



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN CATALÍTICA Y DE LIGANDINA DE LAS GLUTATIÓN S-
TRANSFERASAS DE *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* FRENTE A PERÓXIDOS
LIPÍDICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ RODRIGO ROMERO DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. HORACIO REYES VIVAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2015



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

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN CATALÍTICA Y DE LIGANDINA DE LAS GLUTATIÓN S-
TRANSFERASAS DE *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* FRENTE A PERÓXIDOS
LIPÍDICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JOSÉ RODRIGO ROMERO DÍAZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.
DR. HORACIO REYES VIVAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2015

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de noviembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ROMERO DÍAZ JOSÉ RODRIGO** con número de cuenta **95316626**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA FUNCIÓN CATALÍTICA Y DE LIGANDINA DE LAS GLUTATION S-TRANSFERASAS DE *Taenia solium* Y *Taenia crassiceps* FRENTE A PERÓXIDOS LIPÍDICOS"**, realizada bajo la dirección del **DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO**:

Presidente: DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA
Vocal: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Secretario: DR. HORACIO REYES VIVAS
Suplente: DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de febrero de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A la Facultad de Medicina, UNAM

Depto. Microbiología y Parasitología

Lab. de Inmunobioquímica de *Taenia solium*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Beca 270110

**Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM**

Proyecto IN211313

Al Comité Tutor

Dr. Agustín Plancarte Crespo

Dr. José Pedraza Chaverri

Dr. Horacio Reyes Vivas

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Nava Balderas, por su asesoría, consejos y amistad incondicional.

A la M. en C. Martha Adriana Hernández Bautista, por su asesoría, pero sobre todo por su amistad y apoyo.

A los miembros del jurado: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena, Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, Dr. Horacio Reyes Vivas, Dra. Regina Dorinda Montero Montoya y el Dr. José Pedraza Chaverri, por el tiempo invertido en la revisión de la tesis y por sus valiosos comentarios para mejora de la misma.

Al Dr. Sergio Enríquez Flores, por su asesoría en las técnicas de fluorescencia.

Al M. en C. Ignacio de la Mora de la Mora, por su asesoría en el uso del ANS.

Al M.V.Z. José Agustín Jiménez Rodríguez, por su asesoría técnica y ayuda.

Al M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro, por su asesoría técnica y ayuda.

A mis amigos, por alentarme a mejorar y por su compañía.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por las oportunidades de desarrollo que me ha ofrecido.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, a todos y cada uno de ellos, por su cariño y compañía.

Con mucho cariño principalmente a mis padres, Antonia Catalina y Pascual José, por darme la vida, por estar siempre a mi lado y por su ayuda.

A mis hermanos, Fernando y Marco Antonio, por su compañía y ayuda incondicional.

A mis abuelitos, Elena, José, Eladio, Catalina, Margarito y Tere, por sus enseñanzas y su cariño incondicional.

INDICE

| | |
|--|----------|
| ABREVIATURAS..... | <i>i</i> |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 1.1. Historia..... | 3 |
| 1.2. Clasificación taxonómica de <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia crassiceps</i> | 3 |
| 1.3. <i>Taenia solium</i> : Ciclo de vida y morfología..... | 4 |
| 1.4. <i>Taenia solium</i> : Teniosis y cisticercosis..... | 6 |
| 1.5. <i>Taenia crassiceps</i> | 8 |
| 1.6. Lípidos..... | 9 |
| 1.7. Metabolismo oxidante..... | 11 |
| 1.8. Glutación transferasas..... | 15 |
| 1.9. Glutación transferasas en parásitos..... | 16 |
| 1.10. Función de Ligandina..... | 17 |
| 1.11. Espectroscopia UV/Vis y Fluorescencia..... | 17 |
| 2. Justificación..... | 23 |
| 2.1. Objetivo general..... | 23 |
| 2.2. Objetivos particulares..... | 23 |
| 3. Materiales y métodos..... | 24 |
| 3.1. Obtención de cisticercos..... | 25 |
| 3.2. Purificación de enzimas, obtención del extracto crudo..... | 25 |
| 3.2.1. Homogenización de cisticercos..... | 25 |
| 3.2.2. Obtención de proteínas solubles (sobrenadante del extracto crudo)..... | 25 |
| 3.2.3. Filtración..... | 25 |
| 3.3. Cromatografías y obtención de la muestra de ensayo..... | 25 |
| 3.3.1. Cromatografía de Sefarosa-glutación..... | 25 |
| 3.3.2. Cromatoenfoque..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 3.3.3. Concentración y diálisis..... | 27 |
| 3.4. Electroforesis en gel de acrilamida..... | 27 |
| 3.5. Análisis de péptidos..... | 27 |
| 3.6. Análisis espectrofotométricos..... | 27 |
| 3.6.1. Fluorescencia..... | 28 |
| 3.6.2. Ensayos enzimáticos..... | 29 |
| 3.7. Estequiometría de unión de los ligandos..... | 30 |
| 3.8. Inhibición de la actividad catalítica de la glutatión transferasa..... | 31 |
| 3.8.1. Inhibición al 50%..... | 31 |
| 3.8.2. Tipo de inhibición..... | 31 |
| 3.8.3. Constante de inhibición..... | 31 |
| 3.9. Competencia entre hematina y 8-anilino-1-naftalen sulfonato..... | 32 |
| 3.10. Solubilización de los compuestos..... | 33 |
| 4. Resultados..... | 34 |
| 4.1. Obtención de las glutatión transferasas..... | 34 |
| 4.2. Análisis de péptidos..... | 37 |
| 4.3. Análisis de fluorescencia (constante de disociación)..... | 38 |
| 4.4. Estequiometría..... | 52 |
| 4.5. Análisis cinéticos (inhibición)..... | 61 |
| 4.6. Competencia entre hematina y 8-anilino-1-naftalen sulfonato..... | 77 |
| 5. Discusión..... | 80 |
| 6. Conclusiones..... | 83 |
| 7. Literatura citada..... | 83 |
| 8. Anexo..... | 94 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| Δ ABS | Cambio de absorbancia en función del tiempo |
| ANS | 8-anilino-1-naftalen sulfonato |
| CDNB | 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno |
| EROS | Especies reactivas de oxígeno |
| et-ONE | ethyl- <i>trans</i> -2-octenoate |
| GSH | Glutación reducido |
| GST | Glutación transferasa |
| GSTs | Glutación transferasas |
| HNE | 4-hydroxynonenal |
| HNE-D | (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal |
| K _i | Constante de inhibición |
| K _D | Constante de disociación |
| kDa | Kilodalton |
| K _m | Constante de Michaelis-Menten |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido) |
| NC | Neurocisticercosis |
| PBE-94 | Resina Polybuffer Exchanger 94 |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PL | Peroxidación lipídica |
| PLs | Peróxidos lipídicos |
| PPL | Productos de la peroxidación lipídica |
| Sef-GSH | Resina Sefarosa-glutación |
| SNC | Sistema nervioso central |
| TcGST | Glutación transferasa de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> |
| Ts26GST | Glutación transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de <i>Taenia solium</i> |
| tt-DDE | <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal |
| tt-HDE | <i>trans,trans</i> -2,4-hexadienal |
| tt-NDE | <i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal |
| V _o | Velocidad inicial |
| Y | Proporción de la fluorescencia |

RESUMEN

Con el interés de avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos desintoxicantes de los cestodos *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*, se evaluó la capacidad de sus principales glutatión transferasas citosólicas para catalizar ó unir no catalíticamente productos de la peroxidación lipídica. Adicionalmente, se estudió el efecto competitivo entre la hematina y el 8-anilino-1-naftalen sulfonato por el sitio no catalítico para la hematina de la glutatión transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de *Taenia solium*.

En este trabajo se observó que las dos glutatión transferasas mencionadas fueron capaces de unir no catalíticamente a los productos de la peroxidación lipídica *trans,trans*-2,4-hexadienal, *trans,trans*-2,4-nonadienal, *trans,trans*-2,4-decadienal y al ethyl-*trans*-2-octenoate, así como a los ácidos grasos araquídico y palmítico, precursores de peróxidos lipídicos. También se demostró a través de espectroscopia de fluorescencia que la glutatión transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de *T. solium* fue capaz de unir no catalíticamente al más abundante derivado de la peroxidación lipídica (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal. Adicionalmente, se realizaron ensayos de competencia entre la hematina y el 8-anilino-1-naftalen sulfonato demostrando al menos un sitio de unión hidrofóbico para la hematina presente en la enzima de *T. solium*.

Por otro lado, con estudios de fluorescencia intrínseca de las glutatión transferasas se determinaron las constantes de disociación y el número de sitios de unión de los *trans,trans*-2,4-dienales, el ethyl-*trans*-2-octenoate y los ácidos grasos para ambas enzimas y del (E)-4-hydroxynonenal-dimethylacetal para la glutatión transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de *T. solium*.

Los *trans,trans*-2,4-dienales fueron los únicos capaces de apagar al 100% la fluorescencia intrínseca de las dos glutatión transferasas además de inhibir al 100% la actividad catalítica de ambas enzimas, mientras que el ethyl-*trans*-2-octenoate sólo apagó el 44 y 73% de la fluorescencia de las glutatión transferasas de *T. crassiceps* y de *T. solium* respectivamente, aunque logró inhibir al 100% la actividad catalítica de las dos glutatión transferasas. Los ácidos grasos, apagaron entre el 10 y el 25% de la fluorescencia intrínseca de las glutatión transferasas.

El tipo de inhibición que presentaron los *trans,trans*-2,4-dienales y el ethyl-*trans*-2-octenoate fue no competitivo para las dos glutatión transferasas, excepto para el caso del ethyl-*trans*-2-octenoate con la glutatión transferasa de cisticercos de *T. crassiceps* y del *trans,trans*-2,4-decadienal con la glutatión transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de *T. solium*, en estos dos últimos caso el tipo de inhibición fue acompetitivo. Estos resultados sugieren que las glutatión transferasas de estos parásitos además de catalizar la unión del glutatión con compuestos tóxicos, tienen la función de ligandina al unir de forma no catalítica a diferentes compuestos tóxicos indicando el uso de un doble mecanismo de desintoxicación.

ABSTRACT

With the aim to clarify *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* detoxification mechanism, we decided to evaluate the catalytic or ligandin function of Ts26GST and one TcGST for lipid peroxide products. Additionally, competitive effect for the Ts26GST non-catalytic site, between hematin and 8-anilino-1-naphthalene sulphonate, was evaluated.

We show, by fluorescence studies, that both transferases were able to bind in a non-catalytic way the lipid peroxide products *trans,trans*-2,4-hexadienal, *trans,trans*-2,4-nonadienal, *trans,trans*-2,4-decadienal and ethyl-*trans*-2-octenoate and arachidic and palmitic lipid acids as lipid peroxide precursors. Fluorescent studies also indicated that Ts26GST binds (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal, the most abundant lipid peroxide product in mammalian tissues, in a similar way as the molecules described above.

Dissociation constant values (K_D) and ligand binding sites for Ts26GST and TcGST using the lipid peroxide products and lipid peroxide precursors were determined by intrinsic fluorescence assays, for (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal only Ts26GST was evaluated.

Intrinsic fluorescence for both transferases was totally quenched by *trans,trans*-2,4-dienals. Also these ligands inhibited the catalytic activity of Ts26GST and TcGST in 100%.

ethyl-*trans*-2-octenoate although inhibited in 100% the catalytic activity of both transferases only 44 and 73% was able to quench the intrinsic fluorescence of TcGST and Ts26GST respectively. Lipid acids were the lowest intrinsic fluorescence quenchers for the transferases getting a 35% average for this inhibition. Non-competitive and uncompetitive types of inhibition were developed by both transferases with the ligands.

These results suggest that both cestode transferases not only work like enzymes but also as binding non-catalytic proteins. So, *T. solium* and *T. crassiceps* may be detoxified in two ways when they utilize these transferases.

1. Introducción.

1.1. Historia

Los primeros reportes que se tienen sobre el conocimiento de los cestodos en las personas datan de las culturas griega y egipcia. No obstante, que en esta última se tratara de *Taenia saginata* y no de *T. solium* debido a que los egipcios no consumían carne de cerdo (Grove D I. 1990). Un ejemplo de estos documentos es el papiro de Eber de alrededor del año 2000 A.C. (Wadia N H, Singh G. 2002). Estos organismos recibieron nombres muy distintos dependiendo del lugar y la cultura en la que fueron descritos, así los griegos Hipócrates, Aristóteles y Teofrasto los llamaron gusanos planos, los romanos Celsus, Plinio el Viejo y Galeno los denominaron "*lumbricus latus*" (gusano ancho) y al principio de la era cristiana autores árabes como Serapio, que consideraban a cada proglótido un gusano diferente los llamaron cucurbitines (Grove D I. 1990).

Fue Tyson en 1683 quien descubrió y describió la cabeza de *T. solium* terminando con un período de más de 2000 años en los que éstas eran confundidas con *T. saginata* y *Diphyllobotrium latum* (Tyson E. 1683).

En 1853, Van Beneden demostró el desarrollo de los cisticercos en cerdos cuando después de haber alimentado a un cerdo con huevos de *T. solium*, encontró durante la necropsia numerosos cisticercos en los músculos del mismo (Van Beneden P J. 1854).

Más adelante, Kuchenmeister en 1855 señaló que las tenias se desarrollan a partir de los cisticercos y un año después comprueba y establece el ciclo biológico del parásito. Para lograr esto, alimentó con cisticercos extraídos de carne de cerdo a algunos convictos condenados a muerte; posteriormente, durante su autopsia descubrió en sus intestinos las formas adultas o tenias del parásito (Kuchenmeister F. 1855, Gómez Alanís A. 1994).

En 1933, Yoshino describió con gran detalle morfológico el desarrollo de los cisticercos en cerdos. Inicialmente se auto-infectó ingiriendo cisticercos para tener suficientes proglótidos y dárselos a comer a diversos cerdos. Posteriormente, fue sacrificando a los puercos a diferentes tiempos y estudiando histológicamente el crecimiento de los parásitos en los tejidos de su huésped. De esta forma completó el paso de las formas oncosferales hasta las de cisticercos de 190 días de crecimiento. Esto lo realizó durante el curso de su propia teniosis, que duró 2 años, posteriormente informó que durante este tiempo expulsaba de 1 a 5 proglótidos diariamente (Yoshino K. 1934a, Yoshino K. 1934b).

1.2. Clasificación taxonómica de *T. solium* y *T. crassiceps*

Subreino: *Metazoarios*
Phylum: *Plathelminthos*
Clase: *Cestoidea*
Subclase: *Cestoda*
Orden: *Ciclophylidea*
Familia: *Taeniidae*
Género: *Taenia*
Especie: *Taenia solium* (Cheng T. 1986)
Taenia crassiceps

1.3. *Taenia solium*: Ciclo de vida y morfología

Taenia solium es un gusano plano, parásito obligado, monoico, sin aparato digestivo ni circulatorio. Es un cestodo con un ciclo de vida en dos etapas, cada una con un huésped diferente, sólo pasando por los dos huéspedes y una etapa de vida libre puede completar su ciclo de vida. Los huéspedes de este parásito son el hombre, que alberga la fase adulta (solitaria, tenia) y el cerdo, que es el huésped intermediario, el cual alberga la forma larvaria (metacestodo, cisticerco). Sin embargo, también en los tejidos del hombre se pueden desarrollar los cisticercos sin ninguna justificación biológica, al no tener la posibilidad estos cisticercos de continuar a la etapa de adulto.

Es exclusivamente en el intestino delgado (yeyuno) de los humanos, donde este parásito se establece en su forma adulta (solitaria), la mayoría de las veces aunque no es una regla, sólo se encuentra un gusano en cada huésped, de ahí el nombre común de solitaria. En su forma larvaria se establece principalmente en el músculo de los cerdos, aunque también se ha encontrado que se puede desarrollar en varios mamíferos como monos, perros, gatos, conejos, liebres, jabalís, camellos, etc., incluyendo al ser humano (Abdussalam M, 1975; Craig F, 1970; Pearse V *et al.*, 1987; S de Aluja A *et al.*, 1987 y Zbigniew SP, 2002).

El proceso de infección de la forma adulta en los humanos comienza, cuando una persona ingiere carne infectada con cisticercos mal cocida, entonces el cisticerco ingerido es activado por las enzimas digestivas y el jugo biliar, provocando la evaginación del escólex. El escólex está constituido por cuatro ventosas y un rostelo que presenta una doble corona de ganchos, el escólex se adhiere a la pared del intestino con las ventosas y la corona de ganchos empezando el desarrollo de la fase adulta.

