ORF de cisticercos, los cuales han perdido el escolex, convirtiéndolos en organismos incapaces de desarrollarse en adultos en su hospedero definitivo, sumado a la pérdida de dos de sus cromosomas (Mount, 1968; Smith et al. 1972).

Sin embargo, las ventajas que ofrece el modelo, como son: la velocidad de reproducción del cisticerco en el ratón, la facilidad de mantenimiento de la infección, el bajo costo y tiempos más cortos en comparativo al modelo natural y sobre todo, la gran cantidad de moléculas y epítopes compartidos entre *T. solium* y *T. crassiceps* hacen de este último un modelo experimental idóneo para entender la dinámica hospedero-parásito de *T. solium*.

## **I.6 Estrés oxidante y mecanismos de defensa**

Para contrarrestar la infección por *T. solium*, sus hospederos (cerdo y humano) poseen elaborados mecanismos de defensa, los cuales tienen componentes tanto celulares como humorales, ya que se encuentra actividad de células T CD4, así como de inmunoglobulinas IgE.

La efectividad de la respuesta innata depende en gran parte de la generación de un fenómeno inflamatorio inespecífico en el entorno del patógeno. Se ha enfatizado que los macrófagos son las únicas células que pueden actuar directamente como efectoras en la inmunidad celular antimicrobiana, debido a que estas células pueden ponerse en contacto con los patógenos, fagocitarlos, inhibirlos y destruirlos. Sin embargo, Tato y Molinari (1987) observaron que eran los eosinófilos quienes directamente interactuaban con el cisticerco, lo infiltran y probablemente lo destruyen. En *T. crassiceps*, se ha observado que las células T están involucradas en la respuesta inmune, siendo la respuesta tipo Th1 predominante en perfiles de resistencia a la infección, mientras que un tipo Th2 está asociado con altas cargas parasitarias (Terrazas et al. 1998). La activación diferencial del cambio de respuesta Th1-Th2 es esencial en la resistencia o susceptibilidad del hospedero a la infección, por lo que las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) tales como los macrófagos tienen un papel importante en la polarización de la respuesta, mediante la secreción de citocinas, facilitando ligandos para el receptor T y mediante señales co-activadoras (Rodríguez-Sosa et al. 2002).

En cuanto a la respuesta de los linfocitos T CD4, el tipo de respuesta predominante es Th2, en donde las células producen citocinas que estimulan la producción de otras citocinas que activan a otras células como mastocitos, eosinófilos y macrófagos. Estas células del sistema inmune son capaces de producir proteínas citotóxicas, enzimas proteolíticas o bien, liberar al ambiente especies reactivas capaces de generar graves daños al parásito mediante el mecanismo de estrés oxidante (Klion & Nutman, 2002).

El estrés oxidante se define como un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los mecanismos antioxidantes a favor de los primeros, lo que genera un daño potencial en la célula. El estrés oxidante está integrado por sistemas generadores de radicales libres (RL), como pueden ser las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de óxidos de nitrógeno (ERON). Un radical libre es aquella molécula que en su último orbital tiene un electrón desapareado, por lo cual reacciona fácilmente con otras moléculas, modificándolas y convirtiéndolas en agentes potencialmente dañinos para los sistemas vivos (Sies, 1985).

Los radicales libres son generados tanto por el organismo como por fuentes exógenas a ellos, entre los que destacan los producidos o inducidos por pesticidas, la atmósfera contaminada por hidrocarburos, ozono, bióxido de nitrógeno, diversos solventes orgánicos, metales y el humo del cigarrillo. La producción controlada de radicales libres dentro del organismo es vital para la célula, puesto que permite la realización de varios procesos fisiológicos, incluyendo la fertilización del óvulo por el espermatozoide y la activación de genes; también participan en los mecanismos de defensa del organismo durante una infección, realizando lisis bacteriana (Droge, 2002).

Las ERO que se producen en la reacción inflamatoria como respuesta a agentes patógenos, son el anión superóxido ( $\bullet\text{O}^{2-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), aunque también existen estos radicales asociados a nitrógeno, como el radical óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ). Estas especies reactivas son capaces de dañar a las células porque las oxidan y hacen perder su función, por ejemplo la de los lípidos de las membranas, las proteínas citosólicas y el ADN (Docampo, 1995). Entre otras cosas, los ERO son capaces de generar hidroperóxidos lipídicos y carbonilos citotóxicos, ambos compuestos muy dañinos tanto para las proteínas, lípidos, como para el ADN (Brophy & Pritchard, 1992).

Por lo anterior, los parásitos del género *Taenia*, a lo largo de su evolución han desarrollado estrategias que les permiten interferir con la respuesta inmune de su hospedero, tales como establecerse en sitios inmunológicamente privilegiados (por ejemplo, el lumen intestinal) en donde la respuesta inmune es menos severa, o modular la respuesta inmune del hospedero de un tipo  $\text{T}_{\text{H}1}$  (protectora) a un tipo  $\text{T}_{\text{H}2}$  (permisiva); otro método de defensa es valerse de moléculas y enzimas dedicadas a detener, controlar y eliminar las ERO, anticuerpos y células del hospedero, lo cual se conoce como sistemas antioxidantes (Brophy & Pritchard 1992; Klion & Nutman 2002, Zepeda et al. 2010).

## **I.7 Antioxidantes y enzimas desintoxicantes**

Un antioxidante se define como aquella sustancia que aún en concentraciones bajas disminuye o evita la oxidación de un sustrato. En bioquímica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción. Los antioxidantes han sido clasificados de diferentes maneras, de las cuales las más utilizadas establecen las diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos (Ames et al. 2002).

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos tenemos compuestos de bajo peso molecular, como la vitamina E, el ácido ascórbico, el piruvato y el glutatión que actúan directamente sobre las ERO, oxidándose ellas mismas e impidiendo que se propaguen dentro de la célula y afecten moléculas de mayor importancia; el mecanismo de acción de estas moléculas suele ser conjugarse directamente con el radical o xenobiótico, sin embargo, muchas de estas moléculas también sirven de cofactores en sistemas desintoxicantes de tipo enzimático (Tracy & Vande, 1995). Uno de los más importantes cofactores de enzimas desintoxicantes es el glutatión (L- $\gamma$ -glutamil-L-cistenil-glicina o GSH), el cual es una molécula ubicua que además de participar en el metabolismo de xenobióticos, interviene en la proliferación y diferenciación celular, en la regulación de vías de señalización, la expresión de algunos genes y como reserva de cisteínas. Esto puede explicar su abundancia dentro de las células, ya que en diversos estudios se ha determinado que sus concentraciones varían desde 0.1 a 10 mM (Dickinson & Forman, 2002).

En cuanto a los sistemas desintoxicantes de tipo enzimático, se encuentran un conjunto de enzimas que actúan a diferentes niveles, según la sustancia tóxica o especie reactiva que conforman una vía secuencial de inactivación y eliminación de los compuestos nocivos para la célula (Halliwell & Gutteridge, 2007). El metabolismo de xenobióticos (sustancias extrañas a las funciones metabólicas normales) se divide en dos fases, de las cuales la Fase I o de reacciones de funcionalidad, tiene como característica que las enzimas hacen más solubles a los radicales libres y especies reactivas que entran en contacto con el parásito, a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, haciendo a estas sustancias más polares. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa (SOD) constituye una primera línea de defensa, ya que se encarga de convertir el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual posteriormente será metabolizado por otras enzimas. En la mayor parte de los organismos, esta función recae en la familia de enzimas del citocromo P450; sin embargo, en *T. solium* y otros helmintos esta variedad de mono-oxigenasas está ausente, por lo que la SOD, junto con la xantina oxidasa, la glutaredoxina y la peroxiredoxina (PRX) son las encargadas de cumplir esta labor. En *T. solium* no se ha encontrado actividad de catalasa (Docampo, 1995; Halliwell & Gutteridge, 2007).

En una segunda fase del metabolismo xenobiótico se encarga de procesar los compuestos polares generados antes, con la finalidad de eliminarlos de la célula. Esta segunda fase se conoce como reacciones de conjugación, porque durante estas reacciones se añaden pequeñas moléculas a los xenobióticos generando enlaces covalentes (Tracy & Vande, 1995). Entre las enzimas más importantes para esta fase se encuentran la glutatión transferasa (GST), la glutatión peroxidasa (GPX) y la PRX que se encargan de metabolizar hidroperóxidos lipídicos, mientras que si se forman carbonilos citotóxicos, las GST, la glutatión reductasa o la aldehído reductasa, son las encargadas de metabolizarlos (Brophy & Pritchard, 1992).

## **I.8 Glutatión transferasas**

Las glutatión transferasas (E.C. 2.1.5.18, GST) son una familia de enzimas cuya función principal consiste en transferir el grupo tiol del GSH a moléculas hidrofóbicas potencialmente dañinas para la célula, con el fin de hacerlas solubles en agua y luego desecharlas mediante diversas vías, tales como la ruta del ácido mercaptúrico o mediante canales especiales conocidos como bombas de GST (Barnes et al. 1959; Booth et al. 1961; Habig et al. 1974; Ishikawa, 1992). Estas enzimas son de vital importancia para la célula en organismos principalmente anaerobios como los helmintos, ya que como se mencionó anteriormente, al carecer del sistema de enzimas CYP 450 (citocromo 450), éstas se convierten en la principal defensa del parásito contra agentes xenobióticos, y se sabe que llegan a representar del 3-4% de proteína soluble total en diversos organismos, lo que indica su alto nivel de expresión y lo necesarias que son, no sólo como sistema desintoxicante, sino que se tienen reportes de que participan en diversos procesos celulares, tales como el transporte de otras moléculas, la modulación de cascadas de señalización mediante la unión a cinasas, la formación y control de canales iónicos, el catabolismo de algunos aminoácidos aromáticos así como la síntesis de moléculas como leucotrienos, prostaglandinas y flavonoides (Armstrong, 1997; Board et al. 2004; Cho et al. 2001; Dickson & Edwards, 2010; Mannervik, 1985; Yin et al. 2000).

La reacción general de catálisis de esta enzima es como sigue:



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

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

En general, las GST citosólicas son dímeros compuestas por monómeros de 23 a 28 kDa con un promedio de 220 aminoácidos. Estos pueden ser homo o heterodímeros, y cada monómero tiene un sitio catalítico con dos regiones, una de unión al GSH y otra que une al compuesto electrofílico, de tal forma que los monómeros podrían actuar independientemente, sin embargo, la enzima solo presenta actividad como dímero (Danielson & Mannervik, 1985). El dominio de unión a GSH está localizado en la porción amino terminal y se encuentra conservada en todas las clases, presenta una estructura similar a la de la tiorredoxina compuesta de tres hélices alfa y cuatro hojas beta en un arreglo  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  en donde el núcleo del dominio se conforma por el motivo  $\beta\alpha\beta$ , relacionado con la unión a cisteínas, el motivo  $\beta\beta\alpha$  se relaciona con el reconocimiento y la unión a la porción  $\gamma$ -glutamyl del GSH (Fig. 4). Por otro lado, los residuos de aminoácidos de la hélice  $\alpha_3$  en conjunto con los de la hoja  $\beta_4$  utilizan el grupo hidroxilo de la serina (clase theta), tirosina (clases mu, sigma, pi) o un coordinado entre tirosina y arginina (clase alpha) para realizar la activación del grupo sulfhidril de la cisteína del GSH. En promedio este dominio se compone de 80 residuos de aminoácidos y está muy conservado dentro de la familia de las GST. El segundo dominio, que se une a los sustratos hidrofóbicos y por eso es llamado sitio H, se encuentra en la región carboxilo terminal, y se compone exclusivamente de hélices alfa que pueden ir en número desde 4 en la clase pi, hasta 7 en la clase omega; este dominio tiene de 87 a 210 residuos de aminoácidos, que son los que marcan las diferencias entre las afinidades por los sustratos y las interacciones que se pueden generar en las diferentes clases de GST. Además de esta topología general, algunas clases de GST poseen estructuras distintivas que ayudan a su identificación, tal es el caso del lazo extra localizado entre la hélice  $\alpha_2$  y la hoja  $\beta_2$  en el dominio G en la clase mu, o la hélice extra  $\alpha_9$  en el dominio H de la clase alpha; las cuales se piensa que sirven para mejorar la estabilidad de la proteína como dímero (Armstrong, 1997; Eaton & Bammler, 1999; Hayes et al. 2005; Sheehan et al. 2001; Wilce & Parker, 1994).

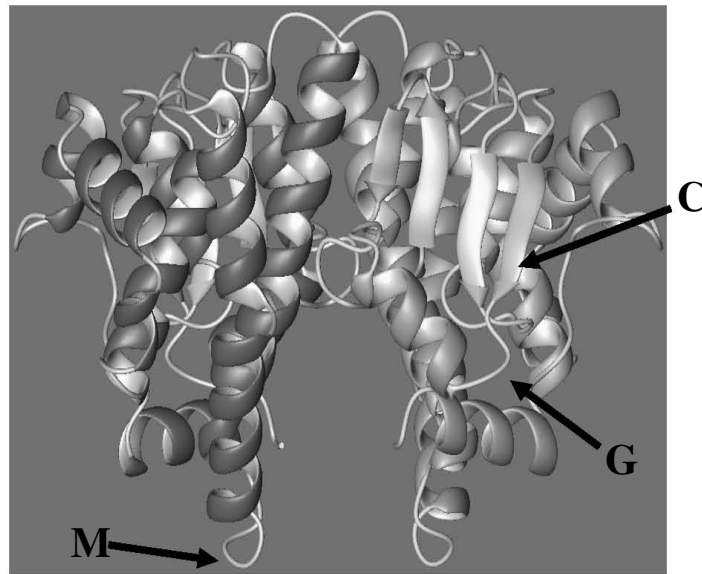


Fig. 4.- Modelo tridimensional de una GST de tipo mu en su forma dimérica, mostrando los sitios activos de unión a GSH (G), reconocimiento del compuesto electrofílico (C) y el característico lazo mu (M). Tomado de Sheehan et al. 2001.

Es común también nombrar a las GST según el peso molecular de sus monómeros y la especie animal a la que pertenecen; por ejemplo, para el caso de los helmintos se han reportado GSTs en nemátodos como *Heligmosomoides polygirus* de 23 y 24 kDa, que parecen ajustarse a la clase alpha; mientras que *Onchocerca volvulus* tiene una forma de 24 kDa con dos isoformas, que pueden asociarse a la clase pi (Brophy et al. 1994; Salinas et al. 1994). También se han hallado GST en *Onchocerca gutturosa*, *Toxocara canis*, *Cooperia onchopora* entre otros (Pemberton & Barret, 1989; Brophy & Barret, 1990); en tremátodos se sabe que *Fasciola hepatica* presenta una GST de 26 y otra de 26.5 kDa, ambas parecidas a la clase mu de mamíferos y que cuatro de las especies del género *Schistosoma* (*S. bovis*, *S. haematobium*, *S. japonicum* y *S. mansoni*) presentan una forma de 26 y otra de 28 kDa, cada una con isoformas que abarcan las clases alpha, mu y pi (O'leary et al. 1992). En el caso de cestodos, *Echinococcus granulosus* presenta una GST de 24 kDa, mientras que *E. multilocularis* presenta una de 25.5kDa, ambas relacionadas con la clase mu, *Moniezia expansa* tiene una forma de 24.5 kDa que se parece a las clases mu y alpha (Brophy et al. 1989), y en *T. solium* se han reportado tres GST de ~24, 25.5 y 26.5 kDa, que se ubican en las clases sigma, mu y alpha respectivamente (Nguyen et al. 2010; Plancarte et al. 2004; Torres-Rivera & Landa, 2008; Vibanco-Pérez & Landa, 1999; Vibanco-Pérez et al. 2002).

Sin embargo, no existe aún una clasificación distintiva y definitiva para GST en helmintos, sino que se les relaciona con alguna de las clases propuestas para mamíferos, lo que en muchas ocasiones resulta insuficiente; por ejemplo, la GST de *M. expansa* (Brophy et al. 1989) se relaciona tanto a la clase mu como la clase alpha, sin ubicarse por completo en ninguna de las dos; en *S. mansoni*, la forma de 28 kDa así como la de 26 kDa en *S. japonicum* presentan características entre las clases mu, pi y alpha (Walter et al. 1993). En *T. solium* se ha determinado que la GST de 26.5 kDa posee características intermedias entre las clases alpha, mu y pi (Torres-Rivera & Landa, 2008a). Debido a esto, diversos investigadores han propuesto la creación de nuevas clases de GST (Torres-Rivera y Landa, 2008b) o incluso la creación de un nuevo esquema de clasificación para estas enzimas, si no para todos los parásitos, al menos sí para helmintos (Clark, 1989; Vibanco-Pérez & Landa, 1998).



En estos organismos, las GST han sido reportadas localizadas en diversas zonas dentro del parásito, como por ejemplo las GST de *E. granulosus* ha sido reportada en el parénquima (Fernandez & Hormaeche, 1994), mientras que en *O. volvulus* se le encontró en la hipodermis y las paredes del receptáculo seminal (Salinas et al. 1994). Liu y colaboradores (1996) encontraron que en *S. mansoni* la enzima se localiza en el tegumento, células protonefridiales, células subtegumentales del parénquima, epitelio esofageal, genitales y células germinales. En *T. solium*, la enzima GST fue localizada en el tegumento y en los citones subtegumentales (Vibanco-Pérez, 2000).

Por otro lado, muchas GST son en realidad un conjunto de isoenzimas (Mannervik, 1985) con características y pesos moleculares muy similares entre sí, pero que difieren por lo general en su punto isoeléctrico (Dierickx, 1985; Nguyen et al. 2010), lo cual expande en gran medida el universo de posibilidades al considerar hacer una clasificación de estas enzimas a la vez que abre las posibilidades a nuevos estudios que se enfoquen en conocer si estas enzimas tienen las mismas funciones fisiológicas, o cumplen diferentes papeles dentro de las células. Recientemente Nguyen y colaboradores (2010) reportaron la presencia de 6 isoformas de GST25, 4 isoformas de GST26 y otras 4 isoformas de GST clase sigma en cisticercos de *T. solium*.

Las glutatión transferasas son el principal componente del sistema de protección de *T. solium* frente a moléculas xenobióticas, debido en gran medida a la versatilidad que poseen para conjugar compuestos citotóxicos, pero también porque se ha demostrado que estas moléculas son capaces de desempeñar diferentes funciones vitales dentro de la célula. Estudios previos demuestran que en modelos experimentales murinos, ensayos de vacunación con estas proteínas logran conferir hasta un 90% de protección contra la cisticercosis *in vitro* (Vibanco-Pérez, 2000), por lo que el entendimiento y la caracterización de estas enzimas a través de sus recombinantes y de modelos que puedan ser controlados y replicados en el laboratorio, son herramientas de vital importancia para el desarrollo inteligente y dirigido de fármacos y vacunas que permitan controlar o terminar con las enfermedades que este parásito provoca, sin afectar a sus hospederos.

## II. Objetivo general

Caracterizar la GST de 25.5 kDa recombinante (rTsGST25.5) de *Taenia solium* a través de cambios en su estructura secundaria en diferentes condiciones (pH, temperatura, presencia de Hidroperóxido de Cumeno [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]), su localización dentro del parásito, y su expresión en respuesta a agentes oxidantes.

## III. Objetivos particulares

- Determinar cambios de estructura secundaria en la rGST25.5 de *T. solium* a través de ensayos de dicroísmo circular cuando la enzima es expuesta a diferentes condiciones del medio (temperatura, pH).
- Determinar el efecto de un agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre la estructura secundaria de la enzima.
- Producir anticuerpos específicos contra rTsGST25.
- Localizar a la enzima en larvas de *T. solium* a través del ensayo de inmunofluorescencia indirecta.
- Determinar la expresión de la GST25 a nivel de proteína y de mRNA, en condiciones de estrés oxidante, dentro de un modelo murino.
- Determinar isoformas de la enzima GST25.5 de *T. crassiceps* cepa WFU en geles de 2-D.

#### IV. Antecedentes

El estudio de la GST en *T. solium*, ha sido referido previamente por Vibanco-Pérez y colaboradores (1999) en donde se evaluó la enzima como una fracción (SGSTF) y se determinó que tal fracción tenía una actividad enzimática de 2.8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  y una actividad de glutatión peroxidada independiente de selenio de 0.22  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ . La caracterización de esta fracción determinó su cercanía con la clase mu en mamíferos, mientras que la separación por medio de geles y medición de la actividad determinaron que tal fracción se encontraba formada principalmente por una banda de alrededor de 26 kDa y una menor de 25 kDa. Estudios inmunohistoquímicos indicaron que la enzima se encuentra presente en el tegumento, parénquima y citones tegumentales y protonefridiales del metacéstodo de *T. solium*. Los anticuerpos generados mostraron reacciones cruzadas con *T. saginata*, *T. taeniformis* y *T. crassiceps*, pero no reaccionaron con GST provenientes de *Schistosoma mansoni*, ni tejido proveniente del hígado de ratón, conejo o cerdo; la inmunización de ratones contra esta fracción redujo la carga parasitaria hasta en un 74%.

Torres-Rivera (2008a) determinó las propiedades cinéticas para la proteína recombinante GST de 26 kDa, la cual por su secuencia primaria se relacionaba con la clase mu, pero sus parámetros cinéticos con el sustrato universal 1-Cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) ( $V_{\text{max}}=51.5 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ ;  $K_m=1.06 \text{ mM}$ ;  $k_{\text{cat}}=22.2 \text{ s}^{-1}$ ) son mas cercanos a la clase alpha, mientras que ensayos con sustratos e inhibidores confirmaron sus características híbridas. También describió el comportamiento de cooperatividad positiva para esta enzima ( $h= 1.46$ ) corroborado por fluorometría. Estudios de inhibición con antihelmínticos revelaron que la enzima es sensible al mebendazol con un patrón de inhibición no competitivo y el modelo tridimensional generado en el trabajo permitió proponer una nueva clase de GST para esta enzima, demonizada ypsilon.

Respecto a la GST de 25.5 kDa (TsGST25.5), Vibanco en su tesis doctoral (2000) clonó el gen que la expresa, y determinó que es un gen de copia única, con el cual produjo una enzima recombinante (rTsGST25.5) en un sistema bacteriano, se determinó su actividad específica, la actividad con marcadores de clase y la sensibilidad a sustratos e inhibidores clásicos, lo que estableció su semejanza con las GST de clase mu de mamíferos; también se evaluó el nivel de protección que ofrece tanto en fracción como individualmente y concluyó que por sí sola no ofrece un buen nivel de protección (sólo 24% de reducción de carga parasitaria).

En otro trabajo (Roldán, 2008) se determinaron sus parámetros cinéticos de esta misma enzima tanto con el CDBN (actividad específica= 2.81U/mol;  $V_{\text{max}}=12.04 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ ;  $K_m=1.38 \text{ mM}$ ;  $k_{\text{cat}}=5.11 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m=4.24 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) como para el GSH ( $V_{\text{max}}=10.2 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ ;  $K_m=0.905 \text{ mM}$ ); las condiciones de pH (8.0) y temperatura (40°C) óptimas para su actividad, así como su punto isoeléctrico teórico (pH= 6.12). También se determinó que la curva que describe la actividad es de tipo Michaelis-Menten, sin algún tipo de cooperatividad evidente. En este trabajo, se reportan los cambios en la estructura secundaria de la proteína recombinante en condiciones de estrés por temperatura, acidez del medio y en presencia de un agente oxidante, así como los cambios en la expresión dentro de un modelo murino a nivel de proteína y de mRNA. Se produjeron anticuerpos específicos contra la enzima con los cuales se localizó dentro del cisticercos y se realizó la determinación del número de isoformas de GST presentes en *T. crassiceps*.

## V. Materiales y metodologías

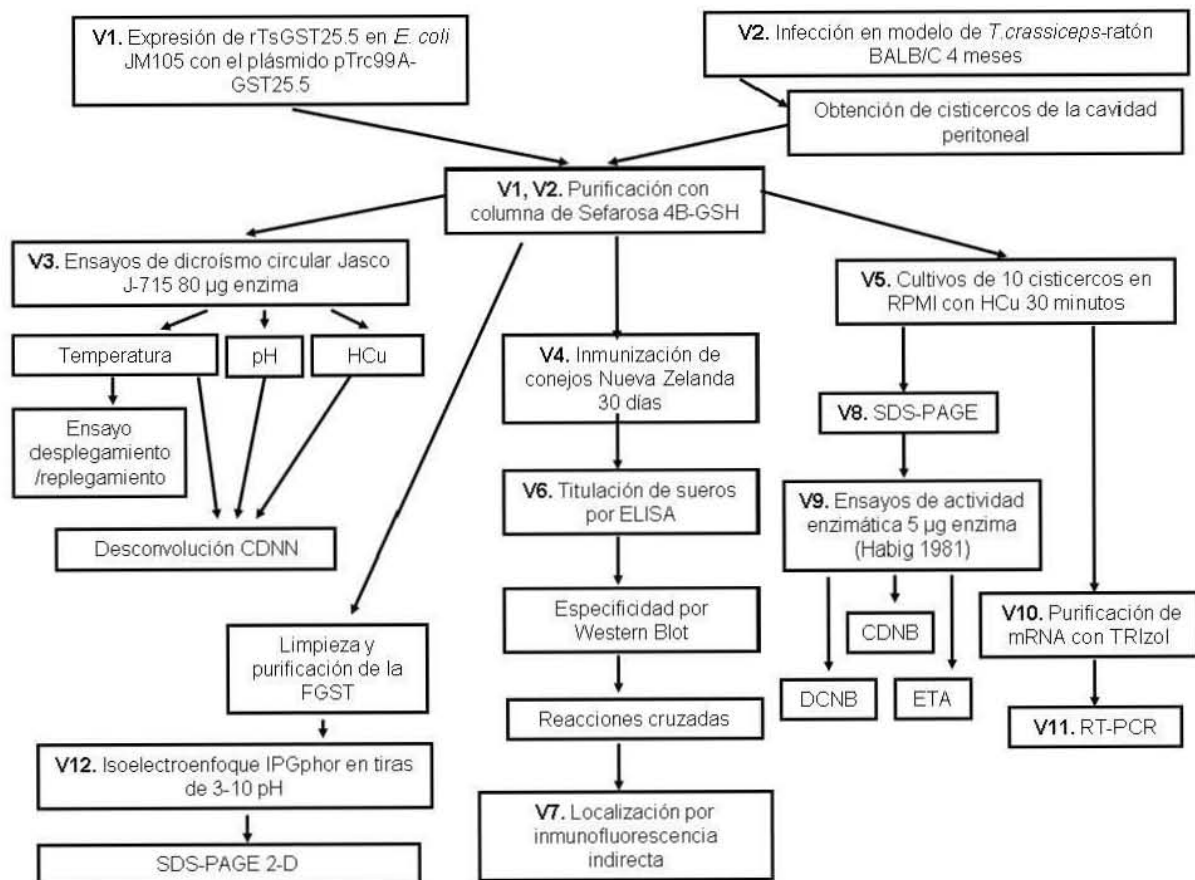


Fig. 5.- Mapa resumen de las técnicas utilizadas durante el desarrollo del trabajo y su correspondiente localización.