La forma adulta de *T. solium* está constituida por un escólex o cabeza seguida del cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos (Smyth J D. 1969). El escólex tiene el tamaño de una cabeza de alfiler y el resto del gusano presenta la apariencia de un listón o de un tallarín (Flisser A *et al.*, 1997). Las ventosas y el rostelo son estructuras de fijación que permiten al gusano adherirse a la pared del intestino y absorber los nutrientes que necesita.

La forma adulta de *T. solium* mide entre 1.5 y 5 m de longitud, el escólex posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos cuyo número puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173 μm (Willms K *et al.*, 2006); sin embargo, también se ha descrito que la doble corona de ganchos está compuesta por 11 a 14 ganchos largos (0.13-0.16 mm) en su corona interna, y que la corona externa tiene igual número de ganchos pero más pequeños (0.1-0.12 mm) (Yoshino K. 1933).

Al proceso por el cual la tenia crece se le conoce como estrobilación y al conjunto de proglótidos estróbilo. Los proglótidos se forman a partir de la región distal del cuello, cada proglótido es un segmento independiente, los proglótidos más alejados al escólex son los proglótidos grávidos, mientras que los que se encuentran cerca del escólex son los inmaduros (todavía no tienen desarrollados sus órganos sexuales), los de en medio son los maduros, los cuales ya tienen completamente desarrollados los órganos sexuales.

Los proglótidos inmaduros son de tamaño variable, mientras que los proglótidos maduros incluyendo los grávidos generalmente miden de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho. Cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad reproductora independiente, puesto que posee órganos genitales masculinos y femeninos (Willms K *et al.*, 2006). Los proglótidos

terminales grávidos se llegan a observar aproximadamente en un tiempo de 3 a 4 meses posterior a la implantación de la tenia (Flisser A *et al.*, 1997, Acha P N y Szyfres B. 1986).

Como se mencionó anteriormente, la solitaria es un organismo monoico que puede autofecundarse, cada proglótido puede contener varios miles de huevos y un humano teniásico puede liberar de cuatro a cinco proglótidos por día con el excremento (Willms K *et al.*, 2006). Los huevos son esféricos midiendo de 20 a 40 μm y poseen varias envolturas, la más externa es el vitelo o cápsula, constituido por células que forman un sincicio; sin embargo, no es muy común encontrar huevos en la materia fecal que todavía estén cubiertos por el vitelo. La siguiente envoltura o capa es el embrióforo, que es una estructura relativamente rígida que protege al embrión mientras el huevo está en el ambiente exterior (Flisser A *et al.*, 1997).

El embrióforo está formado por pequeños bloques proteicos unidos por un material cementante, y este es producido por una envoltura celular más profunda llamada célula embrioformal. La última envoltura, es decir la envoltura más interna es la membrana oncosferral que rodea al embrión hexacanto, la cual es impermeable a las condiciones ambientales externas, pero en contacto con la pancreatina se vuelve permeable permitiendo que el embrión expuesto se active (Laclette JP *et al.*, 1982).

Los cerdos adquieren la cisticercosis al ingerir materia fecal humana, que contiene huevos de *T. solium* (Aluja A *et al.*, 1987). Los huevos que pasan por el aparato digestivo del cerdo se activan con las enzimas proteolíticas y las sales biliares de este, permitiendo que el embrión hexacanto u oncosfera se active y que una vez que lleguen al intestino, atraviesen la pared intestinal del huésped para posteriormente distribuirse a través de los capilares sanguíneos o linfáticos. Se requieren de por lo menos 10 semanas posteriores a la ingesta de los huevos para que se conviertan en cisticercos en los tejidos del huésped intermediario y/o humano (Willms K *et al.*, 2006).

La forma larvaria de la *T. solium* o cisticerco se constituye por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (de 0.5 a 2 cm de diámetro mayor), con un pequeño escólex invaginado (Slais J. 1970). La membrana que separa al metacestodo del huésped es un tegumento citoplásmico y sincicial continuo en toda la parte externa de la pared vesicular. En ella se presentan prolongaciones digitiformes llamadas microtricas o microvilli que son las que permiten la absorción de diversas moléculas como los nutrientes (Ramírez–Bon E *et al.*, 1982). Debido a que los cestodos carecen de tracto digestivo, éstos obtienen sus nutrientes y excretan sus desechos a través de la superficie tegumental ayudándose para ello de las proyecciones digitiformes designadas como microtricas (Willms K *et al.*, 2006).

En el cerdo, los metacestodos de *T. solium* se alojan principalmente en el músculo y es a través de los músculos de los cerdos que este parásito encuentra a su huésped definitivo, el hombre que se infecta al ingerir carne de cerdo contaminada con cisticercos, y que no ha sido tratada adecuadamente para el consumo humano. De esta manera, se completa el ciclo natural de *T. solium*, pues los cisticercos ingeridos por las personas en la carne del cerdo se transforman en la tenia (solitaria) dentro del intestino de los seres humanos.

El ciclo natural de vida de *T. solium* se puede ver de forma resumida en la Figura 1.

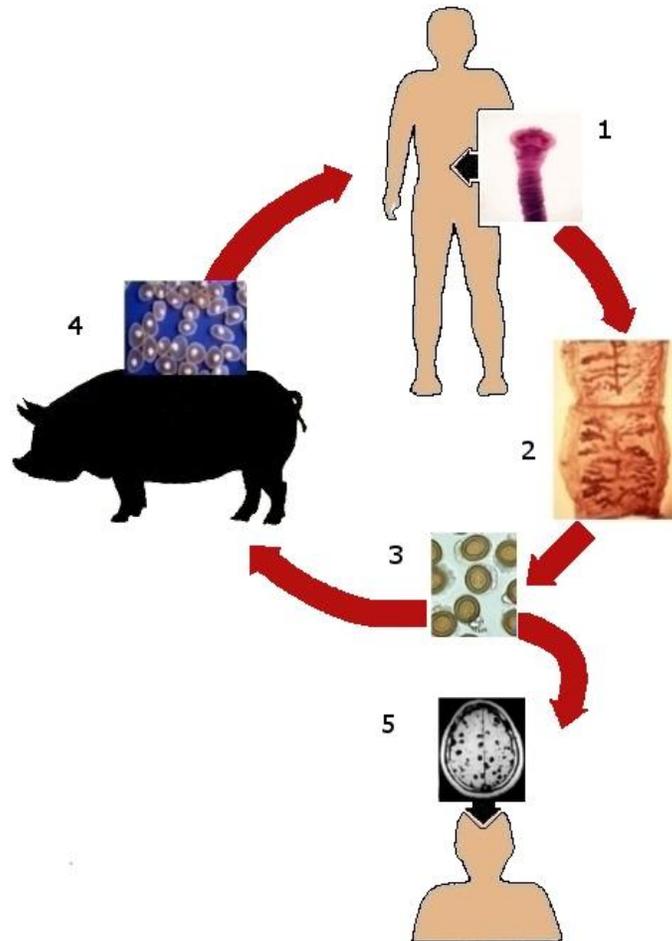


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. El ser humano es el huésped definitivo, mientras que el cerdo es el intermediario. La teniosis se produce cuando el parásito en estado adulto habita el intestino humano (1). Los proglótidos (2) producen miles de huevos (3) que son expulsados con la materia fecal del portador. El cerdo consume la materia fecal que contiene los proglótidos con los huevos, provocando la cisticercosis porcina (4). El hombre puede ser el huésped accidental de la forma larvaria al adquirir la cisticercosis (5), esto es principalmente por la falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito adulto. El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere carne cruda o mal cocida de los cerdos parasitados, de esta manera los cisticercos se fijan a las paredes del intestino donde maduran hasta convertirse en adultos (tomada y modificada de Willms K *et al.*, 2006).

1.4. *Taenia solium*: Teniosis y cisticercosis

Una de las dos infecciones que ocasiona *T. solium* es la teniosis. Se desarrolla cuando el parásito adulto se aloja en el intestino del ser humano. La teniosis suele ser generalmente benigna y prácticamente asintomática, presentando sólo escasos síntomas como constipación, diarrea, falta de apetito y pueden darse leves dolores estomacales (Reyes M A. 2000). Es debido a esto, a que el portador, desconociendo su enfermedad se convierte en un grave foco de infección ya que un teniásico puede expulsar en la materia fecal miles de huevos.

Los estudios relacionados con la frecuencia de la teniosis en México son escasos, algunos autores indican valores que oscilan entre 0.5 y 1.5% (López-Cepeda L *et al.*, 2001). Estos estudios

se basan generalmente en la detección de huevos en materia fecal (Tay J *et al.*, 1976), aunque también se utilizan análisis de coproantígenos de tenia (Sarti E *et al.*, 2000); sin embargo, no puede confirmarse que estos datos se deban exclusivamente a *T. solium*, ya que los huevos son idénticos a los de *T. saginata* y los antígenos presentan reacción cruzada entre ambas especies (Flisser A *et al.*, 1997).

Otros autores indican que para la República Mexicana, las frecuencias de teniosis varían entre 0.2 y 3.4 %, mientras que las estadísticas oficiales indican que de 1986 a 1990 se notificaron 13,000 casos anuales, cifra que se redujo a 8,000 casos anuales de *Taenia sp.* a partir de 1991 (Sarti E. 1997).

La otra infección que ocasiona *T. solium* es la cisticercosis. Varios estudios han demostrado que el portador de *T. solium* intestinal en el entorno familiar o comunitario es el principal factor de riesgo para adquirirla (Flisser A *et al.*, 1997, Sánchez-Serrano A P *et al.*, 2002, Sarti E *et al.*, 1988, Sarti E *et al.*, 1997, Schantz P *et al.*, 1992, García-García M L *et al.*, 2000).

La cisticercosis humana puede ser una enfermedad severa, incapacitante y en ocasiones fatal (Reyes M A. 2000), lo anterior depende principalmente de la ubicación y el número de parásitos en el sistema nervioso central (SNC), así como de la respuesta inmune del individuo.

El hombre desarrolla la cisticercosis, cuando las personas por falta de higiene o por accidente llegan a ingerir huevos de tenia, lo que provoca que se desarrollen los cisticercos o metacestodos en las persona. Al ingerir los huevos estos eclosionan en el intestino liberando a las oncosferas que penetran en la mucosa intestinal desde donde, a través del sistema sanguíneo o linfático se distribuyen a los distintos lugares en los cuales se desarrollan. En los humanos los cisticercos se alojan principalmente en músculo esquelético, sistema nervioso, ojos, tejido graso subcutáneo y corazón (Fleury A *et al.*, 2006.).

Uno de los grandes peligros de esta enfermedad en los humanos es la neurocisticercosis (NC), que es el resultado de que los cisticercos se alojen en el SNC. Las manifestaciones clínicas de la NC dependerán del número de parásitos y de sus localizaciones, así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria del huésped (Fleury A *et al.*, 2006). Sin embargo, otros autores reportan que la NC también puede ser asintomática (Acha P N, Szyfres B. 1986) o presentar una gran variedad de signos y síntomas, los cuales dependen de diversos factores, tanto del individuo (genéticos, respuesta inflamatoria) como del parásito (número, localización estadio y tipo) (Sotelo J. 1996).

Entre los síntomas más comunes de la NC se encuentran las crisis convulsivas en un 70% de los casos; la epilepsia de aparición tardía y en el 23% de los casos existe hipertensión endocraneal, además de reportarse cefaleas, trastorno mental y demencia (Flisser A *et al.*, 1997). No existen diferencias en cuanto al sexo y el grupo de 15 a los 44 años es el más afectado por esta parasitosis (Sarti E. 1997).

En México el análisis de múltiples autopsias proporciona una frecuencia de NC cercana al 2% (Schenone H *et al.*, 1982), mientras que el reporte de estudios clínicos muestra que alrededor del 10% de los enfermos que asisten a unidades de neurología tienen NC (Velasco M *et al.*, 1982), este dato al parecer no ha variado mucho, como lo demuestra el estudio de Fleury A *et al.*, 2010 en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), donde se indica que en el servicio de la neurología de dicho instituto, las frecuencias de hospitalización de pacientes con NC variaron entre 3.4 y 10.9% sin ninguna tendencia temporal significativa entre 1995 y 2009. Por otro lado, los estudios de seroprevalencia reportan que hasta el 12% de la población mexicana

tiene anticuerpos anti-cisticerco (Díaz S *et al.*, 1990). La encuesta nacional seroepidemiológica (ENSE) de 1987-1988 registró una seroprevalencia de cisticercosis por entidad federativa que varía de entre 0.06% a 2.97%; en el Distrito Federal la seroprevalencia fue de 2.95% (Larralde C *et al.*, 1992.).

La teniosis y la cisticercosis causada por *T. solium* son problemas de salud pública en algunas áreas urbanas y rurales de América Latina, Asia y África (Antoniuk S. 1999, Bern C *et al.*, 1999). *T. solium* es el parásito responsable de la infección de alrededor de 20 millones de personas (Bern C *et al.*, 1999), y 50 mil muertes cada año (Mafojane NA *et al.*, 2003). Recientemente también en los países desarrollados, en los que ya se había erradicado esta enfermedad, se han presentado algunos casos, por lo que ahora es considerada como una enfermedad emergente (Schantz P *et al.*, 1992; White CA. 1997).

1.5. *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps es un cestodo, parásito obligado que no tiene aparato digestivo ni circulatorio y presenta un ciclo de vida indirecto. Durante la etapa adulta es un parásito de zorros, lobos y perros (Loos-Frank, 2000), mientras que en su etapa larvaria parasita principalmente a múridos, también se ha reportado que de forma natural infecta a marmotas (*Marmota monax*) (Bröjer *et al.*, 2002) así como al ratón de campo (*Peromyscus sp.*) (Everhart *et al.*, 2004). En la etapa de huevo, este parásito se puede encontrar de forma libre.

El adulto de *T. crassiceps* es un gusano plano de cuerpo alargado y segmentado que al igual que *T. solium* puede dividirse en escólex, cuello y estróbilo. Se desarrolla en el intestino de cánidos provocando la teniosis, en esta etapa el cestodo produce miles de huevos y estos son expulsados al ambiente con la materia fecal del portador.

La etapa larvaria ocurre cuando los múridos ingieren los huevos de *T. crassiceps* y éstos se desarrollan en cisticercos dentro del hospedero, generando la cisticercosis. Los cisticercos de *T. crassiceps* son vesículas casi esféricas de aproximadamente 0.5 a 1.5 cm de diámetro con un escólex invaginado, posee cuatro ventosas y dos coronas de ganchos rostelares que varían en número de 22 a 28 y en tamaño, algunos son grandes de 155 a 187 µm y otros pequeños de 107 a 142 µm, esta particularidad es característica de la especie (Hernández M, 2012; François A *et al.*, 1998).

En infecciones naturales los cisticercos de *T. crassiceps* se encuentran principalmente en el tejido subcutáneo de roedores silvestres (Freeman, 1962); sin embargo, también se ha reportado que pueden encontrarse en las cavidades pleural y peritoneal (Freeman *et al.*, 1973; Anderson *et al.*, 1990; Bröjer *et al.*, 2002; Everhart *et al.*, 2004).

El ciclo se completa cuando los cánidos ingieren múridos infectados con cisticercos y éstos maduran dentro del intestino de los hospederos hasta convertirse en adultos.

Los cisticercos de *T. crassiceps* presentan la característica de que pueden reproducirse asexualmente (Gutiérrez Y, 2000); por lo anterior, un sólo cisticerco puede producir decenas de nuevos individuos. Para fines de investigación, lo anterior es una gran ventaja ya que experimentalmente a través de la inoculación de cisticercos vivos en el peritoneo de ratones se pueden obtener una gran cantidad de cisticercos.

Gracias a las características descritas anteriormente, *T. crassiceps* es un modelo muy usado en laboratorios de investigación (Lighthowers MW, 2002; Cardona AE y Teale JM, 2002), siendo una

de las dos especies que más han sido usadas como modelos de la cisticercosis principalmente en investigaciones inmunológicas y de NC (Cardona AE y Teale JM, 2002); debido a esto, el estudio de las enzimas de *T. crassiceps* puede aportar información muy importante para la comprensión de la cisticercosis humana y porcina.

En cuanto a la infectividad en seres humanos François A *et al.*, 1998, reportaron el caso de un hombre de 38 años inmunocomprometido (6 años con VIH), residente de Normandía que presentó cisticercos de *T. crassiceps* adheridos a las capas más profundas del antebrazo.

En el mismo artículo hacen mención de otros cuatro casos de infecciones por *T. crassiceps* en humanos:

- 1) Una joven canadiense de 17 años con retinitis causada por *T. crassiceps*.
- 2) Un hombre alemán de 33 años con SIDA al que se le encontraron cisticercos en el infiltrado paravertebral subcutáneo.
- 3) Paciente de 15 años con iridociclitis causada por *T. crassiceps*.
- 4) Hombre francés de 33 años con SIDA presentó cisticercos en el brazo.

1.6. Lípidos

Los lípidos son un conjunto heterogéneo de moléculas orgánicas insolubles en agua (hidrofóbicas) compuestas principalmente por cadenas relativamente largas de átomos de carbono, con una composición en las que predomina el carbono y el hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno (Peña A *et al.*, 2004, Teijón J M *et al.*, 2006).

Hasta cierto grado, los lípidos son una categoría general de sustancias similares únicamente por ser hidrofóbicas y sólo escasamente solubles en agua, son moléculas muy diversas, formadas por cadenas alifáticas saturadas o insaturadas, generalmente lineales, aunque algunas presentan anillos (aromáticos). Al ser hidrofóbicas sólo pueden ser extraídas de los tejidos por solventes no polares como el etanol, el éter, el cloroformo, el benceno, la acetona, etc. (Harvey R y Ferrier D R, 2011, Peña A *et al.*, 2004, Voet D *et al.*, 2009).

Un buen porcentaje de los lípidos son moléculas anfifílicas o anfipáticas; es decir, que su estructura presenta una parte apolar o hidrofóbica formada por una larga cadena de átomos de carbono unidos a átomos de hidrógeno, y otra parte polar o hidrofílica que presenta grupos polares o con cargas eléctricas, como el hidroxilo del colesterol, el carboxilo de los ácidos grasos, el fosfato de los fosfolípidos. Esta última parte a diferencia de la primera tiende a asociarse con solventes polares como el agua, lo que le da a estos lípidos ciertas propiedades de solubilidad en solventes polares.

A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos, los lípidos no son poliméricos (Voet D *et al.*, 2009). Sin embargo, gracias principalmente a su insolubilidad en soluciones acuosas y al hecho de que muchos de ellos son moléculas anfifílicas, los lípidos se agregan, por lo que generalmente se encuentran compartamentalizados formando depósitos de reservas energéticas o siendo parte de la matriz estructural de las membranas biológicas.

Las membranas biológicas están formadas por lípidos, proteínas y pequeñas cantidades de hidratos de carbono (Harvey R y Ferrier D R, 2011). Son barreras semipermeables que permiten a la célula regular el flujo de nutrientes, productos de desecho, iones, etc., entre la célula y el medio, esto lo logran haciendo uso bombas, canales y transportadores de membrana, los cuales pueden

transportar sustancias específicas en contra de un gradiente electroquímico o a favor del gradiente (Harvey R y Ferrier D R, 2011).

La célula, que es la unidad básica de la vida, está definida por la membrana plasmática que la envuelve; además, las membranas biológicas permiten organizar y dividir tanto el contenido como los procesos biológicos de las células y de las estructuras subcelulares. (Voet D, 2006).

El formar parte de las membranas biológicas es una de las principales y más importantes funciones de los lípidos en los seres vivos; sin embargo, los lípidos también cumplen diversas funciones en los organismos, de forma general las principales funciones de los lípidos en los seres vivos se pueden resumir de la siguiente manera:

- Estructural. Los fosfolípidos, los glucolípidos y el colesterol forman las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Los triglicéridos del tejido adiposo recubren y proporcionan consistencia a los órganos, las grasas que se acumulan en ciertos sitios, principalmente bajo la piel sirven como aislantes contra cambios de temperatura.
- Reservas energéticas. Los lípidos y principalmente los triglicéridos son la mayor fuente de energía de los animales.
- Función reguladora, hormonal o de comunicación celular. Algunas vitaminas liposolubles tienen funciones regulatorias o de coenzimas, y las prostaglandinas así como las hormonas esteroideas juegan un papel importante en el control de la homeostasis corporal. Muchos acontecimientos de señalización intracelular e intercelular involucran moléculas de lípidos, los eicosanoides tienen un papel destacado en la comunicación celular, inflamación, respuesta inmune, etc.

Una forma sencilla de clasificar a los lípidos es considerar sólo dos grandes grupos: los lípidos saponificables que poseen en su composición ácidos grasos y los lípidos insaponificables que no presentan ácidos grasos.

Los primeros tienen en común la propiedad de ser saponificables; es decir, que si se los calienta con una base fuerte (NaOH ó KOH), se rompe la unión del ácido graso, quedando en libertad como sal de sodio o de potasio, que es lo que se conoce como jabón. El segundo grupo comprende a aquellas moléculas que no pueden ser saponificadas; dentro de él se incluyen sustancias con las propiedades más variadas, tales como vitaminas, hormonas, etc. (Peña A *et al.*, 2004).

El principal componente de los lípidos saponificables son los ácidos grasos. Estos se conforman de largas cadenas hidrocarbonadas con diferente número de carbonos y que presentan en uno de sus extremos un grupo carboxilo (COOH). Generalmente se encuentran en forma esterificada como componentes de los diferentes lípidos y es poco probable hallarlos en forma libre.

Los ácidos grasos se clasifican en dos tipos.

- Insaturados. Son aquellos que presentan uno o más dobles enlaces en sus cadenas hidrocarbonadas.
- Saturados. Este tipo de ácidos grasos a diferencia de los insaturados no presentan dobles enlaces en sus cadenas.

La mayoría de los ácidos grasos presentan un número par de carbonos y las diferencias entre el número de átomos de carbono, la presencia o no de dobles enlaces y ciertas modificaciones que pueden existir en las cadenas hidrocarbonadas, es lo que determina las propiedades de los ácidos grasos.

A partir de los ácidos grasos, por procesos de autooxidación, pero también por efecto del estrés oxidante, se pueden originar compuestos oxidados (hidróxidos e hidroperóxidos) que posteriormente se degradan para producir alcanos, alquenes, alcadienes, aldehídos de otro tipo, cetonas, etc. Los anteriores compuestos son muy electrofílicos y fácilmente alquilan a nucleófilos celulares (grupos tioles) (Repetto M y Repetto G, 2009).

Entre los compuestos derivados de la PL, también se encuentran los dienaldehídos que son subproductos de la peroxidación de lípidos poliinsaturados que exhiben una alta toxicidad (Carvalho VM *et al.*, 2001), estos compuestos se encuentran comúnmente en los productos alimenticios y, sobre ellos tanto el National Cancer Institute como el National Toxicology Program de los Estados Unidos han expresado gran preocupación sobre el potencial genotóxico y cancerígeno de estos compuestos (Chang *et al.*, 2005).

Como ejemplo de los dienaldehídos podemos encontrar al 2,4-hexadienal, un líquido de incoloro a amarillo con un aroma cítrico que se encuentra en forma natural como un producto de la oxidación de los ácidos grasos, se utiliza como aditivo alimentario, aromatizante, material de partida o intermediario en reacciones de síntesis en la industria química y farmacéutica, fumigante e inhibidor de corrosión para el acero (National Toxicology Program, 2003).

El *trans,trans*-2,4-nonadienal (tt-NDE) es un líquido amarillo claro con fuerte olor a frutas y a grasa que es usado como saborizante en productos cárnicos (CIYUN Product data).

El *trans,trans*-2,4-decadienal (tt-DDE), es un tipo específico de dienaldehído, subproducto de la peroxidación de los lípidos poliinsaturados durante el almacenamiento, se utiliza como saborizante artificial y aromatizante, además ha sido evaluado como un inhibidor de la corrosión para el acero (National Toxicology Program, 1993).

El *ethyl-trans*-2-octenoate (et-ONE) es un Líquido incoloro con aroma frutal tropical, de forma natural se encuentra en la pera, guanábana, manzana, carambola, brandy, etc., es utilizado como aromatizante y saborizante (Burdock GA, 2010).

El aldehído más citotóxico producido a partir de peroxidación lipídica es el 4-hydroxynonenal (HNE), que se genera a partir del ácido linoleico y ácido araquidónico, éste compuesto reacciona fácilmente y forma productos estables con grupos tiol en proteínas y moléculas tales como glutatión (Esterbauer H *et al.*, 1991). El HNE exhibe una amplia gama de efectos deletéreos en células, incluyendo la alteración de la expresión génica (Esterbauer H *et al.*, 1991), la disminución del potencial de la membrana mitocondrial (Kristal BS *et al.*, 1996), y la inhibición de la síntesis de proteínas.

1.7. Metabolismo oxidante

Se entiende por metabolismo oxidante al conjunto de reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en las células de los seres vivos aeróbicos con el fin de obtener energía a través de la degradación (catabolismo) de nutrientes orgánicos como carbohidratos, proteínas, vitaminas y grasas para la producción de ATP. En este conjunto de reacciones el oxígeno tiene un papel muy importante pues es el aceptor final de electrones de una serie de cambios químicos que se llevan a cabo tanto en el citoplasma como en las mitocondrias de las células. Durante la reducción del oxígeno se pueden crear especies reactivas de oxígeno (EROS) incluso durante condiciones normales (Chance B *et al.*, 1979).

Las EROS son radicales libres que se pueden generar como subproductos del metabolismo oxidante, pero además pueden generarse por el sistema inmune durante el estallido respiratorio llevada a cabo por los macrófagos. La principal característica de los radicales libres es que son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados y generalmente son moléculas pequeñas y altamente reactivas.

Durante el metabolismo oxidante se produce la energía que posteriormente utilizarán las células para producir las moléculas que formarán parte de los órganos y los tejidos de los seres vivos. La respiración celular aeróbica requiere estrictamente el uso del oxígeno y es la forma más eficiente para producir ATP.

El metabolismo oxidante siempre se acompaña de reacciones de transferencia de electrones, estas reacciones son difíciles de controlar e involucran la generación de EROS como el anión superóxido ($O_2\bullet^-$) y el hidroxilo ($OH\bullet^-$). Las reacciones de transferencia de electrones con otras moléculas llevan a la formación de EROS secundarios como radicales peróxido, alcoxi y otros radicales orgánicos, estos radicales secundarios no son tan tóxicos y reactivos como los $OH\bullet^-$, pero inducen y promueven una reacción en cadena que conduce a la co-oxidación y peroxidación de biomoléculas (Dorado C *et al.*, 2003).

En cuanto a la producción de radicales libres por el sistema inmune, estos se generan por el estallido respiratorio que se produce al activarse los leucocitos en presencia de algunas sustancias tóxicas xenobióticas o endobióticas o antígenos de patógenos que activan al complejo NADPH oxidasa ubicado en las membranas de los leucocitos. Este complejo utiliza al NADPH para reducir el oxígeno libre y convertirlo en $\bullet O_2$ que se libera al medio para atacar a los patógenos y puede combinarse espontáneamente con otras moléculas para producir otros radicales libres.

El $O_2\bullet^-$ es catalizado por la enzima superóxido dismutasa que lo dismuta en oxígeno y peróxido de hidrógeno, el peróxido de hidrógeno posteriormente es degradado por la enzima catalasa produciendo oxígeno; sin embargo, el peróxido de hidrógeno también puede reaccionar con el hierro en la reacción Fenton, la que da como resultado la producción del hidroxilo, un radical altamente reactivo que puede inducir la peroxidación lipídica (PL).

La producción de radicales libres por parte del sistema es parte del proceso de inflamación que es una respuesta innata del organismo ante la presencia de algunos agentes tóxicos o patógenos.

La supervivencia de los seres vivos depende entre otras cosas de que estos puedan mantener un balance de óxido-reducción, en el que hay un equilibrio entre la producción de pro-oxidantes generados por el metabolismo oxidante y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance puede llevar a un estado de estrés oxidante (Beckman KB y Ames BN, 1998; Halliwell B y Gutteridge JMC, 1999; Ghadge GD *et al.*, 1997; Harman D, 1986; Rivas AS *et al.*, 2001), este término se utiliza para nombrar cualquier condición en la cual el balance de prooxidantes y antioxidantes ha sido perturbado a favor de los primeros (Sies H, 1985), en estas condiciones, los sistemas de defensa antioxidantes son incapaces de evitar la acción de los primeros, lo que produce daño e incluso la muerte celular, esto se puede apreciar en diversas patologías (Dorado C *et al.*, 2003).

El daño que pueden inducir los radicales libres en las células se puede dividir en tres categorías. (Slater TF, 1984).

- Reacciones con ácidos nucleicos, nucleótidos, polisacáridos y tioles proteicos y no proteicos (oxidación del tiol).
- Unión covalente a componentes de las membranas (proteínas, lípidos, enzimas, sistemas receptores y transportadores).
- Inicio de la PL.

Las EROS no son solamente moléculas dañinas para las células, también llevan a cabo funciones biológicas importantes como la señalización celular, en Figura 2 se presenta un resumen de las funciones y los daños que pueden causar las EROS a las células en condiciones normales y de estrés oxidante. En la imagen se muestra que una de las principales consecuencias del estrés oxidante es la inducción de la PL, cuya reacción se produce como consecuencia de la formación de radicales libres en las células y los tejidos. Además se ha sugerido que la PL de las membranas celulares es un proceso involucrado en un gran número de condiciones biopatológicas y en muchas enfermedades clínicas (Comporti M, 1993).

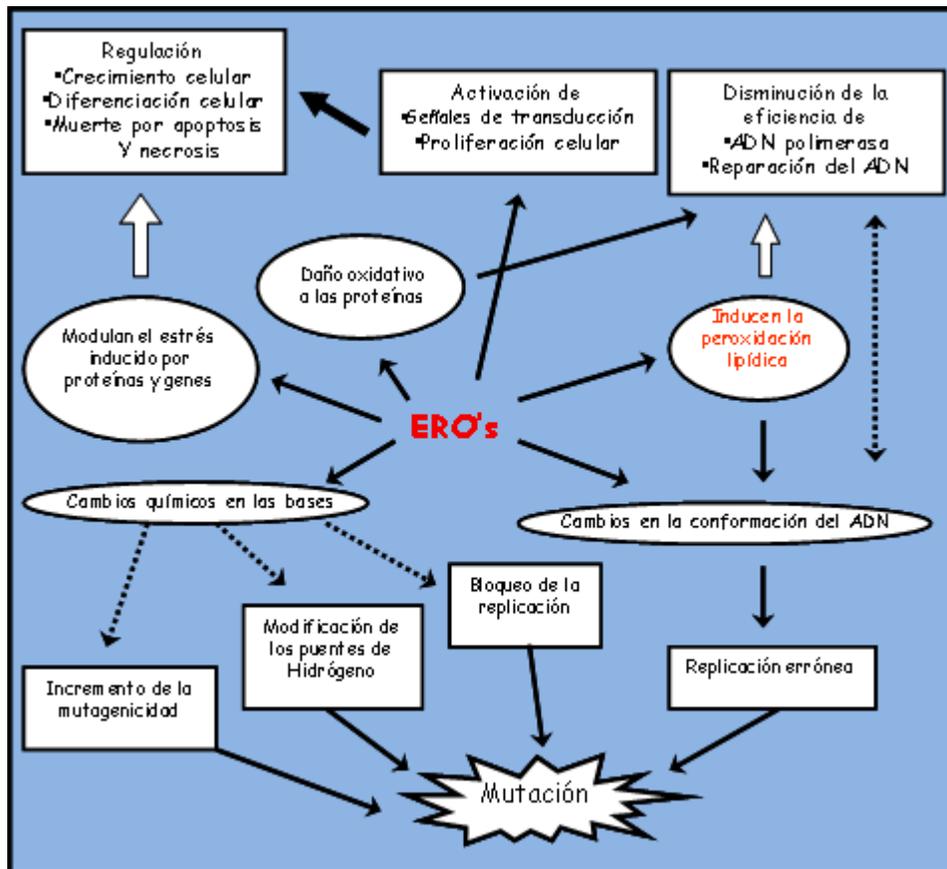


Figura 2. Enfermedades humanas y daño oxidante por EROS. Correlación entre el desequilibrio de las EROS y sus consecuencias en el crecimiento y la función celular (parte superior de la imagen); y entre el desequilibrio de las EROS y los mecanismos y vías productoras de daño oxidante en mutaciones (parte inferior de la imagen). Tomado y modificado de Matés J.M. y Sánchez-Jiménez F., 1999.

La PL es un proceso que se divide en tres fases.

- Inicio: Este paso es inducido por un radical libre que comienza la PL al sustraer un átomo de hidrógeno de un lípido. El lugar primario del ataque oxidante es el grupo metilénico adyacente a un doble enlace, lo anterior da como resultado la formación de un lípido con un carbono radical. El radical libre al unir el hidrógeno pierde su reactividad.
- Propagación: En ésta fase el lípido con el carbono radical sufre una reordenación antes de reaccionar con el oxígeno, dando lugar a la formación de radicales peróxido. Posteriormente, estos radicales extraen un hidrógeno de una molécula lipídica adyacente y forman un hidroperóxido lipídico o producto primario de la PL y generan otro carbono radical lipídico.
Estos hidroperóxidos lipídicos son muy inestables y se convierten fácilmente en productos de la peroxidación lipídica (PPL). Existen muchos isómeros de ellos cuya diferencia es su grupo funcional como aldehídos, cetos, hidroxy, epoxy y carboxy. Esta etapa se conoce como propagación y puede repetirse muchas veces.
- Término: La PL termina cuando los lípidos con carbonos radicales reaccionan con otro lípido semejante, con un lípido peroxidado, o cuando reaccionan con otro radical libre formando diferentes sustancias. Otra forma en que este proceso puede finalizar, es cuando dos lípidos peroxidados se unen liberando oxígeno.