### V.1 Expresión y purificación de la enzima recombinante

La rTsGST25.5 fue obtenida mediante la expresión de una clona de *Escherichia coli*, cepa JM105 (thi, rpsL, sbcB15, hsdR4, supE, (lac-proAB,)/F' [traD36, proAB+, lacIq, lacZΔM15], de la casa Invitrogen) que contiene la construcción pTrc99A-GST25.5 que codifica para esta enzima. El promotor trc (trp-lacUV5) de la construcción está regulado por lacIq (Vibanco-Pérez, 2000). Estas bacterias se crecieron en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina (10 mg/ml) en agitación a 37°C. Este precultivo se transfirió entonces a 500 ml de medio LB/Amp y se dejó crecer hasta alcanzar una  $OD_{600nm}=0.4$  para entonces adicionar IPTG a 2mM para inducir la expresión de la enzima recombinante. El cultivo se dejó crecer durante 8 horas y se recolectaron las bacterias por centrifugación a 1,200g. El precipitado de bacterias fue suspendido en un amortiguador de extracción (PBS, 10% Tritón, 2.5 mM EDTA, 0.006% PMSF, pH 7.4) y lisado con un Polytron (mod. VC130PB, Brinkman Instruments) a máxima velocidad durante un minuto, para luego dejar reposar otros dos minutos en hielo; se repitió este último paso en tres ocasiones. La suspensión obtenida se centrifugó a 10,000 g a 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante recuperado se diluyó 1:2 v/v con amortiguador de columna (PBS, 1% Tritón, pH 7.4), y se filtró con membranas Millipore con poro de 0.22 µm. Posteriormente, 10 ml de este sobrenadante fueron incubados en una columna con 2 gr de Sefarosa 4B acoplada a GSH (GE Healthcare), durante una hora a temperatura ambiente y agitación lenta a fin de optimizar la unión de la enzima a la matriz; se

equilibró previamente la columna con 8 ml del amortiguador de columna. Terminado el tiempo, se montó la columna y se hizo pasar el resto del sobrenadante con un volumen ajustado de salida a 1ml/min. Posteriormente la columna fue lavada con 5 volúmenes de PBS pH 7.4 a fin de eliminar el material unido inespecíficamente y la enzima se recuperó eluyendo con una solución 5 mM GSH en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Las fracciones colectadas se midieron espectrofotométricamente (Ultrospec 3100-pro, Amersham) a 280 nm, las fracciones que contenían a la enzima se mezclaron llevándolas a un volumen final de 2 ml. La concentración de la proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) y se guardó en alícuotas de 200  $\mu$ l (1.1 mg/ml) almacenándola a -20°C hasta su uso.

## **V.2 Purificación de GST a partir de cisticercos**

Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos a partir de infecciones de 4-5 meses en ratones de la cepa BALB/c obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, infectados intraperitonealmente con 20 cisticercos de la cepa WFU. Para la infección, se eligieron cisticercos de no más de 2 mm de diámetro, sin gemas y que no presentaran calcificación. Después de aproximadamente 12 semanas de infección, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajeron los cisticercos alojados en el peritoneo. Se utilizaron 5 gr de estos cisticercos para purificar su GST y se siguió la metodología mencionada en el punto anterior (**V.1 Expresión y purificación de la enzima recombinante**, a partir del lisado de las células), para la extracción de las enzimas nativas.

## **V.3 Ensayos de Dicroísmo Circular**

Los experimentos fueron realizados en un espectropolarímetro (Jasco J-715) en los que se utilizaron 80  $\mu$ g de enzima recombinante para cada ensayo en un amortiguador de fosfatos 10 mM, a fin de que la solución que sirve de amortiguador no generase fondo en la lectura de las muestras (Greenfield, 1996). Los ensayos fueron realizados al ajustar la temperatura, acidez del medio o concentración de HCu y tomando mediciones en el intervalo 190-250 nm en una celda de cuarzo con capacidad de 400  $\mu$ l; en ocasiones hubo que detener el ensayo cuando las condiciones del propio aparato así lo requirieron. Se utilizaron intervalos de 10-60°C, 6.5-8.5 pH y 0-2mM de HCu para los ensayos. Como control negativo se utilizaron 400  $\mu$ l del amortiguador sin enzima, y como control positivo, la proteína recombinante GST de 26.5 kDa (rTSGST26.5). A cada una de estas gráficas se le realizó un análisis de desconvolución mediante el software CDNN CD spectra deconvolution software (Applied Phothophysics).

El ensayo de desplegamiento/replegamiento de la rTsGST25.5 se realizó al ajustar el aparato a una longitud de onda (207 nm) y colocando 200  $\mu$ g de enzima en la celda a un pH óptimo para la enzima fijado en 8; la temperatura inicial se fijó en 20°C y se programó un incremento de 1°C/min en el que se tomaron mediciones cada 3 segundos hasta llegar a 70°C. Posteriormente, se devolvió esa misma muestra de 70°C a los 20°C iniciales. Los datos fueron colectados y graficados en el programa OriginPro 7 (OriginLab Corporation). Los ensayos de actividad enzimática se realizaron conforme al método de Habig (1981) que se describe en la sección V.9.

## **V.4 Producción de anticuerpos policlonales contra GST**

Se inmunizaron 6 conejos de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente dos meses de edad con 200  $\mu$ g de la proteína rTsGST25.5 diluidos en PBS y mezclados v/v con adyuvante Completo de Freund para la primera inmunización e incompleto para las inmunizaciones

subsecuentes; se inmunizaron los conejos en 3 ocasiones a los tiempos de 0, 15 y 30 días. Después de la segunda inmunización se sangró a los conejos para determinar si se produjo el anticuerpo anti-GST25.5 mediante ELISA, después de la tercera inmunización se sangró al conejo mediante punción cardiaca. El suero sanguíneo se obtuvo mediante centrifugación después de la coagulación de la sangre, se hicieron alícuotas de este y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , nombrándolos sueros 1 al 6.

Para purificar los anticuerpos  $\alpha$ -rTsGST25.5, se utilizó una columna de proteína A acoplada a sefarosa 4B. Se diluyó el suero 1:1 con amortiguador de fosfato de sodio 0.02 M, pH 7.0 y se paso a través de la columna. Después la columna se lavó con el mismo amortiguador en tres ocasiones y se eluyeron las inmunoglobulinas unidas con 5 ml de una solución de glicina 0.1 M pH 3.0, para ser inmediatamente neutralizadas con 5 ml de Tris-HCl 1 M pH 9.0. Las IgGs así obtenidas se dializan contra PBS, para luego liofilizarse y reconstituirse en PBS para ser almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. Además se utilizaron sueros elaborados en conejo contra proteínas GST comerciales (Glutación transferasas M1-1 Isozyme, A1-1 Isozyme y P1-1 Isozyme de humano, GST de 26 kDa de *Schistosoma mansoni* [SmGST] de la casa comercial Sigma) y de la rTsGST26.5, previamente elaborados en el laboratorio (Torres-Rivera 2008a).

## V.5 Cultivos de cisticercos

Se utilizaron cisticercos obtenidos de la infección del modelo *T. crassiceps*-ratón, se eligieron 10 cisticercos por ensayo con las siguientes características: forma ovalada, sin gemas ni signos de calcificación y sin evaginar, de alrededor de 0.5 cm de diámetro. Estos cisticercos fueron colocados en pozos de placas para ELISA a los cuales se añadió 1 ml de medio RMPI suplementado con diferentes concentraciones de hidroperóxido de cumeno (0, 0.25, 0.5 1 y 2 mM). Se dejó incubar en estas condiciones por 30 minutos y se procedió a purificar la fracción de GST (FGST) homogeneizando los cultivos y haciéndolos pasar a través de una columna de afinidad acoplada a GSH, con el mismo método que para proteínas recombinantes.

## V.6 Ensayos de ELISA y Western Blot

Los sueros (1 al 6) obtenidos de los conejos fueron titulados por el método de ELISA, con placas de 96 pozos (Maxisorp de NUNC) en donde fue pegado 1  $\mu\text{g}$  de rTsGST25.5 por cada pozo, en una dilución con amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Las placas se incubaron durante a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche; se lavó las placas en 5 ocasiones con 200  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween 0.05% y se bloquearon con 100  $\mu\text{l}$  de BSA al 1% en PBS-Tween 0.05% durante 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Las placas se lavaron de nuevo como se indica antes y luego se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de los sueros y controles positivos y negativos diluidos 1:100, para después hacer diluciones secuenciales hasta 1:12,800. Las placas se incuban de 1 a 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , se lavan y se les adiciona el segundo anticuerpo ( $\alpha$ -IgG de Conejo Peroxidado) en dilución 1:2,000 en PBS-Tween 0.05%; se incuba una hora más a  $37^{\circ}\text{C}$  y se lava, para después adicionar 100  $\mu\text{l}$  de solución sustrato (ácido cítrico 0.1 M, fosfato de sodio 0.2 M) con ortofenilendiamina disuelta en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se incubó la reacción entre 5 y 30 min y se detuvo con una solución  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1 M. La lectura se realizó en un Multiskan ASCENT Thermo (Accesolab) a 492 nm.

Los ensayos de Western Blot se realizaron al transferir las proteínas de interés (rTsGST25.5, rTsGST26.5, SmGST, GSTs A1-1, M1-1, P1-1) a membranas de nitrocelulosa (Hybond), utilizando geles SDS-PAGE con cantidades de 500 ng/mm proteína en una cámara húmeda Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) en un medio de transferencia

(25mM Tris, 192 mM glicina y 20% v/v de etanol, pH 8.3) a 100V durante 1 hora; después de lo cual se cortaron tiras de 2-3 mm que se pusieron a incubar con el suero o anticuerpo de interés diluido 1:1,000 en una solución de PBS-BSA 1%-Tween 0.3% durante una hora. Transcurrido el tiempo, las tiras se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.3% durante 5 minutos cada vez, para después incubarlas con el segundo anticuerpo ( $\alpha$ -IgG de Conejo Peroxidado) en dilución 1:2,000 en PBS-Tween 0.3% durante 1 hr. Las tiras se lavaron nuevamente con PBS-Tween 0.3% en tres ocasiones durante 5 minutos y una vez más con PBS pH 7.4, para después añadir 1 ml de solución de revelado (0.01 gr de diaminobencidina y 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 50 ml de PBS), hasta visualizar las bandas, después de lo cual se detuvo la reacción con agua destilada.

Cada proteína utilizada fue probada contra el suero preinmune, los sueros con los anticuerpos generados por los conejos contra sí misma y contra las demás, para evaluar si existían reacciones cruzadas entre una o varias de ellas.

## **V.7 Inmunolocalización**

Una vez determinado el título y la especificidad del anticuerpo, se procedió a la localización de la proteína en el cisticercos por técnica de inmunofluorescencia indirecta, para lo cual se obtuvieron por disección los cisticercos de *T. solium* a partir de carne de cerdo infectada, se lavaron con PBS y fueron incluidos en Tissue-Tek (Miles Labs.) e inmediatamente congelados y almacenados a -70°C; se realizaron cortes de entre 6-8  $\mu$ m en un crióstato (Cryo-cut, Americal Optical Corp.) y fueron fijados en acetona durante 10 min. Los cortes se incubaron en una cámara húmeda durante toda una noche a 4°C con el anticuerpo  $\alpha$ -rGST25.5 diluido en PBS con una solución de BSA al 1% y Tween 20 al 0.05%. Los cortes se lavaron en 4 ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.05% para después incubarlos durante una hora con un segundo anticuerpo  $\alpha$ -IgG de conejo conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, Sigma) diluido 1:50 en PBS-BSA 1%, Tween 20 0.05%. Los cortes fueron lavados nuevamente y montados en una solución 9:1 de glicerol-PBS para ser observados y fotografiados en un microscopio con sistema de epifluorescencia (Nikon Optiphot). Como control negativo se utilizaron cortes incubados con suero normal de conejo como primer anticuerpo.

## **V.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)**

Se utilizaron 3  $\mu$ g de proteínas recombinantes (rTsGST25.5 y rTsGST26.5) o fracción GST (FGST) obtenida de cultivos de cisticercos de *T. crassiceps* sometidos a diferentes concentraciones del oxidante hidróperóxido de cumeno (0, 0.25, 0.5 y 2 mM). Estas muestras se mezclaron 1:1 (v/v) con amortiguador de Laemmli 2X (SDS 3%, Tris HCl 62.5 mM, 5% 2 $\beta$ mercaptoetanol, pH 6.8) y se hirvieron durante 1 min. Las muestras fueron separadas en los geles al 12.5% durante 1 hr a 100V y posteriormente los geles fueron teñidos con una solución de azul brillante de Coomassie al 0.1% y desteñidos con ácido acético al 10%, hasta conseguir la visualización clara de las bandas.

## **V.9 Ensayos de actividad enzimática**

Los ensayos de actividad para la rTsGST25.5 y FGST fueron realizados de acuerdo al método de Habig (1981) con algunas modificaciones. Brevemente, 5  $\mu$ g de enzima fueron añadidos a una solución (amortiguador de fosfatos 100 mM, 1 mM EDTA, glutatión reducido a concentraciones variables) a temperatura de 25°C y la reacción fue comenzada cuando se añadió el agente oxidante deseado según la Tabla 1.

Substrato	Segundo substrato (mM)	pH	GSH (mM)	Longitud de onda (nm)	Coefficiente de extinción (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno	1	6.5	1	340	9.5
1,2-dicloro-4-nitrobenzeno	1	7.5	5	345	8.5
Acido etacrínico	0.2	6.5	0.25	270	5.0

Tabla 1.- Diferentes condiciones experimentales utilizadas para probar sustratos utilizados comúnmente para la determinación de clases en GST.

La reacción fue seguida inmediatamente después de la adición del oxidante en un espectrofotómetro (Ultrospec 3100 pro) durante 3 minutos; la actividad específica fue

$$\text{Act} = V \left( \frac{A_2 - A_1}{\Delta \varepsilon (t_2 - t_1) (l)(w)} \right)$$

calculada según la fórmula en donde V es el volumen total de la reacción (ml), A2 y A1 son las absorbancias a los tiempos final e inicial  $t_2$  y  $t_1$  respectivamente,  $\Delta \varepsilon$  es el coeficiente de extinción del sustrato (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>),  $l$  es la longitud de la celda (cm) y w es la cantidad de proteína utilizada en el ensayo. El ensayo control consistió en la mezcla de reacción sin la enzima a la que se añade el CDNB.

### V.10 Purificación de mRNA

De los cisticercos de *T. crassiceps* cultivados con HCu, se obtuvo el RNA total utilizando 1 ml de TRIzol (GibCo). Los cisticercos fueron disgregados con la ayuda de un Polytron a máxima velocidad en intervalos de 1 min de actividad por 2 minutos de reposo en hielo. Una vez homogeneizada la muestra, se centrifuga durante 15 min a 10,000 g y 4°C; al sobrenadante se le adicionan 200 µl de cloroformo/ml de TRIzol. Se agita vigorosamente esta mezcla y se deja reposar 3 min a temperatura ambiente, para luego centrifugar a 10,000 g durante 15 min a 4°C. Se recupera la fase acuosa (incolores) y se desecha la fase orgánica. Esta operación se repite 3 veces. Posteriormente, se añaden 0.5 ml de alcohol isopropílico/ml de TRIzol y se deja incubar la muestra por 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 10,000 g por 10 min a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se lava el precipitado formado con 1 ml etanol al 75%/ml de TRIzol, se mezcla con vórtex y se centrifuga a 7,500 g a 4°C por 5 min. Se retira el etanol, se deja secar en RNA y se resuspende en agua tratada con DEPC (Diethyl-piropicarbonate).

### V.11 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR)

Se utilizaron cebadores específicos que amplifican un fragmento de aproximadamente 360 pb de la GST25.5 (GST25F: 5'-ATTCCGGATTGTAAAAAGCG y GST25R: 5'-GACACGTCT TGA ACTCCTT) y de la GST26.5 (GST26F: 5'-ATGATTGCTATGGCTGAGG y GST26R: 5'-GCCGAATTCGCGATCCA), y como control la superóxido dismutasa Cu/Zn (los



cebadores SOD6: 5'-AAGCACGGCTTTCACGTCC y SOD2: 5'-CGACCACCAGCGTTNCCNGT que amplifican un fragmento de ~300 pb). Se utilizó el estuche SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) para las reacciones, y se hizo la mezcla de reacción con 8 µl del amortiguador de reacción 2X, 8 µl de agua Mili-Q, los cebadores a una concentración final de 50 pm y 0.5 µg de RNA extraído de cisticercos de *T. crassiceps* para un volumen final de ~20 µl. El programa utilizado para el RT-PCR fue: 50°C durante 30 min, a fin de permitir la conversión de RNA en DNA y luego se programaron 30 ciclos a 94°C/30s-55°C/30s-70°C/1min para la duplicación de las cadenas. Los productos de estas reacciones fueron aplicados a geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

## V.12 Isoelectroenfoque y geles de doble dimensión

A la FGST de *T. crassiceps* se le retiraron impurezas y se cuantificó mediante los kits 2-D Clean Up Kit y 2-D Quant Kit (GE Healthcare), al seguir las recomendaciones del fabricante como paso previo a someterlos al isoelectroenfoque. Se utilizaron 15 µg de FGST, los cuales fueron aplicados a tiras Immobiline DryStrip (GE Healthcare) de 11 cm de largo y con un intervalo de pH de 3 a 10. Las tiras fueron equilibradas con un amortiguador (75 mM Tris-HCl pH 8.8, Urea 6 M, Glicerol 30%, ditioneitol [DTT], SDS y azul de bromofenol como colorante) para luego ser aplicadas en un aparato de Isoelectroenfoque IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare). Las condiciones utilizadas para el isoelectroenfoque fueron: 50µA, 20°C, con 4 pasos subsecuentes de Preenfoque (300VStep-n-Hold, 200V/hr), Entrada de la muestra (1000VGrad, 300V/hr), Separación (5000VGrad, 4000 V/hr) y Afinamiento de las bandas (5000VStep-n-Hold, 1200V/hr).

Las tiras resultantes del isoelectroenfoque fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE como se describió anteriormente, y se utilizaron 3 µg de rTsGST25.5 en un carril como control; los geles resultantes fueron teñidos con azul brillante de Coomassie, desteñidos con ácido acético al 10% y otros transferidos a membranas de nitrocelulosa, para posteriormente aplicarles la técnica de Western Blot.

## VI Resultados

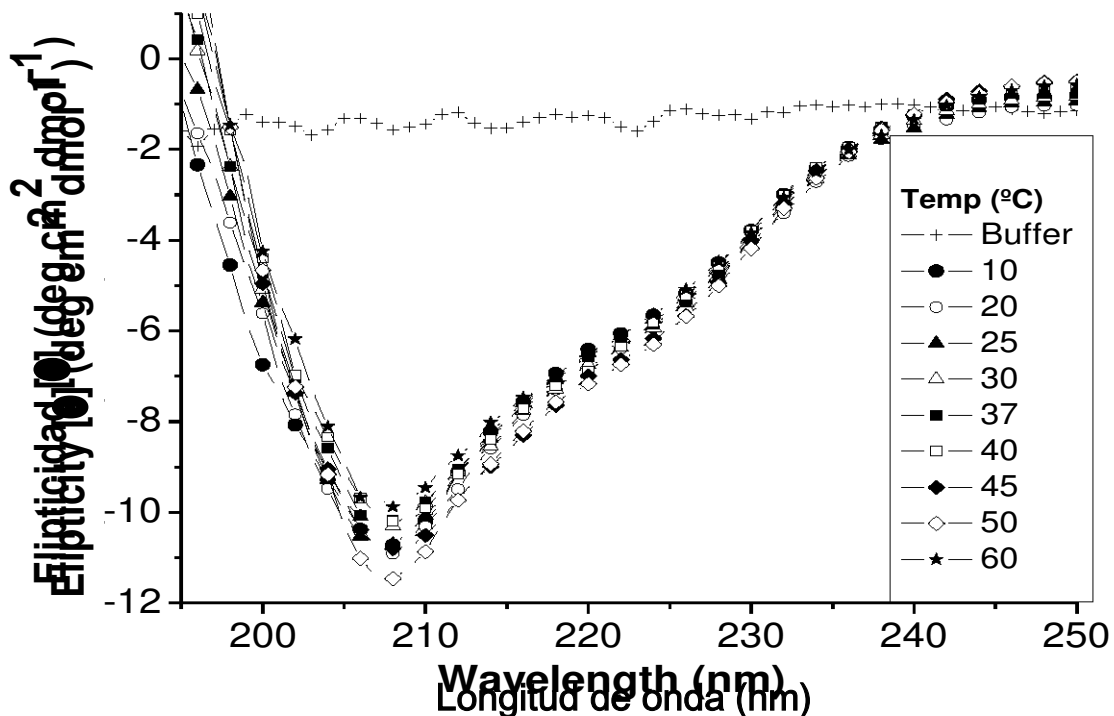
### VI.1 Ensayos de dicroísmo circular

La rTsGST25.5 presenta una serie de curvas muy pronunciadas, que abarcan el intervalo de -12 a +12 con una parte estacionaria a partir de 240 nm, un punto mínimo entre 205 y 210 nm y un máximo por debajo de 190 nm. Cuando se grafican diferentes condiciones de temperatura (Figura 5a), se observa que hay ligeras variaciones en la apertura de las curvas todas las condiciones probadas, pero siempre se conservó su forma general. El ensayo no pudo llevarse hasta el término (>180 nm) debido a condiciones propias del aparato.

Para los ensayos en donde se varió la acidez del medio (Fig. 5b), las gráficas demuestran curvas menos pronunciadas, ya que abarca el intervalo de -6 a +8 y la parte estacionaria es más amplia, que llega hasta los 220 nm; además no se observan las dos pronunciaciones encontradas en las gráficas anteriores; la excepción a este comportamiento se presenta en la gráfica correspondiente a pH de 8, la cual si describe las características antes mencionadas. Para pH de 8.5, la forma de la curva se abre y no alcanza a superar el eje de las abscisas, lo que muestra un comportamiento atípico respecto a las demás condiciones probadas.

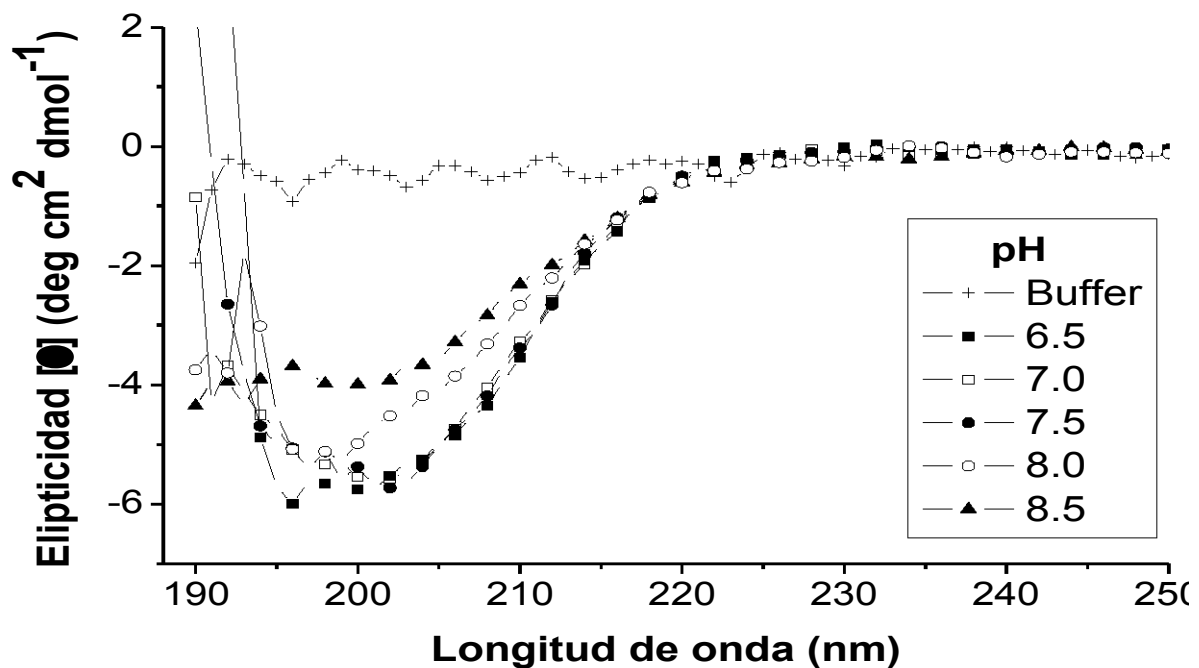
Las gráficas elaboradas a partir de exponer la proteína al efecto del oxidante HCu (Fig. 5c) presentan un rango de la gráfica abarca de -10 a 10; se observan dos picos hacia el límite inferior (225 y 210 nm), mientras que la parte estacionaria se ubica después de los 240 nm y el punto máximo, alrededor de 190 nm. Hasta los 200 nm todas las gráficas siguen en mismo patrón de comportamiento, y es a partir de este punto que las condiciones de 1 y 2 mM presentan una variación

a

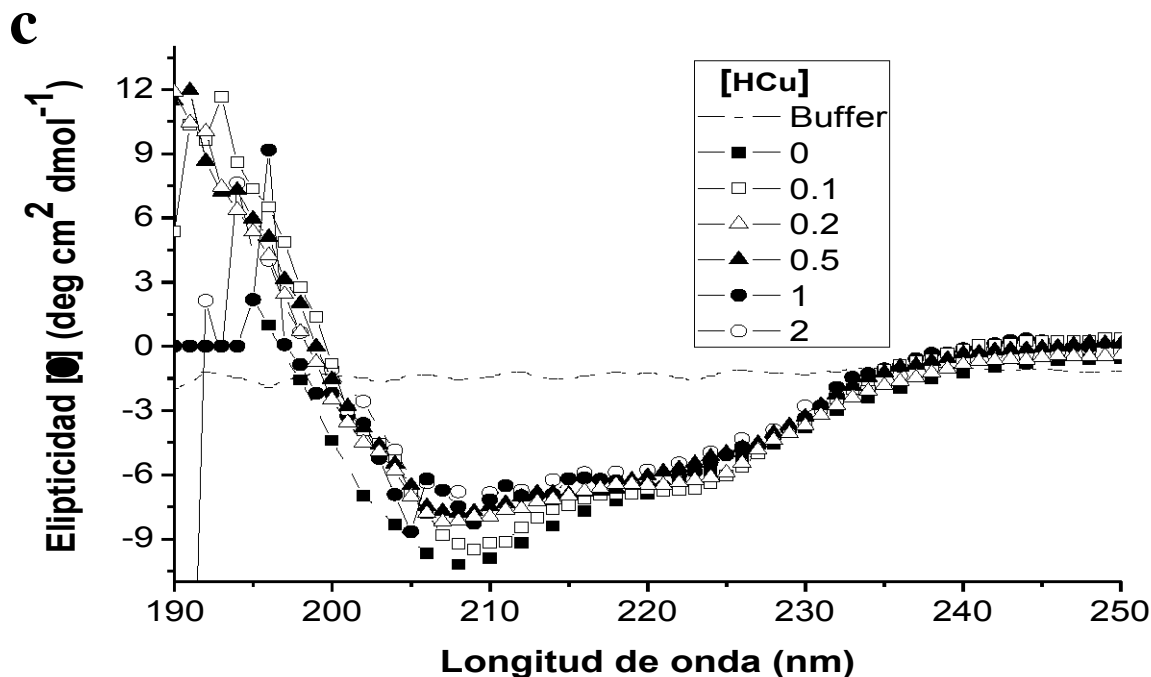


Temperatura	10°C	20°C	25°C	30°C	37°C	40°C	45°C	50°C	60°C
$\alpha$ -Hélices	27.3%	27.5%	37.1%	35.6%	33.0%	33.6%	32.2%	31.9%	27.9%
$\beta$ -Antiparalelas	20.8%	16.3%	7.2%	7.5%	8.4%	8.2%	8.6%	9.6%	15.3%
$\beta$ -Paralelas	8.0%	8.9%	8.0%	8.4%	8.8%	8.7%	9.0%	8.3%	9.0%
Giros- $\beta$	19.5%	18.6%	16.3%	16.5%	17.0%	16.9%	17.1%	17.7%	18.4%
Random coil	25.4%	27.9%	30.3%	31.4%	33.3%	32.9%	33.9%	28.9%	29.0%
<b>Suma total</b>	<b>100.9%</b>	<b>99.2%</b>	<b>98.9%</b>	<b>99.4%</b>	<b>98.9%</b>	<b>100.3%</b>	<b>100.8%</b>	<b>96.4%</b>	<b>99.6%</b>