La PL afecta principalmente a los ácidos grasos insaturados, debido a que contienen dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno cuyos hidrógenos son particularmente susceptibles de ser extraídos por los radicales libres. Los ácidos grasos saturados son relativamente estables a la oxidación (Gil A, 2010).

Para evitar el daño que generan los radicales libres, entre ellos las EROS, los organismos aeróbicos han desarrollado diferentes mecanismos de defensa. Los componentes funcionales de estos sistemas son llamados antioxidantes y de acuerdo con sus funciones se dividen en tres categorías.

1. Antioxidantes preventivos. Disminuyen la formación de radicales libres y del oxígeno activo por descomposición de hidroperóxidos o peróxido de hidrógeno (Glutación peroxidasa, Catalasa, Glutación transferasa), por apagamiento y disminución del oxígeno activo (superóxido dismutasa, carotenoides) o por secuestro de iones metálicos (apoferritina, transferrina, lactoferrina, ceruplasmina).
2. Antioxidantes radicales (limpiadores), los cuales inhiben la reacción en cadena o rompen la propagación en cadena (vitamina E, C, carotenoides, ubiquinol, ácido úrico, bilirrubina).
3. Compuestos con mecanismos de reparación proteasas (Sevanian A *et al.*, 1981).

Todos los componentes anteriores pueden formar parte del proceso de desintoxicación que es la forma en que las células hacen más solubles a ciertas moléculas para poderlas desechar, el proceso de desintoxicación está dividido en tres fases que se pueden resumir de la siguiente manera:

- Fase I. Se caracteriza por que en esta fase se llevan a cabo reacciones que añaden un grupo polar a los compuestos tóxicos, haciéndolos más solubles. La mayor parte de las reacciones efectuadas en esta fase son de óxido-reducción e hidrólisis; sin embargo, también se producen reacciones de hidratación e isomerización.

- Fase II. En esta fase, los compuestos que adquirieron un grupo funcional durante la Fase I son ahora conjugados con diversos intermediarios endógenos. La bioconjugación implica la unión de carbohidratos, proteínas, aminoácidos o compuestos con grupos de azufre o de fosfato a los compuestos tóxicos. Los intermediarios endógenos son componentes del metabolismo intermediario, presentan un tamaño molecular relativamente grande y tiene propiedades hidrofílicas. Las reacciones más comunes durante la Fase II son: glucosilación, sulfatación, metilación, acilación y adición de glutatión.
- Fase III. Es la última fase e involucra solamente a los compuestos tóxicos que han sido conjugados con el glutatión. En esta fase, la célula exporta los bioconjugados a través de la membrana. La eliminación de estos compuestos se lleva a cabo con la participación de una bomba dependiente de ATP que presenta además un sitio activo para el glutatión.

Las glutatión transferasas (GSTs) a las cuales pertenece la enzima que se estudio en este trabajo, son componentes importantes de la Fase II del metabolismo de desintoxicación.

1.8. Glutatión transferasas

Se conocen por GSTs a un grupo de enzimas que forman parte de las defensas celulares de los organismos, estas enzimas están involucradas en la desintoxicación y excreción de muchas sustancias tóxicas endobióticas o xenobióticas, y tienen como principal característica, el catalizar la adición nucleofílica del grupo tiol del glutatión reducido (GSH) a centros electrofílicos en compuestos orgánicos que pueden ser muy variados (estructuralmente diferentes), pero que tienen en común el ser mayormente hidrofóbicos y presentar un centro electrofílico (Wilce M C J y Parker M W, 1994).

El ataque nucleofílico que producen las GSTs está dirigido al nitrógeno electrofílico en los ésteres de nitrato, el azufre en los tiocinatos orgánicos y disulfuros, y al oxígeno en los hidroperóxidos orgánicos (Wilce M C J y Parker M W, 1994), en la Figura 3 se puede observar la ecuación general de la reacción de las GSTs.

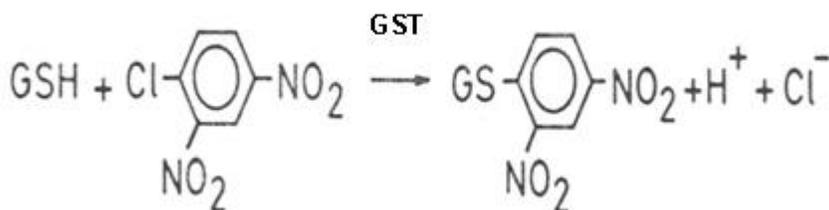


Figura 3. Representación de la reacción general de las GSTs utilizando como sustratos al GSH y al 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno $\left(\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2 \right)$.

La reacción que catalizan las GSTs es uno de los primeros pasos en la vía del ácido mercaptúrico en la cual los xenobióticos o endobióticos tóxicos son inactivados y eliminados del

organismo (Habig W H *et al.*, 1974). Las GSTs al conjugar las sustancias tóxicas (moléculas) con el GSH, las vuelven más solubles, lo que facilita la eliminación de dichas sustancias, lo anterior se pudo probar con el descubrimiento de una bomba de salida dependiente del ATP que regula la salida de conjugados de GSH de las células (Hayes J D y Wolf C R, 1990; Ishikawa T, 1992).

Se conocen dos grandes grupos de genes que codifican proteínas con actividad de glutatión transferasa (GST). El primero está formado por al menos 16 genes que codifican para proteínas citosólicas, mientras que el segundo lo conforman al menos 6 genes que codifican proteínas de membrana. En los humanos se conocen ocho distintas familias de genes que codifican GSTs solubles (Strange R *et al.*, 2001s). Los residuos Tyr-7, Pro-53, Asp-57, Ile-68, Gly-145 y Asp-152 se han encontrado en todas las secuencias conocidas de GSTs y gracias a los estudios cristalográficos se ha determinado que los dos primeros juegan un papel importante en el sitio de unión a GSH (Wilce M C J y Parker M W, 1994).

Las GSTs de mamíferos se pueden agrupar en las clases A, M, P, S, T, Z y O; esta clasificación se basa en las propiedades genéticas, bioquímicas, así como en la reacción cruzada de anticuerpos y en su estructura primaria (Hayes J D *et al.*, 2005; Mannervik B, 1985; Meyer D J *et al.*, 1991; Sheehan D *et al.*, 2001). Los monómeros de una misma clase de GSTs presentan un tamaño similar, una alta identidad en su secuencia de aminoácidos (60-80%) y diferentes pero “traslapadas” afinidades a los sustratos (Wilce M C J y Parker M W, 1994).

En general, las GSTs tienen monómeros de 23 a 28 kDa con secuencias que promedian ≈220 aminoácidos (Torres-Rivera A y Landa A, 2008). Las GSTs citosólicas se pueden encontrar en forma monomérica o heterodimérica (Wilce MCJ y Parker MW, 1994), la gran mayoría de las GSTs sólo son activas como dímeros (Strange R *et al.*, 2001). Cada monómero presenta un sitio activo que se comporta independientemente uno del otro en los dímeros (Danielson UH y Mannervik B, 1985). Cada sitio activo consiste en al menos dos sitios de unión, el primero une al GSH y es muy específico para esta molécula, mientras que en el segundo sitio de unión es para los sustratos electrofílicos y es menos específico, lo cual concuerda con la habilidad de las GSTs para reaccionar con una gran variedad de agentes tóxicos (Wilce MCJ y Parker M W, 1994).

Algunas de las GSTs además de catalizar la adición nucleofílica del GSH a centros electrofílicos en diversos compuestos, tienen actividades catalíticas secundarias como peroxidasa dependientes de selenio con hidroperóxidos orgánicos (Prohaska J R, 1980), e isomerización de esteroides (Benson A M *et al.*, 1977).

Las GSTs parecen ser ubicuas en los organismos aeróbicos y se ha argumentado que las enzimas dependientes de GSH evolucionaron en estos organismos en respuesta a la generación de subproductos tóxicos del metabolismo del oxígeno (Fahey R C y Sundquist A R, 1991). Las GSTs están implicadas en el desarrollo de la resistencia de las células y organismos hacia drogas, pesticidas, herbicidas y antibióticos (Fournier D *et al.*, 1992 Mannervik B y Danielson U H, 1988).

1.9. Glutatión transferasas en parásitos

Las principales clases de GSTs encontradas en parásitos son M, P y S, con pocos casos de las clases A y O; sin embargo, se han encontrado en ciertos parásitos GSTs citosólicas que no han sido asignadas a alguna clase. En cuanto a las diferencias entre las GSTs de mamíferos y de parásitos, ciertas GSTs parasitarias presentan particularidades en sus propiedades bioquímicas y en el grado de identidad de su estructura primaria que ameritan, según Torres-Rivera A y Landa A, 2008, la

creación de una nueva clase o clases para las GSTs que no encajan dentro de las clases propuestas para las GSTs de mamíferos, lo anterior también está basado en estudios cristalográficos.

El principal motivo para el estudio de las GSTs parasitarias es la relación de los parásitos con sus hospederos y la posible implicación de un método de control de los parásitos a través del control de las GSTs parasitarias.

La respuesta de los hospederos a los parásitos implica la producción de EROs y aunque las GSTs no actúan directamente sobre los EROS, sí lo hacen sobre los productos que éstos forman como los hidroperóxidos lipídicos o los carbonilos reactivos (Torres-Rivera A y Landa A, 2008).

1.10. Función Ligandina

Como se ha dicho, las GSTs juegan un papel importante en iniciar la desintoxicación de potentes agentes reactivos tóxicos (Boyland E y Chasseaud LF, 1969), incluyendo compuestos farmacológicamente activos y PLs entre otros (Brophy PM, *et al.*, 1989). Pero además de la ó las actividades catalíticas que pueden presentar las GSTs, estas enzimas tienen la capacidad de funcionar como transportadores intracelulares de varios compuestos hidrofóbicos (no sustratos) como bilirrubina, hemo, esteroides, hormonas tiroideas y sales biliares (Mannervik B *et al.*, 1985), a esta función acarreadora que tienen las GSTs y otras proteínas como la albúmina, se le conoce como función de ligandina.

La función de ligandina permite que las GSTs desintoxiquen pasivamente. La forma de desintoxicación activa ya ha sido explicada y ocurre cuando la enzima cataliza la conjugación del glutatión con los productos tóxicos. La forma pasiva o función de ligandina de las GSTs consiste en que estas enzimas pueden unir ligandos tóxicos en un sitio diferente al sitio activo y transportarlos en el citoplasma de la célula.

Las GSTs fueron originalmente denominadas “ligandinas” por su afinidad por aniones orgánicos como los ligandos anteriormente mencionados (Ketterer *et al.*, 1971), es tan grande el número y la variedad de ligandos que pueden unir las GSTs que se ha sugerido que tienen una función acarreadora similar a la de la albúmina pero en el citoplasma. Hay evidencias sugerentes que tanto los cestodos, digeneos y nematodos pueden proteger sus membranas de la PL, a nivel de hidroperóxidos y compuestos carbonilos originados por la respuesta inmune de sus huéspedes y que esta protección es mediada por enzimas dependientes de glutatión (Brophy PM y Pritchard D I, 1992).

A nivel estructural se sabe que las GSTs poseen un solo sitio (sitio L) por dímero de alta afinidad para la unión de ligandos aniónicos hidrofóbicos y que está presente en la hendidura formada por las dos subunidades (Sluis-Cremer *et al.*, 1996).

1.11. Espectroscopia UV/Vis y fluorescencia

Con el término espectroscopia se pueden agrupar a una serie de métodos que estudian la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. El análisis espectroscópico se basa en detectar la radiación electromagnética a ciertas longitudes de onda y se relaciona con los cambios de energía que la radiación electromagnética provoca en la materia.

En la literatura se pueden encontrar diferentes definiciones para la radiación electromagnética Clavijo A (2002), la define como una forma de energía radiante la cual exhibe

propiedades tanto ondulatorias como de partícula, por su parte Meliá J (1991) la define como una forma de energía, consistente en campos electromagnéticos, que se propagan mediante ondas, transportando cantidades discretas (cuantos ó fotones) de energía.

De forma general podemos describir a la radiación como una forma de energía, consistente en campos electromagnéticos, que se propaga mediante ondas, transportando cantidades discretas de energía. Cuando la radiación electromagnética es considerada una onda se pueden medir ciertas propiedades de ésta como, longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud. Al no necesitar de un medio para transmitirse la radiación electromagnética se propaga fácilmente en el vacío a velocidades muy altas. Por otro lado, debido a que el modelo ondulatorio no explica de forma satisfactoria el comportamiento de la radiación electromagnética (procesos asociados con la absorción y la emisión de la energía radiante), ésta también se puede considerar como partículas ó paquetes discretos de energía llamados fotones ó cuantos.

La radiación electromagnética puede manifestarse de diversas formas dependiendo de su longitud de onda (Figura 4) y los principales procesos involucrados con ella son: Absorción, transmisión, dispersión, difracción y reflexión.

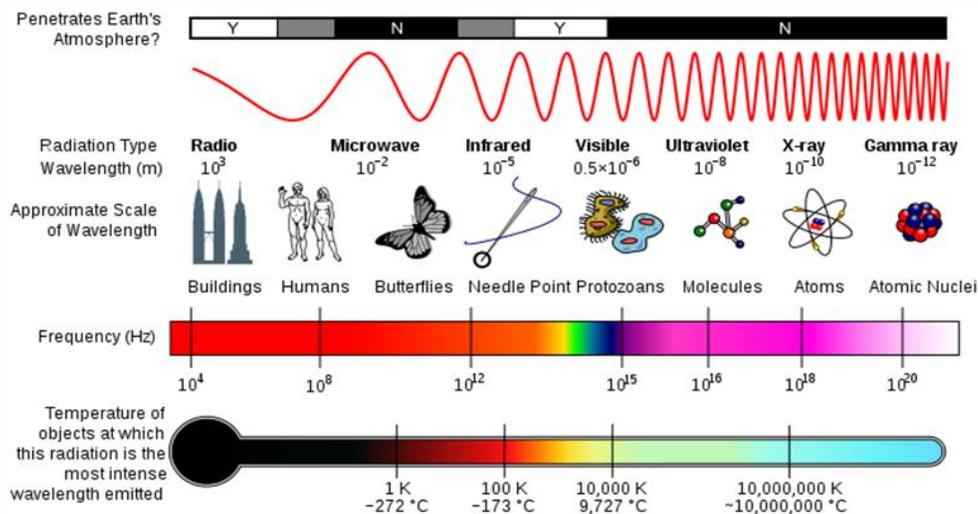


Figura 4. Espectro electromagnético con escalas de longitud de onda y frecuencia.

Las ondas electromagnéticas se describen fundamentalmente mediante tres propiedades físicas.

- Frecuencia (ν): Número de ciclos ondulatorios que pasan por un punto fijo en un segundo, esta se mide en hercios.
- Longitud de onda (λ): Distancia entre dos puntos iguales de la onda (picos o valles).
- Energía (del fotón) (E)

λ es inversamente proporcional a la frecuencia ν y a la energía E

$$E = h \nu \qquad \nu = \frac{c}{\lambda} \qquad E = \frac{hc}{\lambda} \qquad h = \text{Constante de Planck}$$

Dependiendo de la longitud de onda, la radiación electromagnética interactúa con la materia a distintos niveles:

- Nuclear
- Atómico
- Molecular (electrónico, vibracional, rotacional, etc.)

Esta capacidad de interactuar con la materia se ha tomado en cuenta para desarrollar diferentes métodos que se caracterizan por medir la absorción, emisión y transmisión de la radiación electromagnética (fotones) en función de la longitud de onda y con ello poder obtener un espectro característico de los constituyentes de la materia con el cual se pueden estudiar diferentes características de la misma.

El espectro que genera la materia en su interacción (excitación) con la radiación electromagnética se debe a transiciones entre los estados de energía de los átomos o moléculas que componen la materia. Los análisis que se realizan con estos métodos tienen diversas aplicaciones en diferentes disciplinas científicas y se pueden clasificar de la siguiente manera, basándose en la intensidad de lo que miden.

- De Absorción: La muestra se somete a radiación para medir la cantidad de radiación absorbida por la muestra.
- De Emisión: La muestra se expone a una radiación que aumenta su contenido energético llevándola al estado de alta energía (excitado), parte de la energía en exceso se pierde en forma de radiación siendo ésta la que se mide.
- De Dispersión (Scattering): Se mide la radiación transmitida en todas las direcciones a partir de la trayectoria inicial.