**b**



pH	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
$\alpha$ -Hélices	15.7%	16.9%	17.9%	32.9%	15.0%
$\beta$ -Antiparalelas	14.4%	16.2%	19.3%	8.0%	14.8%
$\beta$ -Paralelas	17.7%	11.3%	10.9%	8.7%	18.3%
Giros- $\beta$	20.7%	22.1%	21.6%	16.5%	20.9%
Random coil	32.2%	34.6%	34.0%	31.8%	51.2%
<b>Suma total</b>	<b>100.7%</b>	<b>101.1%</b>	<b>103.6%</b>	<b>97.9%</b>	<b>120.2%</b>



[HCu]	0mM	0.1mM	0.2mM	0.5mM	1mM	2mM
$\alpha$ -Hélices	37.1%	34.5%	28.1%	28.3%	26.8%	26.6%
$\beta$ -Antiparalelas	7.2%	9.3%	12.3%	9.2%	10.3%	10.1%
$\beta$ -Paralelas	8.0%	8.9%	11.8%	10.6%	10.5%	10.5%
Giros- $\beta$	16.3%	16.6%	16.4%	17.6%	18.2%	18.4%
Random coil	30.3%	32.9%	32.2%	35.0%	37.9%	35.8%
<b>Suma total</b>	<b>98.9%</b>	<b>102.2%</b>	<b>100.8%</b>	<b>100.8%</b>	<b>103.7%</b>	<b>101.4%</b>

Fig. 6, Tabla 2.- Dicroísmo circular del comportamiento de la rGST25.5 a diferentes condiciones de a) temperatura, b) acidez del medio (pH) y c) presencia del oxidante hidroperóxido de cumeno (HCu). Los ensayos fueron realizados con 80  $\mu$ g de enzima en una solución de fosfato de potasio 10mM, y las mediciones fueron hechas en un espectropolarímetro Jasco J-715, intervalos de 1nm; (-+-) y (---) representan el comportamiento del buffer en ausencia de la enzima. En el eje de las abscisas se muestra la longitud de onda y en el de las ordenadas, el valor del ángulo  $\theta$ , o elipticidad. Por debajo de cada gráfica se reportan los valores aproximados de la composición de la proteína (en porcentaje) determinados por el programa CDNN (Applied Photophysics).

### VI.1.1 Despliegamiento/repliegamiento de la proteína

En la Figura 6 se presenta el ensayo de despliegamiento de la rTsGST25.5 (línea sólida) en donde se observa que hasta 50°C la enzima no parece presentar cambios de importancia en su estructura (desnaturalización). Sin embargo a temperaturas superiores, se muestra un despliegamiento gradual que corresponde con la pérdida en su actividad enzimática determinada con el sustrato universal CDNB hasta llegar al punto límite (70°C) en donde la actividad casi llega a cero. En la línea cortada, se muestra el ensayo de repliegamiento de la misma muestra en donde se puede apreciar que la gráfica no regresa a su posición original, sino que oscila entre -6.5 y -5 y que sin embargo, sigue un patrón parecido al del despliegamiento. Por debajo de la gráfica se muestra la tabla con las actividades residuales de la enzima probadas a las diferentes condiciones; se tomó como 100% el punto de actividad óptimo (40°C) y se estandarizó los demás resultados con respecto a este. Puede notarse que después del punto óptimo, la actividad decae drásticamente y que a 70°C ha

desaparecido casi por completo (8%) pero no totalmente, y sin embargo, no se recupera el nivel de la actividad original al devolver la proteína a la temperatura ideal (40°C, 10%), ni a la temperatura de inicio del experimento (20°C, 11%).

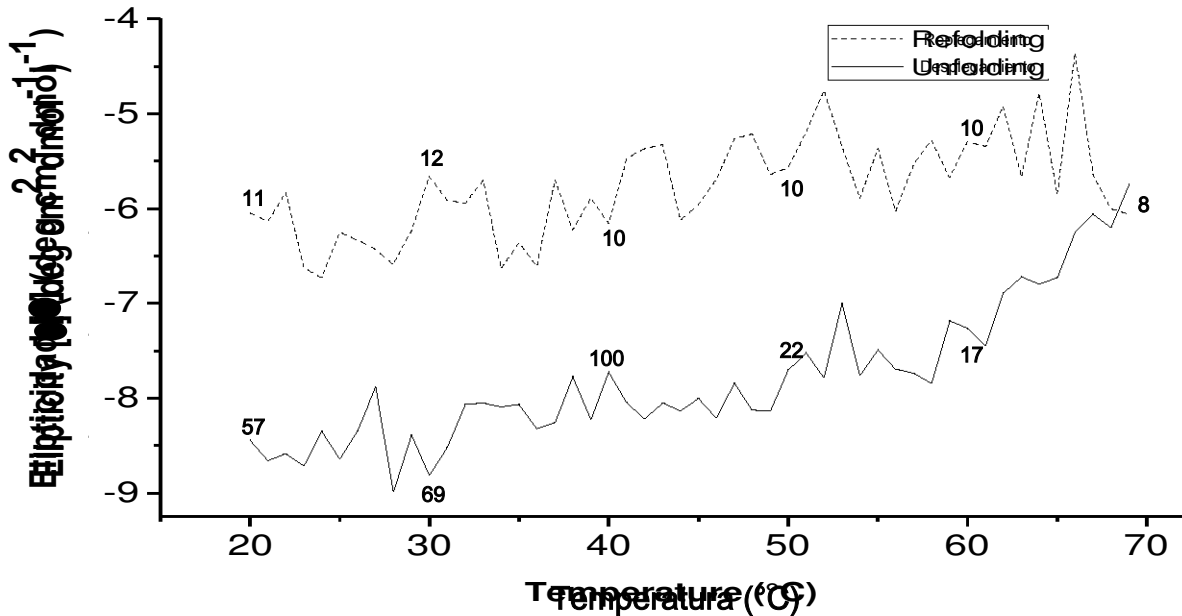
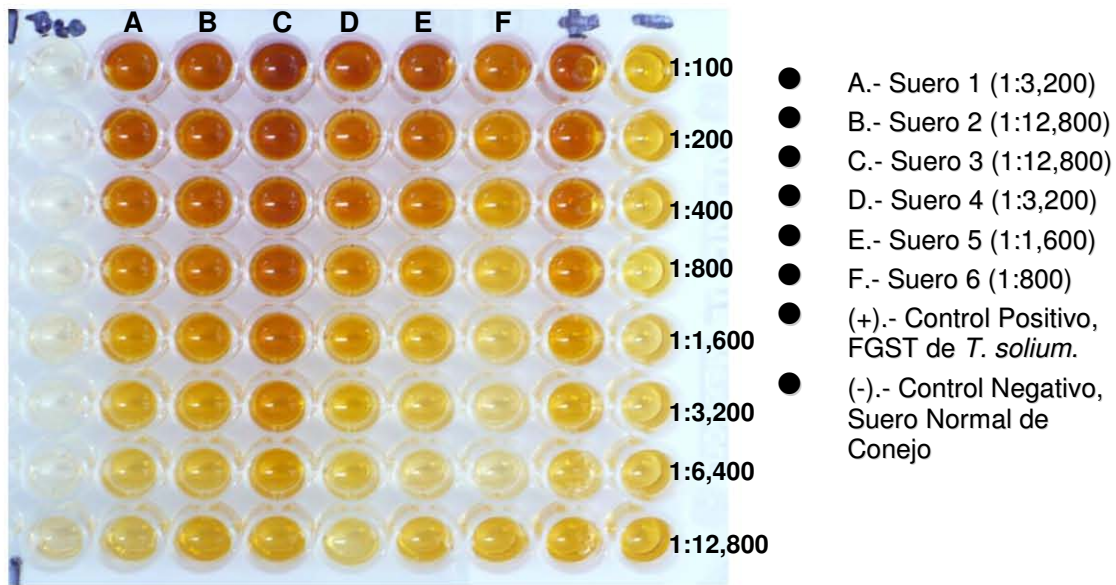


Fig. 7.- Ensayo desplegamiento/replegamiento realizado con la rTsGST25.5. La línea sólida representa el desplegamiento de la proteína, mientras que la punteada representa el replegamiento. Los números sobre las gráficas representan la actividad enzimática residual (en porcentaje) determinada con 5 µg de enzima y 1 mM de CDNB, sobre cada una de las temperaturas marcadas en el eje de las abscisas.

## VI.2 Obtención de sueros

Los sueros obtenidos de los conejos inmunizados con la rTsGST25.5 probados mediante el método de ELISA (Fig. 7a, Tabla 2); presentaron títulos de: Suero 1 (1:3,200), Suero 2 (1:12,800), Suero 3 (1:12,800), Suero 4 (1:3,200), Suero 5 (1:1,600) y Suero 6 (1:800). Los sueros fueron probados también mediante Western Blot (Fig. 7b); en dónde se confirma que los sueros 2 y 3 logran reconocer específicamente a la enzima hasta diluciones de 1:12,800, pero también reconocen ligeramente una banda alrededor de 72 kDa. El suero normal de conejo utilizado como control negativo no reconoce ninguna banda, mientras que un suero α-rTsGST26.5 reconoce a la proteína contra la que fue producido.



Dilución	Blanco	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Suero 4	Suero 5	Suero 6	Control (+)	Control (-)
1:100	0.253	5.249	4.595	5.248	5.548	4.547	4.847	6.000	1.620
1:200	0.207	4.436	4.436	4.594	4.849	4.268	3.509	6.000	1.595
1:400	0.261	4.295	4.294	4.435	4.469	4.149	2.628	5.546	1.273
1:800	0.336	3.869	4.249	4.469	4.086	3.383	<b>1.526</b>	4.400	1.221
1:1,600	0.396	2.734	3.497	4.345	3.228	<b>1.751</b>	1.058	3.573	1.140
1:3,200	0.252	<b>1.848</b>	2.259	3.361	<b>1.867</b>	1.260	0.826	2.067	1.359
1:6,400	0.271	1.241	1.396	2.800	1.304	0.897	0.584	1.607	1.336
1:12,800	0.299	1.086	<b>1.852</b>	<b>1.880</b>	0.596	1.251	1.855	2.453	1.749

Figura 8a/Tabla 3.- Absorbancias detectadas en la titulación de sueros contra rTsGST25.5 mediante ensayos de ELISA. Como segundo anticuerpo se utilizó  $\alpha$ -IgG de Conejo Peroxidado en dilución 1:2,000 y como revelador ortofenilendiamina disuelta en  $H_2O_2$ , deteniendo la reacción con  $H_2SO_4$  0.1 M. La lectura se realizó en un Multiskan ASCENT Thermo (Accesolab) a 492 nm. Como control positivo (+) se utilizó FGST de *Taenia solium*, mientras que la columna (-) contiene suero preinmune del conejo 1, como control negativo.

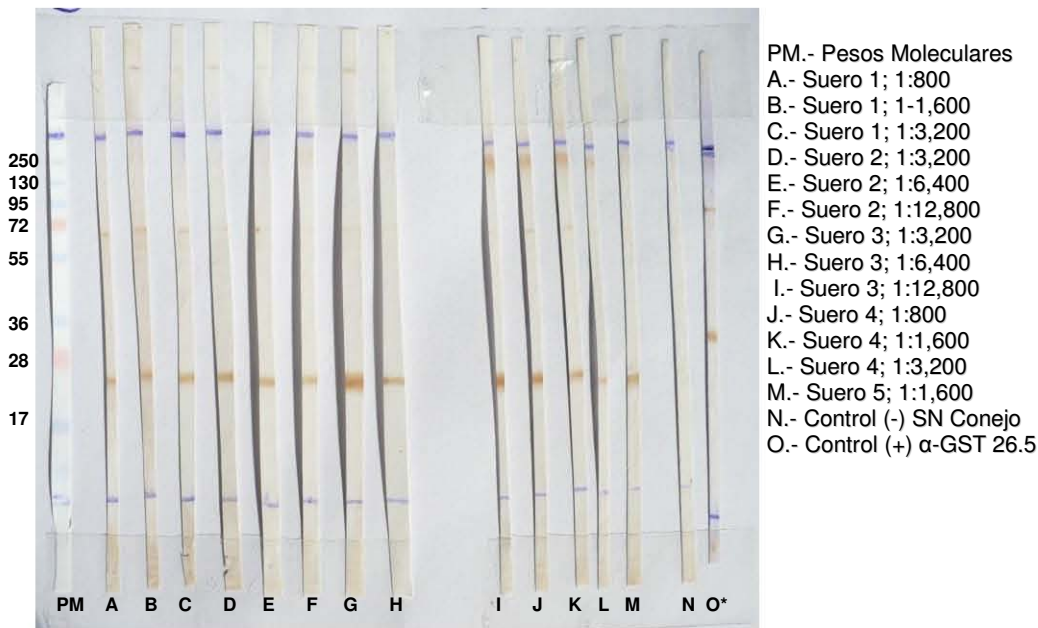


Figura 8b.- Western Blot que muestra el reconocimiento de los sueros  $\alpha$ -GST25.5 producidos. Se utilizaron 500ng/mm de proteína en transferencia,  $\alpha$ -IgG de Conejo Peroxidado en dilución 1:2,000 como segundo anticuerpo y diaminobencidina (DAB) como revelador.

### VI.2.1 Reacciones cruzadas

Los ensayos para determinar reacciones cruzadas muestran que cada suero  $\alpha$ -TsGST25.5 obtenido reconoce específicamente a la enzima, pero no reconoce a las GST

A1-1, M1-1 o P1-1 de humanos, a la rTsGST26.5 o a la SmGST (Tabla 3). Por otro lado, la rTsGST26.5 kDa no presenta reacciones cruzadas con GST de humanos, pero presenta una ligera reacción al suero de GST de *Schistosoma mansoni*.

Proteína/Suero	$\alpha$ -rTsGST25	$\alpha$ -rTsGST26	$\alpha$ -GSTA1-1	$\alpha$ -GSTM1-1	$\alpha$ -GSTP1-1	$\alpha$ -SmGST
rTsGST25	+++	-	-	-	-	-
rTsGST26	-	+++	-	-	-	+
GSTA1-1	-	-	+++	-	-	-
GSTM1-1	-	-	-	+++	-	-
GSTP1-1	-	-	-	-	+++	-
SmGST	-	-	-	-	-	+++

Tabla 4.- Reacciones cruzadas obtenidas a partir de ensayos de Western Blot al enfrentar a cada una de las GST (rTsGST25, rTsGST26, GST A1-1, M1-1, P1-1 de *Homo sapiens*; GST de 26 kDa de *Schistosoma mansoni* (SmGST) contra los antisueros obtenidos a partir de cada una. Se utilizaron 500ng/mm de proteína en transferencia,  $\alpha$ -IgG de Conejo Peroxidado en dilución 1:2,000 como segundo anticuerpo y diaminobencidina (DAB) como revelador. (-) Sin reconocimiento, (+) Reconocimiento leve, (+++) Reconocimiento fuerte.

### VI.3 Inmunofluorescencia Indirecta

Las inmunofluorescencias realizadas en cortes de cisticercos de *T. solium* ubican a la GST25.5 en el tegumento (T), en citoplasma de los citones subtegumentales (SC) y citones protonefridiales (PC) (Fig. 8b). Además en el corte incubado con IgG normal de conejo no se observa tal fluorescencia (Fig 8a).



Figura 9.- Inmunofluorescencias en cortes de cisticercos de *T. solium* para la localización de GST25.5 kDa (40X). Los cortes fueron incubados con suero normal de conejo (a) y con anticuerpo  $\alpha$ -rTsGST25 (a). Las flechas indican el tegumento (T), los citones subtegumentales (SC) y los citones protonefridiales (PC).

## VI.4 Determinación de la expresión en presencia de un agente oxidante

La determinación de la expresión de la FGST obtenida de cisticercos de *T. crassiceps* cultivados con el agente oxidante se muestra en la Figura 9; las proteínas que componen a la FGST sufren cambios en respuesta al estímulo con HCu; la GST26.5 disminuye con la concentración de 0.25 mM con respecto al control, para desaparecer a concentraciones mayores de 0.5 mM. En contraste, la GST25.5 no es afectada por el tratamiento de los cisticercos con HCu (0.25-2mM), aún a concentraciones letales observadas para los cisticercos (2mM).

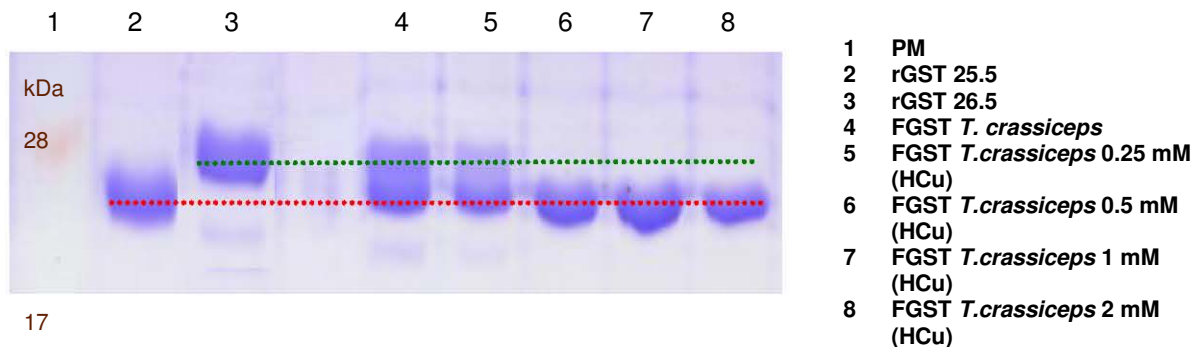


Fig. 10.- SDS-PAGE 12.5% con la fracción glutatión transferasa (FGST) obtenida de cisticercos de *T. crassiceps* expuestos a diferentes concentraciones de HCu (0.25 – 2 mM). Como control se utilizó la FGST de cisticercos cultivados sólo en medio RPMI. La tinción del gel fue realizada con azul brillante de Coomassie y se utilizaron 3 µg de enzima o fracción por carril.

### VI.4.1 Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos de la actividad determinados con el CDNB (sustrato Universal) en la FGST compuesta por las GST25.5 y GST26.5 (Fig. 10a) respaldan lo observado en la electroforesis anterior, ya que la actividad de la fracción decae a medida que aumenta la concentración del oxidante, que resultó en aproximadamente un 70% de actividad residual. Por otro lado, los ensayos de actividad en la FGST determinados con DCNB (Fig. 10b) muestran que la actividad de la FGST de cisticercos sometidos a concentraciones de HCu de 0.25 mM y superiores se incrementa con respecto al control de la rGST25.5 hasta en un 55% y se mantiene durante el resto de los ensayos, mientras que para el control de la rGST26.5 fue sólo de 24%. Por último, en los ensayos de actividad con el ETA (Fig. 10c) la actividad de la rGST26.5 es casi un 200% mayor al de la fracción, mientras que la actividad de GST25 es un 60% menor a la de la misma.



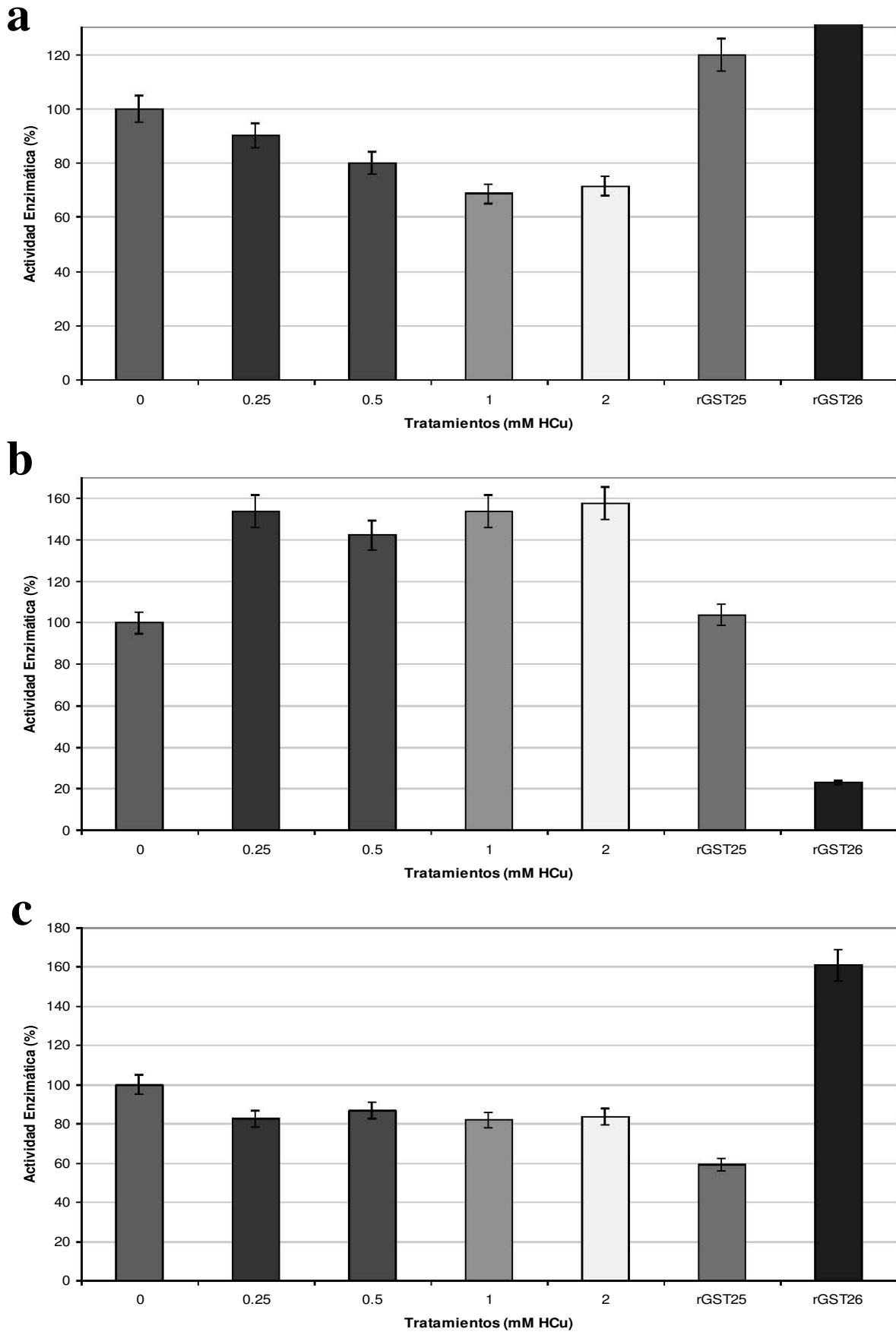


Fig. 11.- Actividad enzimática de la FGST de *T. crassiceps* obtenida de cisticercos en cultivos expuestos a diferentes concentraciones de HCu utilizando a) CDNB (sustrato universal), b) DCNB (marcador GST tipo M) y

c) ETA (Marcador GST tipo A y P). Los ensayos se realizaron con 5µg de enzima y 1mM de GSH a 25°C. Las reacciones fueron seguidas por 3 min. a 595 nm.

### VI.5 Cuantificación de la expresión por RT-PCR

La Figura 11a muestra que el mensajero del gene que codifica para la GST25.5 se encuentra presente en los cisticercos no expuestos al oxidante, disminuye en la concentración de 0.25 mM de HCu y que desaparece a concentraciones >0.5 mM, en contraste el mensajero para el gene que codifica para GST26.5 (Fig. 11b) disminuye su expresión después de 0.25mM de HCu, se mantiene en 1mM y desaparece a 2 mM. El mRNA para el gene control utilizado (SODCu/Zn) se mantuvo presente en todos los cisticercos incubados a las concentraciones probadas de HCu. Cabe mencionar que los cisticercos tratados con el oxidante, disminuyen ligeramente sus mensajeros con respecto a los cisticercos controles (Fig 11c).

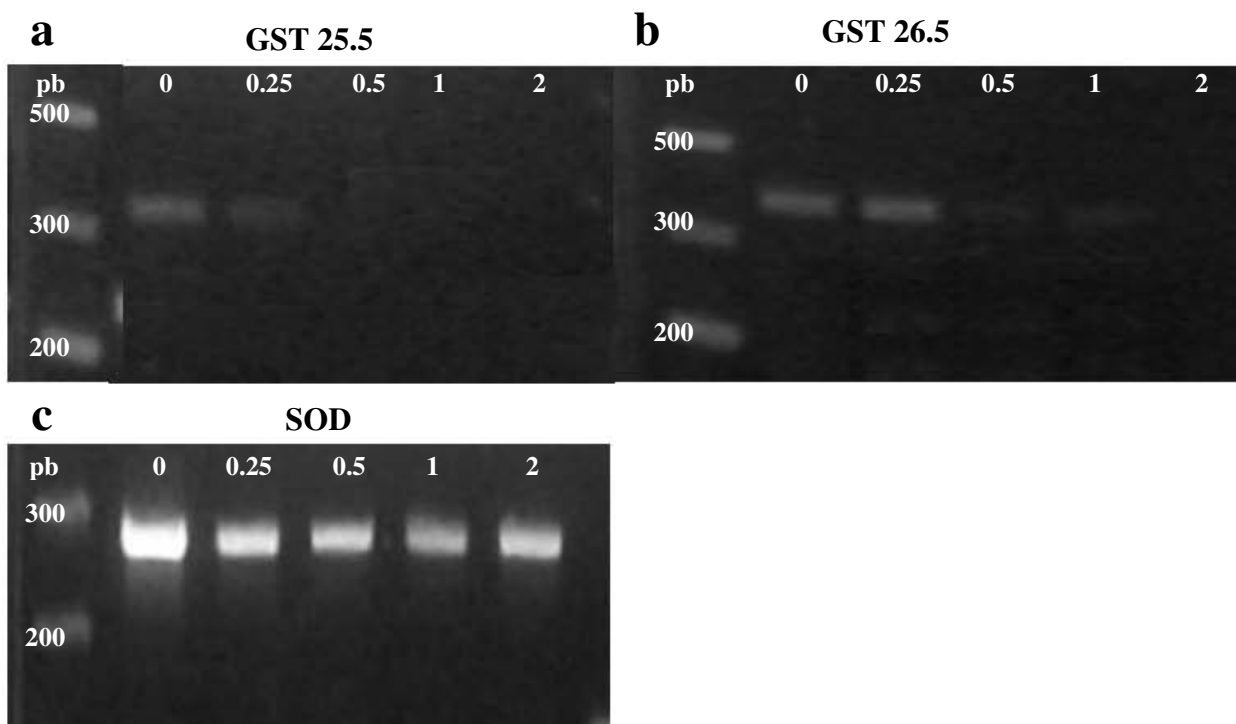


Fig. 12.- Expresión determinada mediante RT-PCR de los mRNA para (a) GST 25.5, (b) GST 26.5 y (c) SOD obtenidos de cisticercos de *T. crassiceps* en cultivos expuestos a diferentes concentraciones de HCu (números sobre las bandas). Los números a la izquierda representan el tamaño de la banda utilizada como marcador (pb, o pares de bases). Se utilizó 0.5 µg de RNA para cada ensayo llevándolo a 20 µl de volumen en PCR y el producto fue corrido en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

### VI.6 Isoelectroenfoque y geles de doble dimensión

Los ensayos de electroforesis y posteriores geles de doble dimensión con la FGST de *T. crassiceps* revelaron que la banda que corresponde al peso molecular de una GST25.5 está compuesta por al menos 6 isoformas, claramente identificadas por el suero  $\alpha$ -rTsGST25.5 y que se encuentran contenidas en un intervalo de pH entre 5.5 y 7.5. Las isoformas presentaron diferentes puntos isoeléctricos que fueron determinados como 5.8, 6.2, 6.8, 7.0, 7.2 y 7.4 respectivamente; dos de estas isoformas que se observan con una mayor expresión les corresponden los pI de 6.2 y 6.8, mientras que las otras cuatro de menor representación les corresponden los pI de 5.8, 7.0, 7.2 y 7.4). Todas estas isoformas coinciden con el peso

molecular de la rTsGST25 como se observa en la figura 12. Cabe mencionar que el suero preinmune no detecto ninguna mancha en una membrana hibridada en condiciones idénticas.