Otra forma de clasificar a los métodos espectroscópicos, es de acuerdo con la región del espectro electromagnético que utilizan, ver Figura 4.

La radiación electromagnética puede interactuar con la materia en tres formas distintas.

- Choque elástico: Existe sólo un cambio en el impulso de los fotones al interactuar estos con la materia. Los rayos X son un ejemplo de este tipo de interacción.
- Choque inelástico: En este caso, los fotones al interactuar con la materia son dispersados a frecuencias inferiores, que la frecuencia de los fotones incidentes, lo cual implica una disipación de la energía. Un ejemplo es la dispersión Raman.
- Absorción: En este proceso la energía de los fotones se transfiere a los átomos, iones o moléculas que componen la materia, esto provoca que dichas partículas pasen de su estado fundamental de mínima energía a un estado excitado de mayor energía (transición electrónica), posteriormente la materia pasa a un estado de relajación al liberar energía para regresar al estado de mínima energía. A este tipo de interacción pertenecen la espectroscopia UV-Vis y la fluorescencia.

Para que el proceso de absorción se lleve a cabo, es necesario que la energía de los fotones que incidan sobre la materia coincida exactamente con la diferencia de energía existente entre su estado fundamental y alguno de los estados excitados.

La excitación puede consistir en alguno de los siguientes procesos (Skoog D A y West D, 2002):

- Transición de un electrón a un nivel energético superior
- Cambio en el modo de vibración de la molécula
- Alteración en su modo de rotación

Cada una de estas transiciones requiere una cantidad definida de energía, y el estado de excitación que generan, sólo durará un tiempo muy breve, antes de perder parte de su energía, o toda ella, por intercambio con otra partícula o por emisión de un fotón.

Uno de los métodos espectroscópicos más utilizados en el estudio de las enzimas es la espectroscopia UV-Vis, en éste tipo de espectroscopia la muestra se irradia con radiación ultravioleta-visible lo que produce diferentes transiciones electrónicas Figura 5. Con éste método lo que se mide es la cantidad de radiación absorbida por la muestra.

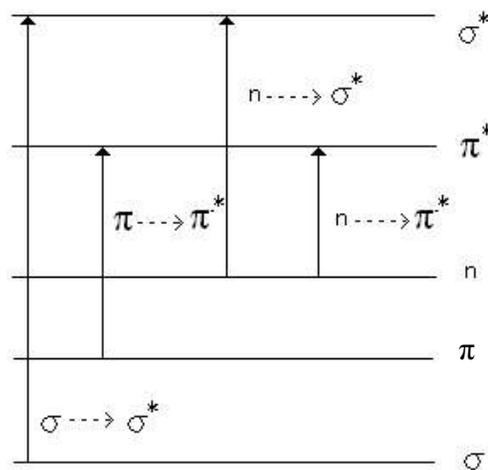


Figura 5. Diagrama de niveles energéticos para diferentes orbitales moleculares y las transiciones posibles en éstos.

Mientras mayor sea la energía requerida para una determinada transición, menor es la longitud de onda de la radiación que debe suministrarse para conseguir tal fin. Las transiciones más favorecidas son entre el orbital ocupado de energía más alta (HOMO) y el orbital desocupado de energía más baja (LUMO).

En la espectroscopia UV-Vis se utilizan diferentes términos que es conveniente definirlos.

- Absorbancia: Atenuación de los fotones a medida que atraviesan una muestra.
- Espectro de absorbancia: Gráfica de la absorbancia de la radiación electromagnética producida por la muestra en función de la longitud de onda en el rango del ultravioleta o la luz visible.
- Emisión: Liberación de un fotón cuando una muestra recupera su estado de menor energía desde un estado de mayor energía.

Para analizar los datos de absorbancia que genera la espectroscopia UV-Vis se hace uso de la ley de Lambert-Beer, ésta se basa en que la cantidad de luz que sale de una muestra es disminuida por tres fenómenos físicos.

1. La cantidad de material de absorción en su trayectoria (concentración)
2. La distancia que la luz debe atravesar a través de la muestra (distancia de la trayectoria óptica)
3. La probabilidad de que el fotón de cierta longitud de onda sea absorbido por el material (coeficiente de absorción o de extinción molar del material)

Tomando en cuenta lo anterior, la ley de Lambert-Beer nos indica que cuando un rayo de luz monocromática pasa a través de un medio absorbente, su intensidad disminuye exponencialmente a medida que aumenta la concentración de la sustancia absorbente en el medio y lo mismo sucede con respecto a la longitud del cuerpo que la luz atraviesa; dicho en otras palabras, la absorbancia de una solución aumenta conforme aumenta la concentración de la solución o la longitud del cuerpo que atraviesa.

La espectroscopia UV-Vis presenta ciertas complicaciones para obtener información sobre los compuestos cuando no presentan un cromóforo o instauraciones que sean visibles en ésta región; además, obtener un espectro UV-Vis implica que la sustancia a estudiar sea disuelta y por lo tanto la naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura y la concentración de electrolitos, puede influir en los espectros de absorción de los compuestos. En la práctica, la espectroscopia UV-Vis esta limitada a longitudes de onda superiores a 200-220 nm y no proporciona una prueba específica para ningún compuesto.

Por otro lado la espectroscopia UV-Vis es muy efectiva para determinar la concentración de las sustancias, utilizando de la ley de Lambert-Beer que se describió anteriormente. El cálculo de la concentración de sustancias con la espectroscopia UV-Vis presenta grandes ventajas, como una alta sensibilidad y selectividad, es una metodología fácil de realizar, y la ventaja de que muchas sustancias orgánicas e inorgánicas absorben a longitudes de onda que corresponden a la espectroscopia UV-Vis, las sustancias que no absorben por sí mismas a estas longitudes de onda, pueden ser tratadas químicamente para hacerlo.

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica que nos permite estudiar una gran variedad de procesos moleculares, como cambios conformacionales, estructura e interacciones entre moléculas (ligandos y fluoróforos) (Lakowicz J R, 2006). A diferencia de la espectroscopia UV-Vis, en la espectroscopia de fluorescencia se miden transiciones desde el estado excitado al estado basal.

La fluorescencia se produce cuando algún compuesto absorbe selectivamente la luz dependiendo de su longitud de onda, esto provoca que un electrón de dicho compuesto transite de un estado de menor a mayor energía, a este proceso se le conoce como excitación y es seguido por el proceso de emisión; en el cual, debido a que los estados excitados son inestables los electrones regresan a su estado fundamental y en el proceso desprenden energía en forma de radiación (Stryer L, 1968), a ésta radiación se le conoce como luminiscencia y se puede dividir en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia.

De forma general, mecanismo físico que rige la luminiscencia es el mismo tanto para la fluorescencia como para la fosforescencia, no obstante presentan ciertas diferencias que hacen que el tiempo que dura la emisión de energía sea diferente en cada categoría. Con respecto a lo anterior la fosforescencia se caracteriza por tener un retraso temporal entre la absorción y la emisión de energía, además de que emite energía durante períodos prolongados; mientras, que en la fluorescencia la emisión de energía es prácticamente instantánea y cesa inmediatamente

después de que la muestra o compuesto deja de recibir la radiación (10^8 seg^{-1}) (Lakowicz J R, 2006).

La fluorescencia se ve influida por ciertos factores como la estructura del compuesto fluorescente, los compuestos que presentan grupos aromáticos presentan una fluorescencia más intensa que los que no los presentan. La temperatura también influye en la intensidad de la fluorescencia, un aumento de la temperatura disminuye la intensidad de la fluorescencia, puesto que al aumentar la frecuencia de las colisiones con una temperatura elevada, la probabilidad de desactivación no radiante aumenta. El pH afecta la fluorescencia debido a que la longitud de onda y la intensidad de la emisión son diferentes para la forma ionizada y no ionizada de los compuestos, otro aspecto que modifica la intensidad de la fluorescencia es la polaridad del solvente, el cual se reacomoda al excitarse el compuesto modificando la energía del estado excitado (Stryer L, 1968).

A las moléculas que presentan un espectro de absorción y de emisión bien definidos se les conoce como fluoróforos y se pueden dividir en dos grandes clases:

1. Intrínsecos. Se encuentran de manera natural e incluyen a los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano), NADH. Flavinas y derivados del piridoxal y clorofila.
2. Extrínsecos. Son moléculas que se agregan a las muestras para proveer fluorescencia cuando ésta no ocurre de manera natural o para cambiar las propiedades del espectro de la muestra. Algunos ejemplos son la fluoresceína, la rodamina, entre otras (Lakowicz J R, 2006).

Un proceso importante en el estudio de la fluorescencia es el llamado apagamiento o quenching, el cual puede ocurrir por diferentes procesos como el apagamiento colisional que depende del contacto entre la molécula excitada con el apagador, el apagamiento estático, en el cual los fluoróforos pueden formar complejos no fluorescentes con el apagador, además de estos procesos, el apagamiento también se puede dar por mecanismos no moleculares (Stryer L, 1968).

La fluorescencia es una técnica que puede darnos muchos datos acerca de la función y estructura de las proteínas, esto se facilita gracias a la presencia de fluoróforos intrínsecos en las proteínas como son los aminoácidos aromáticos ver Tabla 1. Generalmente el aminoácido que aporta más intensidad a la fluorescencia de las proteínas es el triptófano, algunas sustancias como yoduros, oxígeno, acrilamida, succinimida entre otros pueden funcionar como apagadores del triptófano (Lakowicz JR, 2006; Stryer L, 1968).

Además de lo anterior, el apagamiento intrínseco de las proteínas también se puede dar por la adición de ciertas moléculas que al unirse a las proteínas evitan el paso de la radiación electromagnética y, por lo tanto, no permiten la excitación ó la emisión de radiación por parte de los fluoróforos de las proteínas.

Tabla 1. Longitudes de excitación y emisión de los aminoácidos aromáticos.

| Aminoácido | Excitación (λ_{ex}) nm | Emisión (λ_{em}) nm |
|---------------------|--|---|
| Fenilalanina | 260 | 282 |
| Tirosina | 275 | 304 |
| Triptófano | 295 | 353 |

2. Justificación

Como se dijo anteriormente el cestodo *T. solium* es un helminto parásito del hombre y del cerdo que en su forma tisular puede provocar la NC cuando se aloja en el SNC (Escobar, A. 1983). La NC es una enfermedad que puede ser crónica, en ocasiones mortal pero también asintomática cuando no provoca una respuesta inflamatoria en el hospedero. Un hecho importante de cualquier proceso inflamatorio es la producción de EROS y nitrógeno capaces de perjudicar a los tejidos y moléculas que rodean al sitio de la inflamación (Bartsch H, Nair J. 2005; Halliwell B, Chirico S. 1993). Estas especies pueden inducir la PL que es un factor importante en la patofisiología de la NC. La PL afecta a las membranas celulares provocando el daño de su función y eventualmente la ruptura membranal (Hardy P *et al.*, 2005).

Para amortiguar este efecto oxidante, los organismos cuentan con moléculas y enzimas antioxidantes (Callanhan, *et al.* 1988). En especial, las enzimas GSTs (EC 2.5.1.18) juegan un papel importante en la desintoxicación de potentes agentes reactivos tóxicos (Boylard E, Chasseaud LF. 1969). En *T. solium* no se sabe si la principal GST citosólica (26.5 kDa) presente en este parásito, tiene alguna acción catalítica o de ligandina, sobre la desintoxicación de los PLs.

En el laboratorio se ha purificado y caracterizado bioquímica y cinéticamente a la glutatión transferasa de 26.5 kDa de cisticercos de *Taenia solium* (Ts26GST) (Plancarte *et al.*, 2004). Sin embargo, no se tiene información sobre su capacidad para conjugar o unir no catalíticamente a los PLs y, en caso de unirlos pasivamente, el destino de los mismos. Esta demostración sugeriría una contribución de esta enzima para evitar la PL originada por la respuesta inmune del huésped, así como conocer el mecanismo activo que emplea la enzima para realizarlo.

2.1. Objetivo general

Demostrar cuantitativamente la capacidad tanto de la Ts26GST como de la glutatión transferasa de cisticercos de *Taenia crassiceps* (TcGST) de unir y/o catalizar PPL.

2.2. Objetivos particulares

- Estandarizar los procedimientos espectrofotométricos y fluorométricos para el análisis de la unión de los PPL a las GSTs.
- Determinar la constante de disociación (K_D) de diversos PPL sobre las enzimas por procedimientos fluorométricos.
- Determinar la constante de inhibición (K_i) y tipo de inhibición catalítica de los diversos PPL sobre las enzimas.
- Desarrollar estudios de competencia por los sitios de unión de las enzimas para la hematina con el 8-anilino-1-naftalen sulfonato (ANS).

3. Materiales y métodos

Este trabajo se divide en dos partes. La primera fue la obtención de las GSTs que se realizó con procedimientos generales de purificación de proteínas nativas como lo indica la Figura 6. La segunda parte del trabajo se llevó a cabo con las enzimas purificadas y consistió en evaluar si las GSTs podían ligar o catalizar a diversos PPL, esto último se hizo a través de ensayos de fluorescencia y enzimáticos.

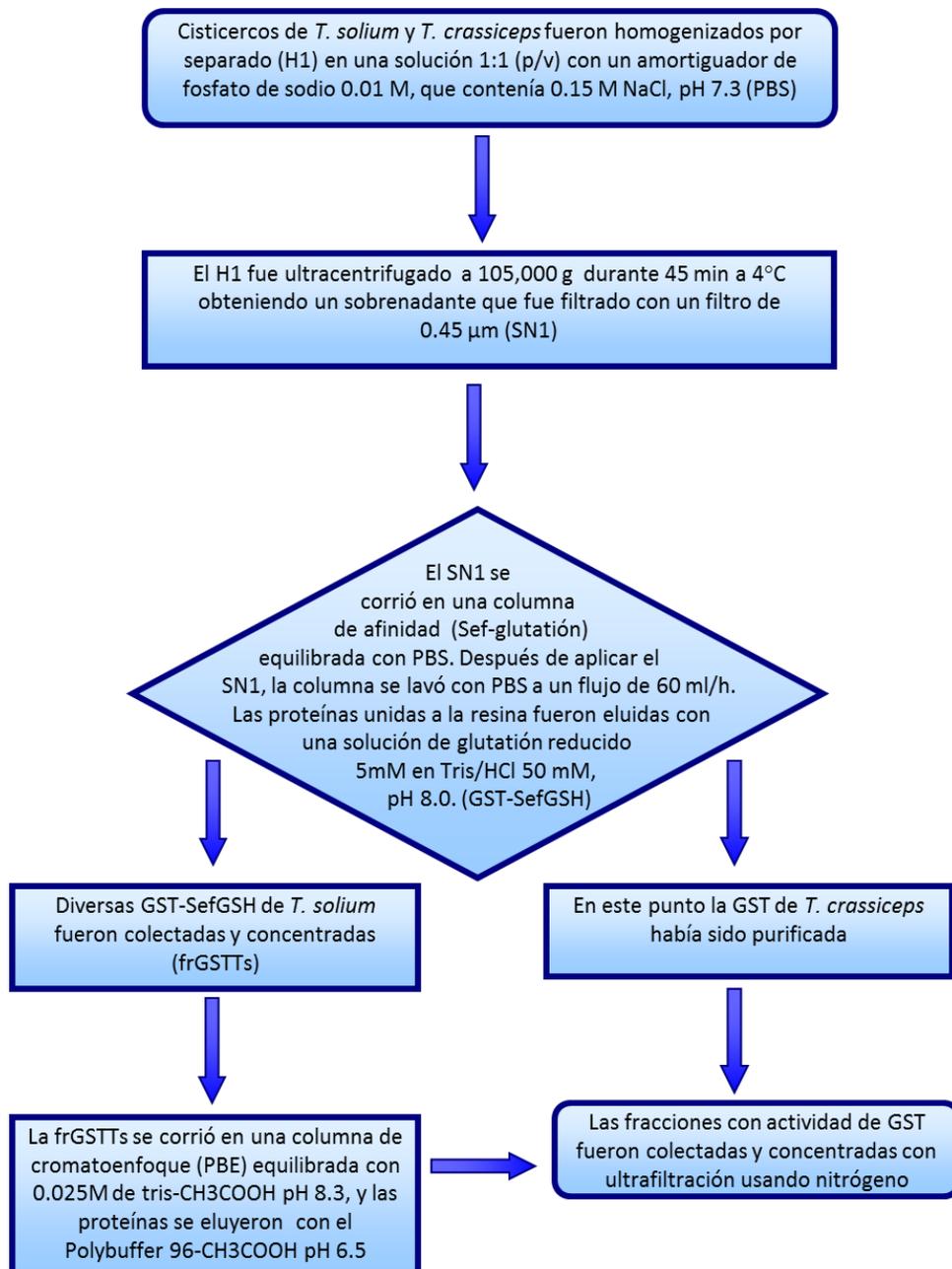


Figura 6. Procedimiento general para la obtención de la Ts26GST y la TcGST.