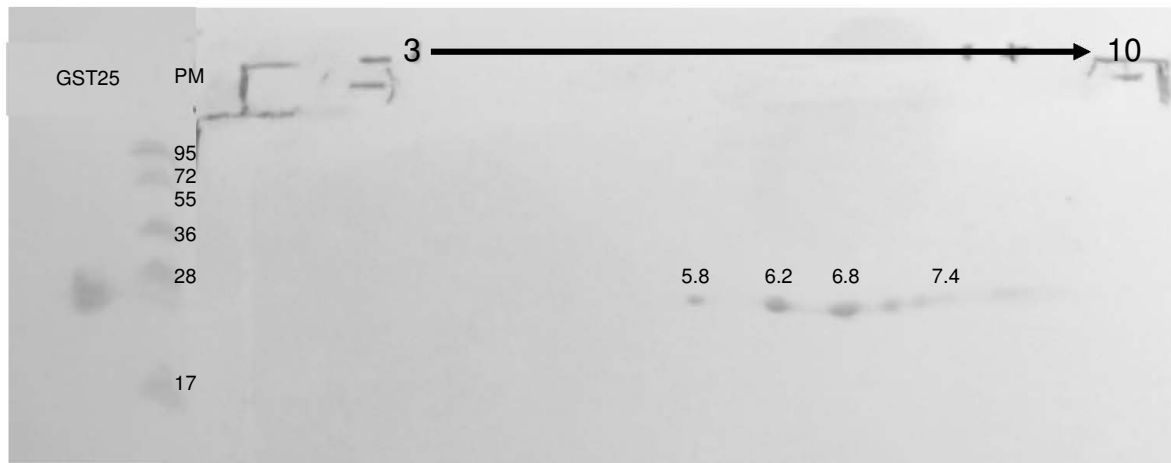


Fig. 13.- Western blot de un SDS-PAGE obtenido de un isoelectroenfoque en tiras de 11cm (pH 3-10), se utilizaron 15  $\mu\text{g}$  la FGST de *T. crassiceps* enfrentado con el suero anti-GST25.5 de *T. solium* (en dilución 1:1,000). A la izquierda junto a los pesos moleculares (PM), se muestra la rTsGST25 (GST25) como control positivo del experimento. Como control negativo del ensayo se utilizó el suero preinmune de conejo con una membrana similar (Dato no mostrado).

## VII. Discusión

La gráfica que describe la estructura secundaria de la rTsGST25 (fig. 6a) presenta una forma esperada para una estructura con gran cantidad de  $\alpha$ -hélices y algunas hojas- $\beta$  intercaladas (Jhonson, 1990), lo que se encuentra de acuerdo con las predicciones determinadas a partir de su estructura primaria y modelos tridimensionales de la enzima hechos por computadora para enzimas de esta clase (Fig. 4). Sin embargo, al analizar los resultados mediante el programa CDNN, se encuentra que las hélices alfa representan apenas un 37.1% de la proteína, mientras que otro 30.3% corresponde a estructuras no determinadas, o “random coil” a temperatura ambiente (25°C), mientras que los mínimos se localizan en las temperaturas extremas de 10 y 60°C, en donde la variación llega a ser de un 10% para estos marcadores de estructuras. Esto puede explicarse debido a la presencia en esta enzima del lazo  $\mu$ , una estructura propia de las GST de tipo  $\mu$ , la cual se encuentra ubicada entre la hoja  $\beta_2$  y la hélice  $\alpha_2$  del dominio de unión a GSH y que se considera que confiere resistencia a la estructura tridimensional de la proteína y es exclusivo de la clase. Esto último está de acuerdo con el resultado presentado en la figura 6a, puesto que se puede observar que al incrementar las condiciones de temperatura del medio, los cambios estructurales que sufre la proteína son bajos, sobre todo al compararlos con proteínas similares como la rTsGST26.

Por otro lado, las gráficas presentadas en la figura 6b muestran curvas que describen mayoritariamente estructuras en random coil (~30%) en todas las condiciones probadas excepto en pH 8.0, en donde la curva presenta la forma esperada para una estructura conformada principalmente por hélices  $\alpha$ ; este dato toma relevancia cuando se toma en cuenta la actividad de la enzima, en donde el punto óptimo para la actividad se encuentra justamente a pH 8.0 y a ambos lados de este punto, la actividad decae hasta en un 50% (Roldán, 2008). Esto podría indicar que los cambios de acidez en el microambiente de la enzima afectan tanto su plegamiento como su capacidad de interaccionar con los ligandos. Además, la enzima mantiene cierta estabilidad estructural en las condiciones de pH 6.5-7.5 y el punto en donde se hace notorio un desplegamiento es en el pH 8.5 (las estructuras indeterminadas alcanzan un 51.2% del total), lo cual parece indicar que la acidez del medio es un factor más importante que la temperatura cuando se desea mantener o afectar tanto la estructura de la rTsGST25 como su actividad enzimática.

El oxidante CHP no parece tener un efecto importante en la capacidad de la rTsGST25 (fig. 6c) para mantener su estructura secundaria, ya que en concentraciones letales para el parásito (2mM), la disminución en hélices  $\alpha$  detectadas es de un 10%, mientras que el aumento de estructuras random coil es alrededor de 5%, y el incremento de la forma gradual a las diferentes concentraciones probadas, por lo que se puede concluir que la rTsGST25 es una enzima desintoxicante que posee una estructura secundaria resistente tanto a condiciones adversas del medio, como a la presencia de ciertos agentes oxidantes, lo que sería una ventaja para el parásito al enfrentarse a variaciones en su medio provocadas por el sistema de defensa de su hospedero.

La estabilidad estructural de la rTsGST25 se comprueba con el ensayo de desplegamiento-replegamiento, en donde se puede observar que la enzima resiste conservando su estructura hasta los 50°C, pero cuando es llevada al límite de 70°C, pierde su actividad enzimática y no vuelve a plegarse correctamente (Fig. 7). Se nota que la forma que toma la curva al intentar replegarse es muy similar a la de su desplegamiento, lo cual indica que no existen intermediarios entre los dos estados de la enzima; este dato concuerda con lo reportado por Hornby y cols. en 2000 para dos GST de tipo  $\mu$  humanas (GSTM1-1 y GSTM2-2) las cuales

retienen su estructura secundaria hasta los 50°C y después de este punto, experimentan desnaturalización irreversible, probablemente debida a que las proteínas tienden a agregarse a altas temperaturas.

Los ensayos de ELISA como el Western Blot (Figs. 8a y 8b) mostraron que los todos los sueros obtenidos a partir de la rTsGST25 reconocen a esta proteína, pero tienen diferente título entre sí, pero los mejores entre ellos resultaron el suero 2 y 3 (título 1:12,800) y por ello fueron seleccionados para los posteriores análisis. Los ensayos de reacciones cruzadas (Tabla 4), no mostraron reconocimiento hacia GSTs de humano, *Schistosoma mansoni*, o contra la rTsGST26. Por otro lado, los experimentos reportados por Vibanco-Pérez en 2000 muestran que si existe reactividad cruzada entre las GST de tipo mu de *T. solium* y *T. crassiceps*, por lo que es adecuado utilizar los sueros obtenidos contra GST25 en cisticercos de *T. crassiceps* para determinar su ubicación en este parásito aún al ser un modelo heterólogo del ciclo de *T. solium* y corroborar su ubicación en las mismas regiones dentro del parásito.

En el ensayo de inmunofluorescencia indirecta obtenidos con el suero anti-GST25, se observó un resultado muy similar al reportado por Vibanco-Pérez en 2000 en el que se utilizó un antisuero anti-FGST, y mostró una fluorescencia significativa sobre el tegumento, así como en citones subtegumentales y citones protonefridiales, también mostró un gradiente de menos a más hacia el exterior del parásito (Fig. 9). Esto parece de gran importancia puesto que al ser una enzima desintoxicante, el que esta enzima se encuentre en gran cantidad en el tegumento, que es donde mas fuertemente se concentra la interacción con la respuesta del hospedero, metabolizará los productos de lipoperoxidación como hidroperóxidos lipídicos o carbonilos citotóxicos e inclusive medicamentos antihelmínticos y otras moléculas tóxicas tales como el HCu, evitando que estas lleguen al interior donde podrían causar daños al interactuar con moléculas vitales tales como el ADN.

Recientemente se ha descrito que las enzimas de tipo mu pueden participar en la formación y control de canales iónicos, así como en procesos de señalización y transporte, lo cual explica la presencia de esta enzima en las partes internas del cisticerco (Board et al. 2004; Cho et al. 2001; Yin et al. 2000). Asimismo, se sabe que la TsGST25 es un buen antígeno protector en contra de la cisticercosis murina (Vibanco-Pérez, 2000), por lo que se vuelve un blanco de interés para utilizarlo para el desarrollo de fármacos o una posible vacuna.

El sistema de desintoxicación en los cestodos está compuesto principalmente por las GSTs, en tenias está compuesto por las GST de 25 y 26 kDa (FGST) y una de tipo sigma encontrada en el escólex (Nguyen et al. 2010). Los ensayos de expresión para la GST25 *in vivo* (Fig. 10) indicaron que en presencia del agente oxidante a 1mM la GST26 desaparece del cisticerco, esto concuerda con la disminución de su actividad determinada con su sustrato específico (Ácido etacrínico) para esta (Fig. 11c); la actividad en el ensayo nunca llega a cero, probablemente porque la TcGST25 tiene algún tipo de actividad basal respecto a este sustrato, lo cual se demuestra con la actividad, aunque pequeña que tiene la rTsGST25. En contraste, la GST25 no se ve afectada por el tratamiento con el oxidante lo cual se refleja en la actividad registrada al utilizar tanto el sustrato universal (CDNB) en donde la actividad se mantiene en las condiciones probadas (Fig. 11a), como al utilizar el sustrato específico para esta enzima (DCNB), en donde la actividad se enriquece, puesto que la “fracción” estaría conformada solamente por la GST25 (Fig. 11b). Se sabe que tanto TsGST25 como TsGST26 son capaces de utilizar el HCu como sustrato para la catálisis (Torres-Rivera, 2008; Vibanco-Pérez, 2000), sin embargo, el que una de las enzimas desaparezca en un periodo tan corto de tiempo (30 min) en presencia de un exceso del agente oxidante puede indicar que al menos una de las

enzimas (TsGST26) está siendo atacada por el compuesto y modificada de tal forma que se vuelve inactiva y pierde su estructura, o que se esté generando una señal intracelular que conduzca a enzimas proteolíticas (o compuestos derivados del estrés oxidante) a degradarla; hacen falta experimentos que corroboren esta hipótesis. El hecho de que la otra enzima no sea afectada pone en evidencia la importancia de que existan variantes de una misma enzima dentro del sistema, que sean capaces de actuar cuando uno de los componentes del metabolismo desintoxicante haya sido superado por las defensas del hospedero.

Los experimentos para determinar expresión de mensajeros de TcGST25 y TcGST26 en presencia del oxidante por RT-PCR, mostraron que en ambas enzimas se ven afectada la expresión de mRNA. Se observa la expresión del mRNA para la GST26 hasta la concentración de 1 mM de HCu, mientras que el mensajero para la GST25 deja de observarse a partir de 0.5 mM HCu; este resultado fue opuesto a lo observado en la expresión de la enzima, y podría explicarse si el mensajero que codifica para la GST26 es más estable que el de GST25, por lo que resistiría mejor la presencia del oxidante. La explicación de la relación entre mRNA y la presencia de la proteína podría ser que aunque el mensajero de TcGST25 es se deja de producir a bajas concentraciones del oxidante, es lo suficientemente estable para traducirse múltiples veces antes de degradarse y que las proteínas resultantes tienen mayor resistencia a la presencia de HCu en el medio.

Se ha determinado (Vibanco-Pérez 2000) que TsGST25 es un gen de copia única dentro del genoma de *T. solium*. En el presente trabajo se detectaron 6 isoformas para la GST25 para el cisticerco de *T. crassiceps* con los puntos isoeléctricos de 5.8, 6.1, 6.8, 7.0, 7.2 y 7.4, de los cuales las isoformas de los pI de 6.1 y 6.8 son las mejor representadas; este resultado concuerda con un reporte previamente descrito para *T. solium*, en el que se encontraron 6 isoformas para GST25 y con puntos isoeléctricos muy similares a los aquí reportados (Nguyen et al. 2010). Asimismo, la isoforma del pI de 6.1 coincide con lo que se esperaba encontrar dentro del modelo, puesto que el pI teórico calculado para la recombinante rTsGST25 fue de 6.12 (Roldán, 2009), lo que podría correlacionar ambas enzimas, al mostrar que incluso sus isoformas son equivalentes, dándole mayor peso y validez al uso del modelo murino para estudiar indirectamente las moléculas de *T. solium*. Este último hallazgo abre la puerta para estudiar cómo los genes que las codifican se regulan a nivel de transcripción y traducción en el parásito, así como para conocer si todas las isoformas de esta enzima cumplen o no la misma función dentro de su fisiología.