3.1. Obtención de cisticercos

Los cisticercos de *T. solium* se disecaron de músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente sin ninguna distinción en cuanto a sexo, edad, peso o procedencia. Los cisticercos de *T. crassiceps* cepa HYG se obtuvieron del peritoneo de ratones de la cepa BALB/c que fueron infectados experimentalmente, los ratones se infectaron sin distinción de sexo pero todos fueron menores de 9 semanas de edad al momento de infectarlos.

En ambos casos los cisticercos al extraerse fueron lavados con PBS pH 7.3 y después se les retiró la mayor cantidad posible de PBS antes de congelarlos a -70°C hasta su utilización.

3.2. Purificación de enzimas, obtención del extracto crudo

3.2.1. Homogenización de cisticercos

Para la obtención de las GSTs, el primer paso consistió en homogenizar a los cisticercos adicionando a estos una solución 100 mM de fosfatos en 0.15 M de cloruro de sodio pH 7.3 (PBS) en una proporción 1:1 (gr:ml). El homogenado se realizó con un Polytron (Brinkmann Instruments) a 1,500 rpm, realizando ciclos de un minuto de homogenado por otro de descanso hasta obtener una solución homogénea. Para evitar la degradación de las proteínas, se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en una concentración de 100 μM y la muestra se mantuvo a una temperatura aproximada a los 6°C .

3.2.2. Obtención proteínas solubles (sobrenadante del extracto crudo)

La obtención de este sobrenadante se realizó de la siguiente manera. Brevemente, el homogenado de cisticercos se centrifugó a 105,000 g por 45 minutos, a 4°C en una ultracentrífuga L8-60M (Beckman). El precipitado se desechó y el sobrenadante se recuperó para continuar con la obtención de las enzimas.

3.2.3. Filtración

El sobrenadante que se recuperó de la centrifugación se filtró con un filtro de 45 μm (Millipore) antes de pasarlo por la cromatografía de afinidad.

3.3. Cromatografías y obtención de la muestra de ensayo

3.3.1. Cromatografía de Sefarosa-glutati6n

La resina Sefarosa-glutati6n (Sef-GSH) de GE Healthcare es una resina de afinidad que presenta un grupo GSH unido a una matriz de sefarosa, al pasar el sobrenadante por esta resina, aquellas enzimas que presenten un dominio de uni6n al GSH se quedan unidas a la resina, posteriormente estas enzimas pueden ser desprendidas con la adici6n de GSH. La cromatografía de Sef-GSH se realizó como se indica a continuaci6n.

En una columna de vidrio (Pharmacia Biotech) de 40 x 3 cm se empaquetaron 25 ml de Sef-GSH. Posteriormente la resina se lavó con 100 ml de etanol al 70% y 100 ml de PBS pH 7.3. Consecutivamente la resina se activó con cambios alternos de Tris-HCL 0.1 M, NaCl 0.5 M (pH 8.5) y acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.5 M (pH 4.5) en tres ciclos, al término de los ciclos la resina se lavó y equilibró con 100 ml de PBS (pH 7.3).

Con la columna preparada y la resina activada y equilibrada, el sobrenadante filtrado se pasó por la columna con un flujo de 1 ml/min, inmediatamente se lavó la resina con PBS (pH 7.3) hasta retirar todo lo que no se había unido a la Sef-GSH. A las fracciones obtenidas de esta manera se les da el nombre de fracciones excluidas y contienen todo aquello que no se unió a la resina.

Para desprender a las GSTs de la resina, la columna se lavó con 40 ml de GSH 5mM en Tris-HCL 50 mM (pH 8). Las fracciones obtenidas después de adicionar el GSH se conocen como fracciones eluidas pues lo que hace el GSH es eluir todo lo que se unió a la resina y por lo tanto en estas fracciones podemos encontrar a las GSTs.

La presencia o ausencia de proteínas en las fracciones eluidas y excluidas de la cromatografía se determinó midiendo la absorbancia de estas fracciones a 280 nm con un espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Biosciences).

A partir de esta cromatografía se obtuvo la Tc26GST pura para el caso de *T. crassiceps* y una mezcla de tres isoformas de GST para las muestras de *T. solium*.

3.3.2. Cromatoenfoque

Para obtener la isoforma de 26.5 kDa de *T. solium* en forma pura, las fracciones con GSTs que se obtuvieron de la cromatografía de Sef-GSH se pasaron por un cromatoenfoque en una resina de Polybuffer exchanger 94 (PBE-94) de Amersham Pharmacia Biotech.

La resina PBE-94, equilibrada en un amortiguador a pH 8.4, es un intercambiador iónico que permite que dentro de la columna el pH se vaya modificando conforme la resina se lava con el amortiguador de elución, ajustado a pH 7. El cambio de pH siempre es de mayor a menor valor, en nuestro caso fue de pH 8.4 a 7; las proteínas, que se adicionan a la columna antes de que se pase el amortiguador de elución sólo avanzan dentro de la resina al sitio en donde el pH es igual al de su punto isoeléctrico (pI) hasta que logran salir de la cromatografía.

Esta resina nos permite separar isoformas que presenten diferente pI y la manera de llevar a cabo el procedimiento se describe a continuación:

En una columna de vidrio (Pharmacia Biotech) de 18 x 1 cm se empaquetaron 17 ml de la resina de PBE-94, la resina se lavó con 80 ml de NaCl 1M y se equilibró con 500 ml de Tris-HCL 25 mM pH 8.4. La muestra que anteriormente se había dializado con el amortiguador de equilibrio, se adicionó a la columna y posteriormente, ésta se lavó con el amortiguador de elución Polybuffer96-HCl 1:13 (pH 7) a un flujo de 0.2 ml/min.

Cada fracción que se obtuvo en esta cromatografía se le midió el pH y se le determinó la presencia de proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm.

Las cromatografías se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo BioLogic LP y un colector BioLogic BioFrac Fraction Collector, (BIO-RAD).

Para verificar la presencia de las GSTs en las fracciones seleccionadas de ambas cromatografías, se realizaron ensayos de actividad enzimática para la GST (Sección 3.6.2.).

3.3.3. Concentración y diálisis

Las fracciones con actividad de GST se juntaron y concentraron en un sistema de filtración por presión negativa usando nitrógeno gaseoso (Amicon, Millipore) a 4°C.

Las muestras concentradas se dializaron utilizando el mismo sistema de filtración por presión negativa; para esto, a la muestra concentrada a un volumen de ≈2 ml se le adicionó un volumen 40 veces mayor de PBS (pH 7.3) filtrado y desgasificado, posteriormente todo se volvió a concentrar a un volumen de ≈2 ml.

3.4. Electroforesis en gel de acrilamida

Las muestras concentradas que se obtuvieron de las cromatografías de Sef-GSH y del cromatoenfoque, se analizaron utilizando la técnica SDS-PAGE en geles de poli(acrilamida) al 15%. El gel se cargó con las muestras eluidas y se corrió a 105 volts y 30 mAmp.

Al terminar la electroforesis, los geles se tiñeron sumergiéndolos durante media hora en una solución de 1.25 gr de azul de Coomassie en 454 ml de metanol al 50% y 46 ml de ácido acético al 7%. Posteriormente, el gel se lavó con una solución de ácido acético al 10% en agua destilada; se realizaron varios cambios de esta solución hasta que se obtuvo una imagen clara de las bandas proteicas con un fondo transparente.

El peso molecular de las bandas proteicas de las diferentes muestras se determinó comparándolos con marcadores de peso molecular (Amersham Biosciences 17-0446-01).

3.5. Análisis de péptidos

Las electroforesis en geles de poli(acrilamida) indicaron la presencia de una banda ≈25 kDa en las muestras que se obtuvieron de las diferentes cromatografías. Debido a que las subunidades de las GSTs pesan aproximadamente este valor, se decidió analizar esta banda en cuanto a su composición de péptidos.

El análisis de péptidos por espectrometría de masas fue realizado por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández.

3.6. Análisis espectrofotométricos

La fluorescencia intrínseca de las GSTs es el resultado de la excitación de los anillos aromáticos en los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano, nos permitió obtener datos cuantitativos de las interacciones entre las GSTs y diversos compuestos como los dinaldehídos, la hematina, el ANS y otros, bajo diferentes condiciones experimentales. Las diferencias de la medida de la fluorescencia entre las enzimas libres y los complejos enzima-ligando, nos permitieron establecer las constantes de asociación de estas uniones y por lo tanto, la capacidad de las enzimas para unirse a diversos ligandos. Adicionalmente, con los valores obtenidos por este procedimiento, se establecieron los valores estequiométricos de la unión de los complejos enzima-ligando.

Por otro lado, el análisis espectrofotométrico del cambio de absorbancia a 340 nm del 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) por la acción de la enzima, nos permitió estudiar la actividad

enzimática de las GSTs y en particular el efecto inhibitorio que ejercieron los ligandos sobre la enzima al unirse a ella y formar el complejo enzima-ligando. Los parámetros inhibitorios que se analizaron con este método fueron la inhibición al 50 % (I_{50}), el tipo de inhibición y la K_i .

3.6.1 Fluorescencia

Como se mencionó, el cambio en la fluorescencia intrínseca de las enzimas y de los complejos enzima-ligando nos permitieron determinar las constantes de asociación de estos complejos; específicamente, lo que se midió al hacer este tipo de ensayos fue el apagamiento de la fluorescencia intrínseca (aminoácidos aromáticos) de las enzimas al formar complejos con los ligandos.

De forma general, los ensayos de fluorescencia se realizaron de la siguiente manera: en una celda de cuarzo se colocó una concentración conocida de GST disuelta en PBS (pH 7.3) filtrado y desgasificado, obteniendo un volumen final de 600 μ l. La celda se colocó en un espectrofluorómetro LS 45 (Perkin Elmer) y se midió su fluorescencia excitando a 280 nm y leyendo la emisión fluorescente en un rango de 300 a 500 nm. Posteriormente, a esta solución se le fue adicionando concentraciones crecientes del ligando, con cada adición del ligando, la solución se mezcló y se leyó la fluorescencia en las condiciones descritas anteriormente.

A partir de esta metodología se obtuvieron gráficas como las de la Figura 7 en la que se ejemplifica el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las GSTs por la adición de cantidades crecientes de ligando al ensayo.

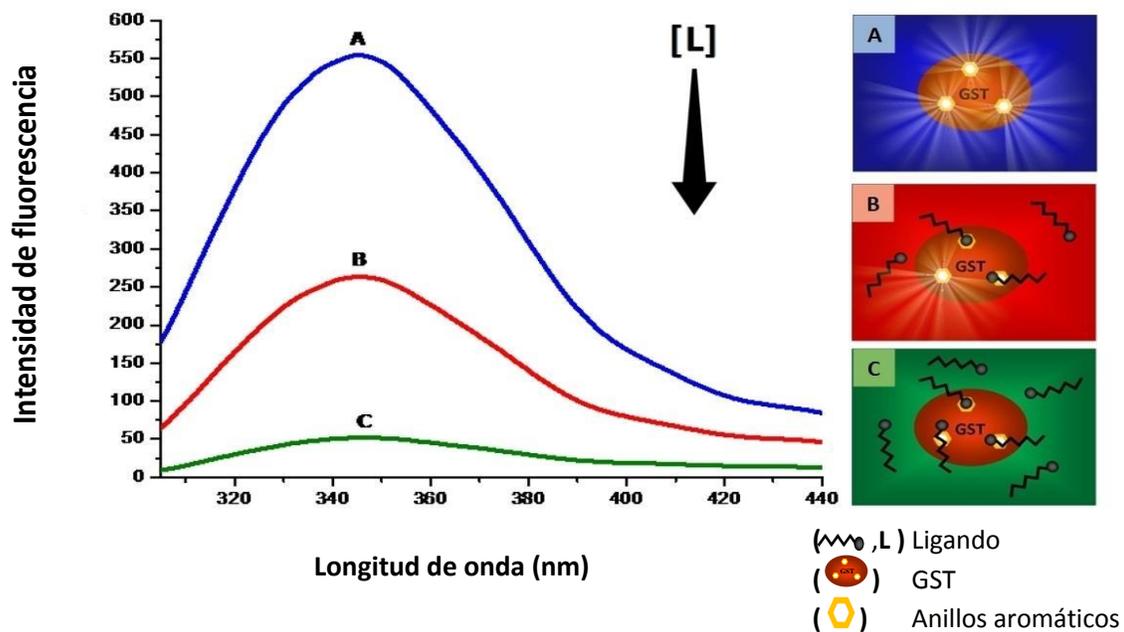


Figura 7. Gráfica que ilustra el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las GSTs por acción de la unión de los ligandos a la enzima, los ligandos obstruyen la fluorescencia de los anillos aromáticos de los aminoácidos. (A) Enzima sin ligando, el apagamiento de la fluorescencia aumenta conforme se adicionan cantidades crecientes de ligando al ensayo (B)<(C).

Una vez que se obtuvieron gráficas como las de la Figura 7 se utilizó el valor más alto de intensidad de fluorescencia de cada una de las curvas para continuar con la determinación de la K_D . El valor más alto de intensidad de fluorescencia se encontró regularmente entre los 348 y los 353 nm.

Con los valores de intensidad de fluorescencia se procedió a calcular la proporción de la fluorescencia $Y = 1 - (F/F_T)$, donde F es la fluorescencia de la solución de enzima con inhibidor y F_T es la fluorescencia de la proteína sin inhibidor. Posteriormente, se graficaron los valores de Y frente a la concentración de ligando, y se analizaron con la Ecuación 1 tomada de González EG, 2004. Esta ecuación representa una función que relaciona la fluorescencia de una solución de proteína con la concentración total de inhibidor en este caso ligando (x); la obtuvieron a partir de la definición de K_i , asumiendo que las intensidades de fluorescencia de la enzima libre y del complejo enzima-ligando se modifican conforme se añade dicho ligando y considerando que las concentraciones de ambos están relacionadas con la K_D en una proporción 1:1.

$$Y = \left(\frac{\alpha}{2E_t} \right) \left[(E_t + x + K_D) - \sqrt{(E_t + x + K_D)^2 - 4xE_t} \right] \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde x es la concentración total de ligando, E_t representa el número total de sitios de unión de la enzima, α es la constante de apagamiento (valor asintótico al cual tiende Y a altos valores de x) y K_D es la constante de disociación. Con esta ecuación es posible determinar simultáneamente el valor de los parámetros K_D , E_t y α .

3.6.2. Ensayos enzimáticos

La actividad enzimática de la GST se determinó por el método de Habig *et al.*, 1974 empleando como sustratos al GSH y al CDNB. El ensayo consistió en mezclar en un tubo de ensayo, una cantidad conocida de GST en el amortiguador de ensayo K_2HPO_4 100 mM, EDTA 1 mM, (pH 6.5). Posteriormente, se le agregaron 1 mM de GSH y 1 mM de CDNB para iniciar la reacción, la solución se agitó y se leyó su absorbancia a 340 nm, todos los ensayos se realizaron en un volumen de 1 ml.

La actividad de la GST se observó siguiendo la absorbancia del CDNB a 340 nm debido a la conjugación de éste con el GSH como resultado de la acción de la enzima. La reacción se dejó desarrollar por un minuto registrando los cambios de absorbancia en función del tiempo.

Los datos obtenidos de los ensayos enzimáticos se utilizaron para construir gráficas del cambio de absorbancia en función del tiempo (ΔABS). De estas gráficas se obtuvo el valor de la pendiente (m) que es igual al ΔABS por tiempo, este ΔABS está dado por los 20 μl de muestra utilizada en cada ensayo. Para obtener el ΔABS por ml necesitamos dividir 1 ml entre la cantidad de muestra utilizada (1 ml/20 μl), lo que nos da como resultado 50, este valor se multiplicó por el ΔABS (Ecuación 2) y así obtenemos el $\Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$. Ahora, el resultado obtenido de la Ecuación 2 se dividió entre la concentración de la GST en mg/ml, empleada en el ensayo para obtener el $\Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Ecuación 3).

$$(\Delta ABS \text{ min}^{-1}) 50 = \Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\frac{\Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ ml}^{-1}}{\text{Enzima mg/ml}} = \Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Con el valor de $\Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Ecuación 3 se calculó la actividad específica de la enzima. Para ello, se dividió este valor entre el coeficiente de extinción del CDNB $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dando como resultado $\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Ecuación 4). Finalmente, este dato se transformó a $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de sustrato transformado.

$$\frac{\Delta ABS \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}}{9.6} = \text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \quad \text{Actividad específica (Ecuación 4)}$$

El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa Origin Pro (Scientific Graphing and Analysis Software) de Origin ® 7SR2 Origin Lab Corporation.

3.7. Estequiometría de unión de los ligandos

Con los valores que se obtuvieron en los ensayos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca y el método descrito por Caccuri *et al.*, 1990, se determinaron los valores estequiométricos de la unión de los complejos enzima-ligando. Siguiendo este método, los datos de apagamiento de la fluorescencia se trataron con las siguientes ecuaciones:

$$V = (1-q)/(1-Q) \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$q = A \exp(-B \cdot L_t) + C \exp(-D \cdot L_t) + E \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$L = L_t - V \cdot P_t \quad (\text{Ecuación 7})$$

En donde:

V = saturación fraccional de los sitios.

q = fluorescencia fraccional, este valor se obtiene dividiendo la fluorescencia a una cierta concentración de ligando entre la fluorescencia total (sin ligando).

Q = fluorescencia fraccional cuando todos los sitios de unión se encuentran ocupados.

A, B, C, D = valores de q a distintas concentraciones de ligando total (L_t).

E = valor de q a una concentración infinita de L_t .

L = concentración de ligando libre.

L_t = concentración de ligando total.

P_t = concentración de proteína total.

Primero se graficó el apagamiento fraccional de la fluorescencia frente a la concentración de ligando y posteriormente, los datos se ajustaron a la Ecuación 6 con lo cual se obtuvo E , cuyo valor es igual a Q . Una vez se obtuvo E y por lo tanto Q , con las ecuaciones 5 y 7 se calculó tanto el ligando unido a la GST (V) como el libre (L) respectivamente.

Con los valores de E , V y L , se construyó una gráfica de Scatchard con la que se determinó el número de sitios de unión de cada ligando a la GST.

Todos los datos se analizaron con el programa Origin.

3.8. Inhibición de la actividad catalítica de la glutatión transferasa

Los estudios de inhibición se desarrollaron para determinar la capacidad inhibitoria de los diversos PPL sobre la actividad catalítica de la Ts26GST y la TcGST, estos estudios se llevaron a cabo siguiendo el método descrito por Tahir y Mannervik 1986, y nos permitieron determinar tanto los tipos de inhibición como las constantes inhibitorias de los PPL sobre las GSTs.

3.8.1. Inhibición al 50%

La I_{50} se define como la concentración de inhibidor necesaria para producir el 50% de inhibición en el ensayo estándar de actividad de la GST.

Para determinar la I_{50} , se llevaron a cabo una serie de ensayos por cada inhibidor (ligando), cada ensayo consistió en mezclar una cantidad conocida de GST en el amortiguador de ensayo K_2HPO_4 100 mM, EDTA 1 mM, (pH 6.5), al cual posteriormente se le agregaron el GSH y el inhibidor (ligando). La mezcla se agitó y se dejó equilibrar por unos segundos. La reacción se inició al agregar el CDNB, se agitó la mezcla, y se leyó su absorbancia.

El volumen final de la reacción fue de 1 ml, el cambio de absorbancia se registró a 340 nm, las concentraciones finales de GSH y CDNB fueron de 1 mM para ambos, mientras que los ligandos se fueron aumentando de forma creciente en cada ensayo de la serie.

Los datos de cada inhibidor (ligando) se graficaron como el porcentaje de la actividad residual frente al logaritmo de la concentración del inhibidor. El valor de la I_{50} se determinó al interpolar del punto de la gráfica que definió el 50% de actividad al de la concentración del inhibidor.

3.8.2. Tipo de inhibición

El tipo de inhibición se determinó por medio de sistemas de inhibición simple (Tahir y Mannervik 1986). El procedimiento consistió en obtener los datos de las velocidades iniciales en diferentes series de ensayos, en las que la concentración de la GST y del GSH se mantuvo constante mientras la concentración del CDNB se iba variando de forma creciente. Cada serie de ensayos se realizó con una concentración fija y diferente del inhibidor. El volumen total de la reacción fue de 1 ml y el cambio de absorbancia se registró a 340 nm. Con los datos que se obtuvieron, se elaboró una gráfica del inverso de la velocidad inicial (V_0) frente al inverso de la concentración del CDNB. El comportamiento de las rectas, por el patrón de intersección tanto en el eje de las ordenadas ($1/V_0$) como en el de las abscisas ($1/[CDNB]$), definió el tipo de inhibición.

3.8.3. Constante de inhibición

A partir de los datos que arrojaron las gráficas del tipo de inhibición, se calculó la K_i . Brevemente, se graficaron los valores de las pendientes o de los interceptos (dependiendo el tipo de inhibición) de cada una de las series de ensayos frente a la concentración del inhibidor, el valor

de intersección de las rectas en el eje de las abscisas determinó la K_i de cada uno de los ligandos sobre las GSTs.

Con la finalidad de corroborar los valores de K_i obtenidos por métodos lineales (gráficas de Lineweaver-Burk), la K_i también se calculó por métodos no lineales utilizando las ecuaciones del modelo de Michaelis-Menten para cada tipo de inhibición. Para llevar a cabo lo anterior se elaboraron gráficas de V_o frente a la concentración del CDNB ajustando de forma global todos los datos a un modelo determinado por la ecuación del tipo de inhibición, lo que nos permitió calcular la K_i , esto se realizó con el programa Origin Pro.

Las ecuaciones que se utilizaron para calcular la K_i por métodos no lineales fueron las siguientes:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Ecuación 8 (Inhibición No competitiva)}$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Ecuación 9 (Inhibición Acompetitiva)}$$

3.9. Competencia entre hematina y 8-anilino-1-naftalen sulfonato

Con la finalidad de caracterizar el sitio de unión de las enzimas para la hematina, se realizaron ensayos de competencia entre el ANS y el ligando; sin embargo, antes de llevar a cabo lo anterior, primero se determinó el punto isoemisivo de la unión entre el ANS y la Ts26GST. Este punto es indicativo de que el rendimiento cuántico fluorescente de las moléculas unidas es igual en el rango de valores utilizados.

El método para determinar el punto isoemisivo fue el siguiente, en una celda de cuarzo se colocó una concentración fija de GST en PBS, esta solución se fue titulando con cantidades crecientes de ANS, con cada adición de ANS se tomaron lecturas de emisión de la fluorescencia de 300 a 540 nm excitando la solución a 280 nm con un espectrofluorómetro. Los datos se analizaron graficando la intensidad de la fluorescencia contra la longitud de onda con cada una de las diferentes concentraciones de ANS, a partir de esta gráfica se determinó la presencia del punto isoemisivo.

Los ensayos de competencia se realizaron de la siguiente manera, en un volumen determinado de PBS se adicionó GST y ANS a una cierta concentración, ésta solución se excitó a 400 nm y se leyó su emisión de fluorescencia de 300 a 500 nm con un espectrofluorómetro. Posteriormente, se adicionó de forma creciente la hematina, con cada adición de hematina la mezcla se excitó y se leyó su emisión de fluorescencia.

Los datos se analizaron graficando la intensidad de la fluorescencia contra la longitud de onda con cada una de las diferentes concentraciones de hematina.

3.10. Solubilización de los compuestos

Todos los compuestos químicos (ligandos) utilizados en este trabajo se adquirieron comercialmente y para utilizarlos en los ensayos, se prepararon en soluciones stock concentradas 50 a 100 veces en relación a la concentración de ensayo.

La mayoría de los compuestos utilizados son hidrofóbicos; por lo tanto, se disolvieron en etanol al 100%, las soluciones stock se protegieron de la luz y se conservaron a 4° C hasta su uso. El GSH se disolvió en el amortiguador de ensayo y siempre se preparó al momento de utilizarse, mientras que el CDNB se disolvió en etanol 100% y se conservó a temperatura ambiente protegido de la luz.

En la Tabla 2 se muestran los diferentes compuestos que se utilizaron en este trabajo, con sus respectivas fórmulas, en que se disolvieron y su masa molecular.

Tabla 2. Compuestos que se utilizaron en esta investigación.

| Compuesto | MM g/mol | Disolvente | Fórmula |
|-------------------------------------|----------|-------------------------|---------|
| Glutati3n reducido (GSH) | 307.32 | Amortiguador de ensayo* | |
| 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) | 202.55 | Etanol 100% | |
| Ácido araquídico | 312.53 | Etanol 100% | |
| Ácido palmítico | 256.42 | Etanol 100% | |
| ethyl- <i>trans</i> -2-octenoate | 170.25 | Etanol 100% | |
| <i>trans,trans</i> -2,4-hexadienal | 96.13 | Etanol 100% | |
| <i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal | 138.21 | Etanol 100% | |
| <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal | 152.23 | Etanol 100% | |
| (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal | 202.29 | HCl 1mM | |
| 8-anilino-1-naftalensulfonato (ANS) | 299.3 | Etanol 100% | |
| Hematina porcina | 633.5 | NH ₄ OH 0.1M | |

MM: masa molecular

*Ver sección 3.6.2.

4. Resultados

4.1. Obtención de las glutatión transferasas

Las Figuras 8 y 9 muestran los resultados de la purificación de las tres isoformas de GSTs de *T. solium* y una de *T. crassiceps* respectivamente por medio de una cromatografía de afinidad Sef-GSH. Los valores más altos de V_o de la reacción catalítica de las GSTs coincide con un incremento en la presencia de proteína en algunas de las fracciones eluidas en contraste con la fracción excluida donde la mayoría de las fracciones presentó poca V_o y mayor presencia de proteína.

La Fig. 10 muestra un ejemplo de un cromatograma con la resina PBE-94 de las fracciones obtenidas con actividad de GST de una cromatografía de afinidad Sef-GSH de cisticercos de *T. solium*. Se observa que en el rango de pH 7.6 - 7.8 se purificó la Ts26GST.

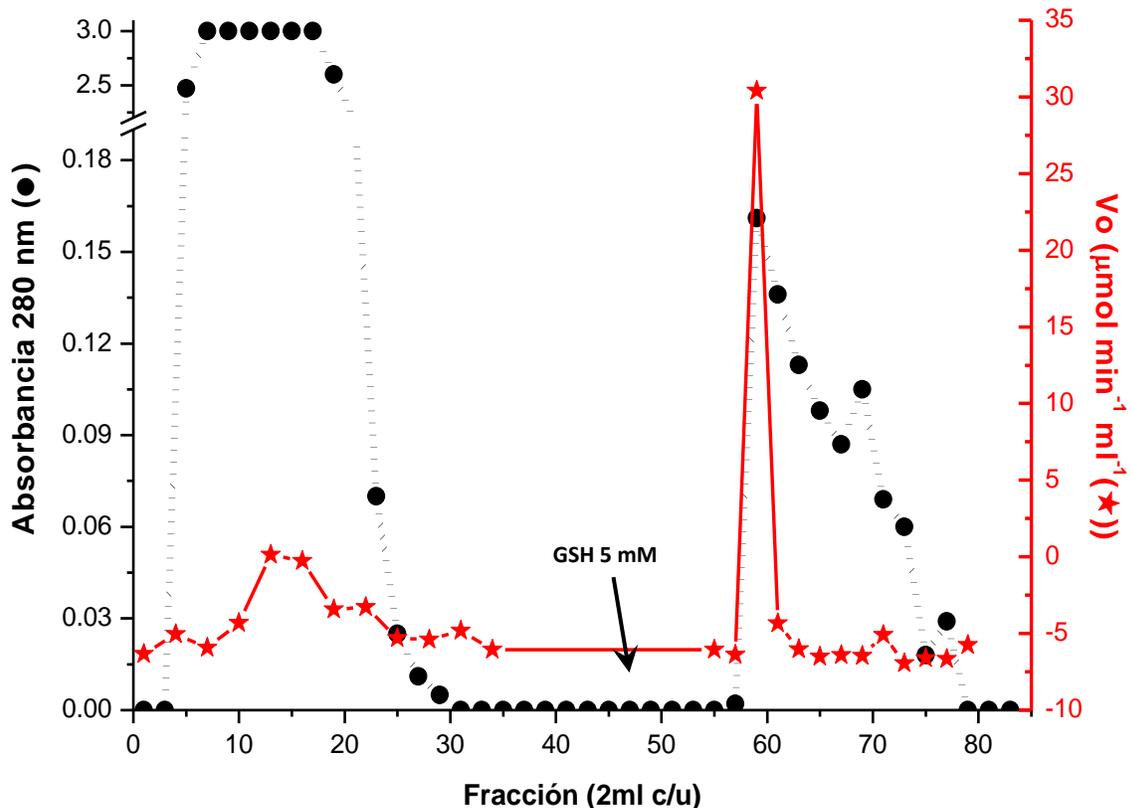


Figura 8. Cromatografía de afinidad Sef-GSH del extracto crudo de cisticercos de *T. solium*. La gráfica muestra la absorbancia a 280 nm (●) y la actividad de GST (V_o ★). Se puede observar claramente las fracciones excluidas (0-48) y las eluidas (49-83). La elución se realizó con 5 mM de GSH. El ensayo de actividad de GST se realizó con 20 μ l de cada fracción.

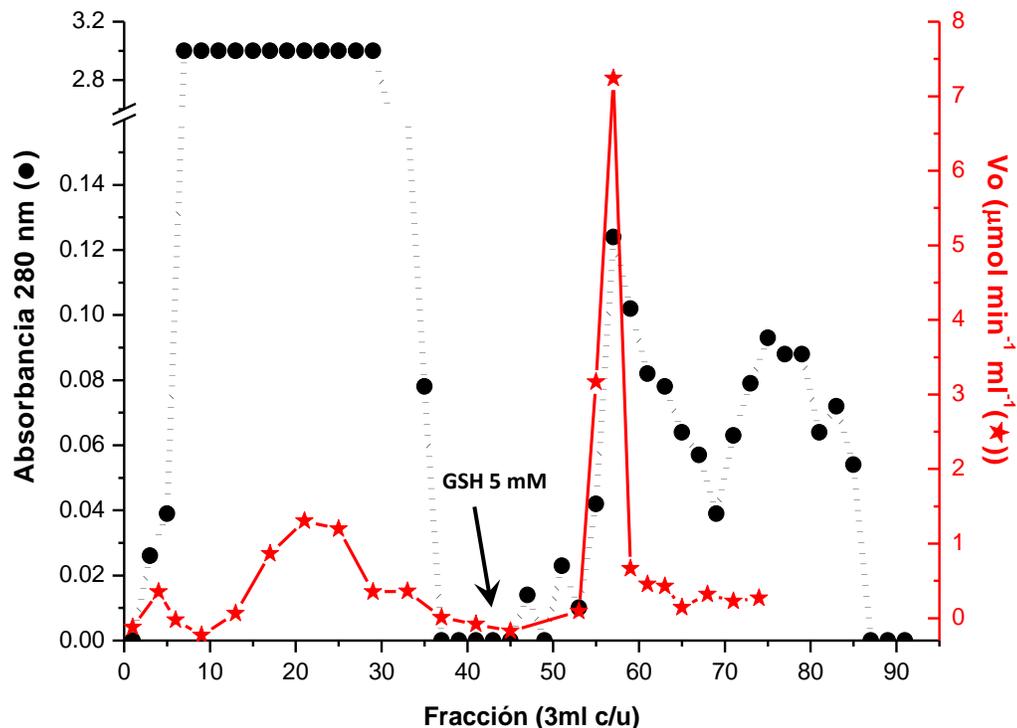


Figura 9. Cromatografía de afinidad Sef-GSH del extracto crudo de cisticercos de *T. crassiceps*. La gráfica muestra la absorbancia a 280 nm (●) y la actividad de GST (Vo ★). Se puede observar claramente las fracciones excluidas (0-43) y las eluidas (44-92). La elución se realizó con 5 mM de GSH. El ensayo de actividad de GST se realizó con 20 µl de cada fracción.