Las perspectivas de este trabajo tiene dos vertientes importantes: primero, determinar el número total, identidad y función fisiológica de todas las isoformas de GST en *T. crassiceps*, y posteriormente en *T. solium*, además de analizar su correspondencia como modelo experimental, para tener un mejor entendimiento de la fisiología del parásito y de la interacción hospedero-parásito y segundo, el diseño inteligente y posible producción de fármacos o vacunas que permitan controlar y/o eliminar tanto a la taeniosis como a la cisticercosis consideradas aún como enfermedades endémicas en países en desarrollo y que resultan cada año en importantes pérdidas económicas por la morbilidad de los pacientes con la variante de neurocisticercosis, así como el sacrificio de miles de piezas de ganado porcino infectados con cisticerco que no cumplen los requerimientos para consumo humano.

## VIII. Conclusiones

1. La rTcGST25 presenta una estructura secundaria formada en su mayoría por  $\alpha$ -hélices y estructuras random coil.
2. Los efectos del medio (temperatura y pH) así como del HCu no afectan de forma importante la estructura de esta enzima.
3. Se obtuvieron sueros anti-TsGST25 específicos y con ellos se localizó a la enzima en el tegumento y células del cisticerco.
4. El HCu no afecta la expresión de la enzima GST25 en cisticercos *in vivo*, mientras que la expresión de GST26 disminuye gradualmente.
5. El HCu a 0.25mM afecta la expresión de mRNA para GST25 y GST26 en cisticercos *in vivo*.
6. Se encontraron 6 isoformas para la TcGST25 con puntos isoeléctricos en el intervalo de 5.8-7.4 de pH.

## IX. Literatura Citada

**Allan JC, G Avila, J Garcia Noval, A Flisser, PS Craig.** 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology*; 101: 473–77.

**Allan JC, M Velasquez-Tohom, J Garcia-Noval.** 1996. Epidemiology of intestinal taeniasis in four, rural, Guatemalan communities. *Ann Trop Med Parasitol* 90: 157–65.

**Ames BN, MK Shigenaga, TM Hagen.** 1993. Oxidants. Antioxidants. *Acad Scie* 90: 7915-7952.

**Armstrong RN.** 1994 Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an archetypical detoxification enzyme. *Adv Enzymol* 69: 1-44.

**Armstrong RN.** 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18

**Barnes MM, SP James, PB Wood.** 1959. Formation of mercapturic acid and the level of glutathione in tissues. *Biochem J* 71: 680-690.

**Belton CM.** 1977. Freeze-fracture study on the tegument of larval *Taenia crassiceps*. *The J Parasitol* 63(2): 306-313.

**Board PG, M Coggan, S Watson, PW Gage, AF Dulhunty.** 2004. CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Int J Biochem & Cell Biology*, 36: 1599-1612.

**Booth J, E Boyland, P Sims.** 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem J* 79: 516-524.

**Bradford MM.** 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.

**Brophy PM, J Barret.** 1990. Glutathione transferases in helminths. *Parasitology* 100: 345-349.

**Brophy PM, A Ben-Smith, A Brown, JM Behnke, Pritchard DI.** 1994. Glutathione S-transferase from the gastrointestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* and mammalian liver compared. *Comp Biochem Physiol* 109: 585-592.

**Brophy PM, Pritchard DI.** 1992. Immunity to helminths: ready to tip the biochemical balance? *Parasitology Today* 8: 419-422.

**Brophy PM, C Southan, J Barret.** 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem J* 262: 939-946.

**Cardenas F, H Quiroz, A Plancarte, A Meza, A Dalma, A Flisser.** *Taenia solium* ocular cysticercosis: findings in 30 cases. *Ann Ophthalmol* 1992; 24: 25–28.

**Cho SG, YH Lee, HS Park, K Ryoo, KW Kank, J Park, SJ Eom, MJ Kim, TS Chang, SY Choi, J Shim, Y Kim, MJ Dong, SG Kim, H Ichijo, FJ Choi.** 2001. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 276: 12749-12755.

**Chopra JS, Kaur U, Mahajan RC.** 1981. Cysticerciasis and epilepsy: a clinical and serological study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 518–20.

**Clark A.** 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organism. *Comp Biochem Physiol* 92: 419-446.

**Corona T, R Lugo, R Medina, J Sotelo.** Single-day praziquantel therapy for neurocysticercosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 125.

**Correa D, MA Sandoval, LJ Harrison.** Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 814–16.

**Cox, FEG.** 1982. *Modern Parasitology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 159



pp.

**Danielson HU, B Mannervik.** 1985. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochem J* 231: 263-267.

**Del Brutto OH, R Santibanez, CA Noboa, R Aguirre, E Diaz, TA Alarcon.** Epilepsy due to neurocysticercosis: analysis of 203 patients. *Neurology* 1992; 42: 389-92.

**Dickinson DA, HJ Forman.** 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharm* 64: 1019-1026.

**Dierickx PJ.** 1985. Anionic and neutral glutathione S-transferase isoenzymes in the freshwater worm *Tubifex tubifex* (O.F.M.). *Archives in Int Biological Biochem* 93: 193-198.

**Diwan AR, M Coker-Vann, P Brown.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 364-69.

**Dixon DP, R Edwards.** 2010. Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J Biol Chem* 285(47):36322-36329.

**Docampo R.** Antioxidant Mechanisms: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Marr J., M. Muller, Academic Press, San Diego, 1995.

**Droge W.** Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

**Eaton DL, TK Bammler.** 1999. Concise review of the Glutathion-S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 49: 156-164.

**Fernandez C, CE Hormaeche.** 1994. Isolation and biochemical characterization of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Int J Parasitol* 24: 1063-1066.

**Flisser A.** Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. In: Sun T, ed. Progress in clinical parasitology. New York: CRC Press, 1994: 77-116.

**Flisser A, I Madrazo, H Delgado.** 1997. Cisticercosis humana. Ed Manual Moderno. México, D.F. 1-176.

**Flisser A, I Madrazo, A Plancarte.** 1993. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniocidal dose of praziquantel. *Lancet* 342: 748.

**Freeman RS.** 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool* 40, 969-990.

**Gilman RH, OH Del Brutto, HH Garcia, M Martinez.** Prevalence of taeniosis among patients with neurocysticercosis is related to severity of infection. *Neurology* 2000 55: 1062.

**Gonzalez AE, V Cama, RH Gilman.** Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 194-99.

**Gonzalez LM, E Montero, LJ Harrison, RM Parkhouse, T Garate.** Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 737-44.

**Greenfield N.** 1996. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochem* 235: 1-10.

**Habig HW, WB Jacoby.** 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology* 77: 398-405.

**Habig WH, MJ Pabst, WB Jakob.** 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.

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

**Hayes JD, JU Flannagan, IR Jowsey.** 2005. Glutathione transferases. *Annual Review Pharmacol Toxicol* 45: 51-88.

- Heldwein K, HG Biedermann, WD Hamperl, G Bretzel, T Löscher, D Laregina, M Frosch, DW Büttner, and D Tappe.**(200). Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkins lymphoma. *Amer J Trop Med Hyg* 75, 108–111.
- Ishikawa T.** 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends in Biochem Sci* 17: 463-468.
- Jhonsen WC.** 1990. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: a Practical Guide. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 7: 205-214.
- Klion A, TB Nutman.** 2002. Immunity to parasitic worms. *Encyclopedia of life sciences*, 5-8.
- Larralde C, A Padilla, M Hernandez, T Govezenzky, E Sciutto, G Gutierrez, R Tapia-Conyer, B Salvatierra, J Sepúlveda.** 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México.* 34:(2) 197-210.
- Lightowers MW, A Flisser, CG Gaucci, DD Heath, O Jensen, R Rolfe.** 2000. Vaccination against cysticercosis and Hydatid disease (review). *Parasitology Today.* 16 (5): 191-196.
- Mannervik B.** 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol* 57:357-417.
- Mannervik B, P Alin, C Gutenber, H Jensson, M Kalim-Tahir, M Warholm, H Jörnvall.** 1985. Identification of three classes of glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 7202-7206
- Martinez HR, R Rangel-Guerra, G Elizondo.** MR imaging in neurocysticercosis: a study of 56 cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 1989; 10: 1011–19.
- Mayta H, A Talley, RH Gilman.** Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 133–37.
- Molinari JL, P Tato, A Palet.** 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Revsita Latinoamericana de Microbiologia.* 30: 325-333.
- Mount PM.** 1968. Rostellar morphogenesis in two strains of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: Taeniidae). MS Thesis. Wake Forest University, Winston-Salem, North Carolina.
- Nguyen HA, YA Bae, EG Lee, SH Kim, SP Diaz-Camacho, Y Nawa, I Kang, Y Kong.** 2010. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode. *International J Parasitol* 40: 1097–1106.
- O’Leary K, KM Hataway, JW Tracey.** 1992. *Shistosoma mansoni*: single step purification and characterization of glutathione S-transferase isoenzyme 4. *Exp Parasitol* 75: 47-55.
- Pemberton KD, J Barret.** 1989. The detoxification of xenobiotic compounds by *Onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *Int J Parasitol* 19: 875-878.
- Plancarte A, JL Rendon, A Landa.** 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol Res* 93: 137-144.
- Rabiela MT, A Rivas, J Rodriguez, S Castillo, FM Cancino.** Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F, eds. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* New York: Academic Press, 1982: 179–200.
- Rahalkar MD, DD Shetty, AB Kelkar, AA Kelkar, AS Kinare, ST Ambardekar.** The many faces of cysticercosis. *Clin Radiol* 2000; 55: 668–74.
- Rodríguez-Sosa M, AR Satoskar, R Calderón, L Gómez-García, R Saavedra,**

- Rbojalil and I Terrazas.** 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and Immunity* 70(7):3656-3664.
- Roldán A.** 2009. Determinación de los parámetros cinéticos de una glutatión transferasa recombinante de 25.5 kDa de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. 46 pp.
- Salinas G, G Braun, DW Taylor.** 1994. Molecular characterization and localization of an *Onchocerca volvulus*  $\pi$ -class glutathione S-transferase. *Mol Chem Parasitol* 66: 1-9.
- Sarti E.** 1997. La teniosis y cisticercosis en México. *Revista Salud Pública de México*. 39: 225-231.
- Schantz PM, M Cruz, E Sarti, Z Pawlowski.** 1993. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. *Bull Pan Am Health Organ* 27: 397-403.
- Schantz PM, E Sarti, A Plancarte.** 1994. Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin Infect Dis* 18: 879-85.
- Schantz PM, PP Wilkins, VCW Tsang.** 1998. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. En: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, eds. *Emerging infections 2*. Washington: ASM Press, 213-41.
- Schmidt GD, LS Roberts.** Cestoidea: Form, function and classification of the tapeworms: *Foundations of Parasitology*. 6a Ed. McGraw Hill, USA, 2000.
- Sheehan D, G Meade, VM Foley, CA Dowd.** 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16.
- Sies, H.** Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, H. Sies, (Ed.) London: Academic Press Inc, (1985) pp. 1-7.
- Smith JK, GW Esch and RE Kuhn.** 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous (ORF) strain. *Int J Parasit* 2, 261-263.
- Snyder MJ, DR Maddison.** 1997. Molecular phylogeny of Glutathione S-transferases. *DNA and Cell Biology*. 16 (11): 1373-1384.
- Sotelo J, OH del Brutto, P Penagos.** Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J Neurol* 1990; 237: 69-72.
- Sotelo J, F Escobedo, P Penagos.** Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis: a controlled trial. *Arch Neurol* 1988; 45: 532-34.
- Tato P y JL Molinari.** 1987. Estudio sobre la inmunidad contra el cisticercosis de *Taenia solium*. *Ciencia Veterinaria* 4: 61-86
- Tay J, CO Velasco, AR Lara, QM Gutiérrez.** *Parasitología médica*. 7ª edición: Méndez Editores, México 2002.
- Terrazas I, R Bojalil, T Govezensky, C Larralde.** 1998. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84:74-81.
- Torres-Rivera A, A Landa.** 2008a. Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 477: 372-378.
- Torres-Rivera A, A Landa.** 2008b. Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica* 105: 99-112.
- Tracy JW, EA Vande.** *Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. Marr, J., M. Muller. Academic Press, San Diego, 1995.
- Vasconcelos D.** 1990. From cyst to cysticercosis granuloma using cranial computerized tomography. *Gac Med Mex* 126: 401-404.
- Verastegui M, A Gonzalez, RH Gilman.** 2000. Experimental infection model for *Taenia*

*solium* cysticercosis in swine. *Vet Parasitol* 94: 33–44.

**Vibanco-Perez N.** 2000. La enzima Glutathión S-Transferasa de *Taenia solium*, su caracterización y evaluación de su protección. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina, UNAM. México, D.F. 116pp.

**Vibanco-Perez N, A Landa.** 1998. Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 40: 73-85.

**Vibanco-Perez N, L Jiménez, M Merchant, A Landa.** 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol* 85(3): 448-453.

**Vibanco-Perez N, L Jimenez, G Mendoza-Hernandez, A Landa.** 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res* 88: 398-404.

**Walter J, P Crowley, AD Moreman, J Barret.** 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol Biochem Parasitol* 61: 255-264.

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

**Willms K and R Zurabian.** 2010. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 137, 335–346.

**Yin Z, VN Ivanov, H Habelhah, K Tew, Z Ronai.** 2000. Glutathione S-Transferase p Elicits Protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cell Death via Coordinated Regulation of Stress Kinases. *Cancer Research* 60:4053-4057.

**Zepeda N, S Solano, N Copitin, AM Fernández, L Hernández, P Tato, JL Molinari.** 2010. Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitol Res* 107(5):1129-1135.