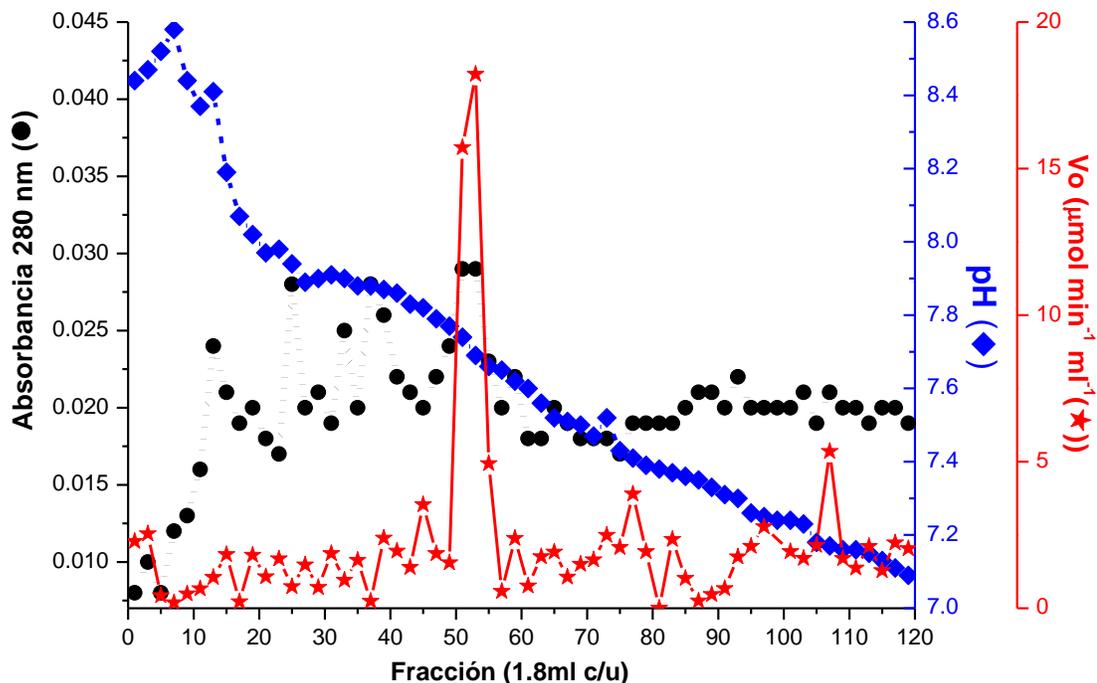


Figura 10. Cromatoenfoco con la resina PBE-94 de las fracciones con actividad de GST que se obtuvieron en la cromatografía de afinidad (Sef-GSH) de *T. solium*. La gráfica muestra la absorbancia a 280 nm (●), la actividad de GST (Vo ★) y el pH (◆) de las fracciones. Esta gráfica indica que en el rango de pH entre 7.6 y 7.8 se purificó la Ts26GST. El ensayo de actividad de GST se realizó con 20 µl de cada fracción.

Las gráficas 8, 9 y 10 son un ejemplo de las 55 cromatografías que se hicieron a lo largo de este estudio para obtener las GSTs de ambos parásitos. De forma general, se puede decir que en los dos tipos de cromatografías los valores más altos de V_0 de las GSTs se encontraron en las fracciones eluidas que coinciden con un incremento en la presencia de proteína.

Al relacionar las actividades catalíticas de la enzima con el volumen y la masa obtenidos en los diversos pasos de purificación se construyó la tabla de purificación para la Ts26GST (Tabla 3). Esta tabla, nos muestra un aumento en la actividad específica y en el número de purificaciones, mientras disminuye la actividad total y el porcentaje de rendimiento conforme se va purificando la enzima.

Tabla 3. Resumen de la purificación de Ts26GST

| Etapa | Vol Total (ml) | Prot. Total (mg) | Act. Esp. (Umg^{-1}) | Act. Total (mU) | % de rendimiento | # de purificaciones |
|---------|----------------|------------------|--------------------------|-----------------|------------------|---------------------|
| E.C. | 124 | 443.17 | 6.5 | 2883.82 | 100 | 1 |
| Sef-GSH | 12 | 12.55 | 191.43 | 2402.45 | 83 | 29.45 |
| PBE | 2 | 0.6 | 236.40 | 141.84 | 4.7 | 36.36 |

E.C.: extracto crudo; Sef-GSH: resina Sefarosa-Glutatión; PBE: resina Polybuffer Exchanger 94.

Las fracciones con actividad de Ts26GST (57-61 Fig. 8) y *T. crassiceps* (54-59 Fig. 9) obtenidas en las cromatografías Sef-GSH, así como las fracciones de *T. solium* obtenidas en el cromatoenfoco (50-55 Fig. 10) se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15%. Previamente, las muestras se concentraron con nitrógeno gaseoso en el sistema Amicon y se dializaron en PBS (pH 7.3). El resultado de estos análisis se observa en las Figuras 11 y 12.

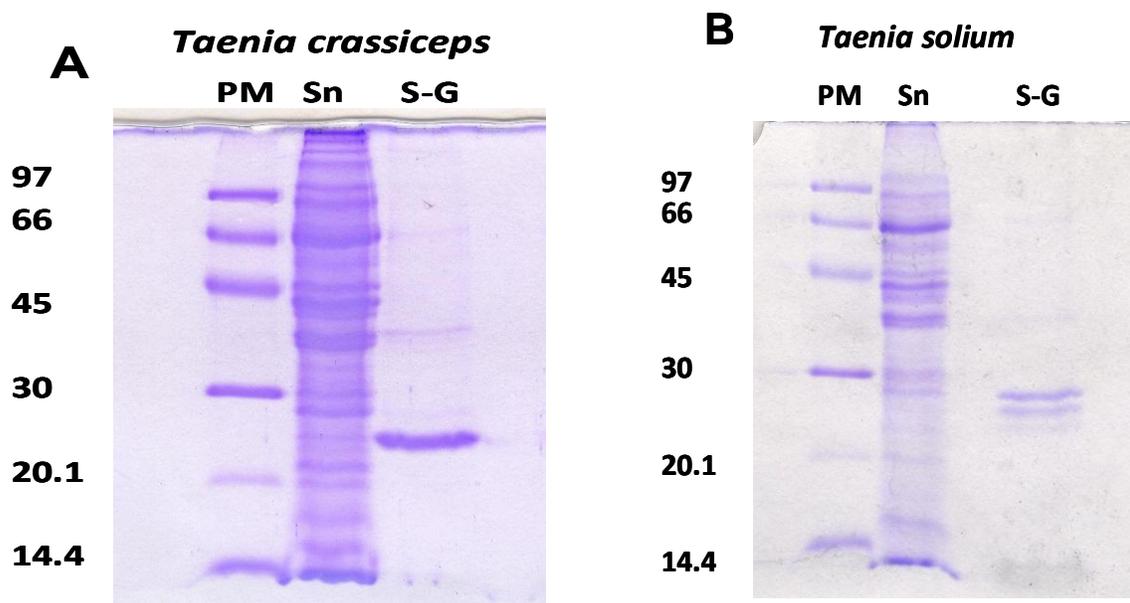


Figura 11. Análisis por geles de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) de las fracciones con actividad de GST eluidas de la cromatografía de Sef-GSH (S-G) para *T. crassiceps* (A) y *T. solium* (B), contrastando con el sobrenadante obtenido de la homogenización y centrifugación de los cisticercos (Sn). En A podemos ver una sola banda ≈ 26 kDa, mientras que en B además de la banda de ≈ 26 kDa hay dos bandas por debajo, indicando la presencia de otras dos isoformas de GST. PM: peso molecular.

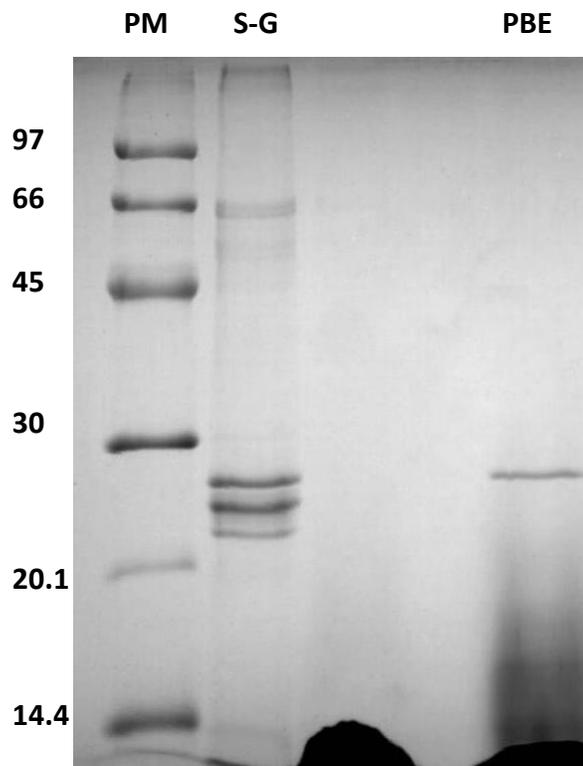


Figura 12. Análisis por gel de poliacrilamida al 15% de las fracciones de *T. solium* con actividad de GST, eluidas en el cromatoenfoco (PBE), contrastando con la fracción obtenida en la cromatografía de afinidad Sef-GSH (S-G). PM: peso molecular.

Como se ve en los geles de la Figura 11, con sólo un paso de centrifugación y una cromatografía de afinidad Sef-GSH Figuras 8 y 9, es posible obtener la TcGST pura y las tres isoformas de GST de *T. solium* que se han reportado (Nguyen HA *et al.*, 2010; Plancarte *et al.*, 2004; Vibanco-Pérez N *et al.*, 2020). Para obtener a la Ts26GST pura fue necesario realizar un cromatoenfoco Figura 10, cuyo resultado muestra una sola banda ≈ 26 kDa Figura 12. El porcentaje de rendimiento de la purificación de Ts26GST fue bajo 4.7%, ver Tabla 3.

4.2. Análisis de péptidos

Como se dijo anteriormente, hasta el momento, se conocen tres isoformas de GST en los tejidos de *T. solium*. En relación a *T. crassiceps*, la única evidencia de la existencia de alguna GST es una sola banda proteica de ≈ 26 kDa con actividad de GST observada en geles desnaturizantes de acrilamida de la fracción obtenida por cromatografía de afinidad. Para confirmar que la proteína de ≈ 26 kDa corresponde con una GST, ésta se analizó por espectrometría de masas.

El resultado de este análisis mostró que los péptidos APTLAYWDIR, LTQSGAILEYIADR, RAVLHMLQCEVLDLR y LPNFETYLGDKWLTGEK, coincidieron en el orden de 2-11, 70-83, 94-108 y 135-152 con la secuencia de aminoácidos reportada para la Ts26GST, mientras que los péptidos APTLAYWDIR, FSLGLDFPNLPYYIDGDFK y AVLHMLQCEVVDLR, coincidieron en el orden de 2-11, 51-69 y 95-108 con la secuencia de aminoácidos reportada para la GST de *E. multilocularis* como se ve en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de péptidos de la banda de ≈26 kDa que se obtuvo en la purificación de *T. crassiceps*. En la tabla por medio del alineamiento de las secuencias, se indican los péptidos de la muestra que coinciden con cada una de las referencias y las características de este análisis.

| | |
|--------------|---|
| <i>T. s.</i> | 001-MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLLKYLGVVEYHDKRYHVGPPAPNFDREWLSEKFTLGLDFPNLPYYMDGDLKLTQSGAILEYI-80 |
| <i>E.m.</i> | 001-MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLLKYLEVEYDDKRYKIGSAPTFRSAWLSEKFSGLGLDFPNLPYYIDGDFKLTQSGAILEYI-80 |
| <i>T.c.</i> | APTLAYWDIR FSLGLDFPNLPYYIDGDFKLTQSGAILEYI |
| <i>T. s.</i> | 081-ADRHGMIPDCKKRRRAVLHMLQCEVLDLRQAFTRICYSPPDFEELKPGFFETLAQKLPNFETYLDGKEWLTGKINYPDFAL-160 |
| <i>E.m.</i> | 081-ADRHGMIPDCKKRRRAVLHMLQCEVLDLRMAFTRTCYSPPDFEELKPGFFETLAQKLPNFETYLDGKEWLTGKINYPDFSL-160 |
| <i>T.c.</i> | ADR RAVLHMLQCEVLDLR LPNFETYLDGKEWLTGK |
| <i>T. s.</i> | 161-CELLSQLTKFEPTCLKKYPKLQAYLERFENLPQLSGYMSSEFKTCPCNGVSAKWRGDC-219 |
| <i>E.m.</i> | 161-CELLNQLMKFEPTCLEKYPRLKAYLSRFENLPALRDYMASSEFKTCPCNGASAKWRGDC-219 |
| <i>T.c.</i> | |

T. s.: *Taenia solium*; *E.m.*: *Echinococcus multilocularis*; *T.c.*: *Taenia crassiceps*.

Coincide con *Taenia solium*: ABC; Coincide con *Taenia crassiceps*: ABC; Coincide con ambas especies: ABC.

| Especie | Referencia | Base de datos | Masa nominal | pl calculado | Cobertura |
|------------------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------|-----------|
| <i>Taenia solium</i> | gi 21591409 | NCBIInr | 25480 | 6.12 | 26% |
| <i>Echinococcus multilocularis</i> | gi 1004227 | NCBIInr | 25454 | 6.74 | 19% |

En la Tabla 4 podemos observar un alineamiento de las secuencias de péptidos de las GSTs de *T. solium* y *Echinococcus multilocularis*, así como, los péptidos obtenidos de la banda de ≈26 kDa del gel A (*T. crassiceps*) de la Figura 11 que coinciden con estas secuencias. El análisis de estos datos, muestra que los péptidos obtenidos de dicha banda tienen un porcentaje de cobertura de 26% para la secuencia de péptidos de *T. solium* y de 19% para la de *E. multilocularis*. Lo anterior nos indica, que en la banda de ≈26 kDa del gel A de la Figura 11 se encuentra una GST y que ésta se parece más a la GST de *T. solium* que a la de *E. multilocularis*.

4.3. Análisis de fluorescencia (constante de disociación)

Con la finalidad de determinar las constantes de asociación de los complejos formados por las GSTs y los ligandos, las GSTs purificadas de *T. solium* y *T. crassiceps* se utilizaron en ensayos de fluorescencia. Para este fin, se cuantificó el apagamiento de la fluorescencia intrínseca (aminoácidos aromáticos) de las enzimas al unirse los ligandos a ellas y formar complejos. Con los datos de los ensayos se construyeron gráficas de la intensidad de la fluorescencia frente a la longitud de onda. El análisis de estos datos por programas estadísticos (Origin Pro 7) permitió calcular la K_D de la unión de la GST con los ligandos. En las Figuras 13 a la 19 se muestran las gráficas de apagamiento de la fluorescencia intrínseca y de proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ligando para: el *trans,trans*-2,4-hexadienal (tt-HDE), tt-NDE, tt-DDE, et-ONE, ácido araquídico y el ácido palmítico con la TcGST.

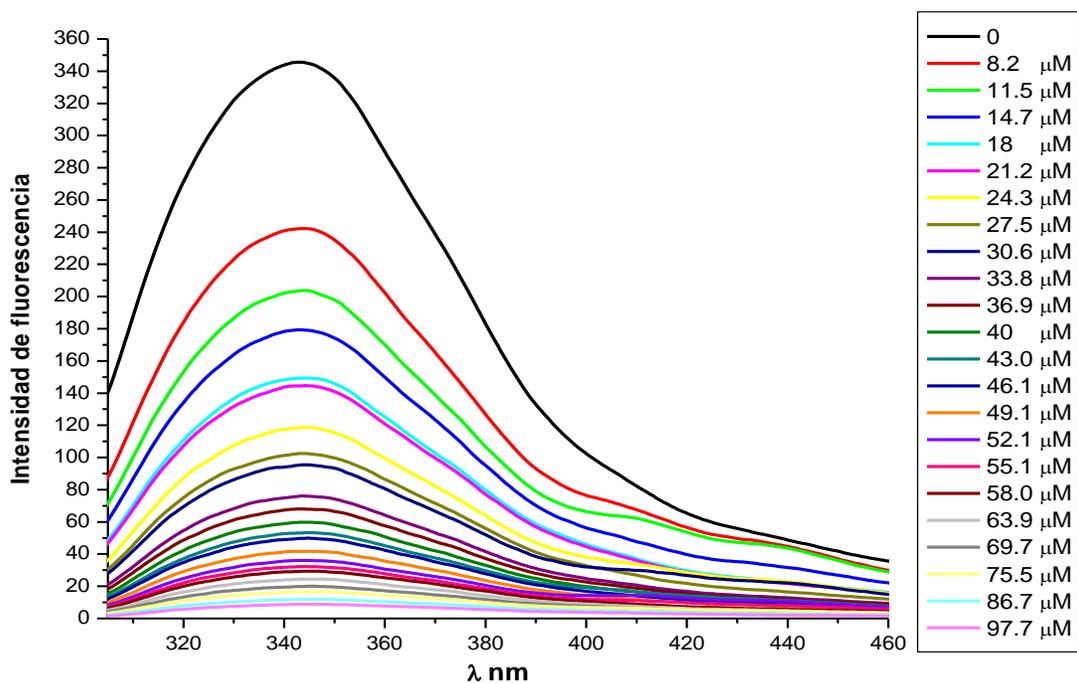


Figura 13. Gráfica de intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda (nm) del tt-HDE con la TcGST. En la gráfica se puede observar que la fluorescencia intrínseca de la Tc6ST disminuye conforme se adicionan cantidades crecientes de tt-HDE, las concentraciones de dicho ligando que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha.

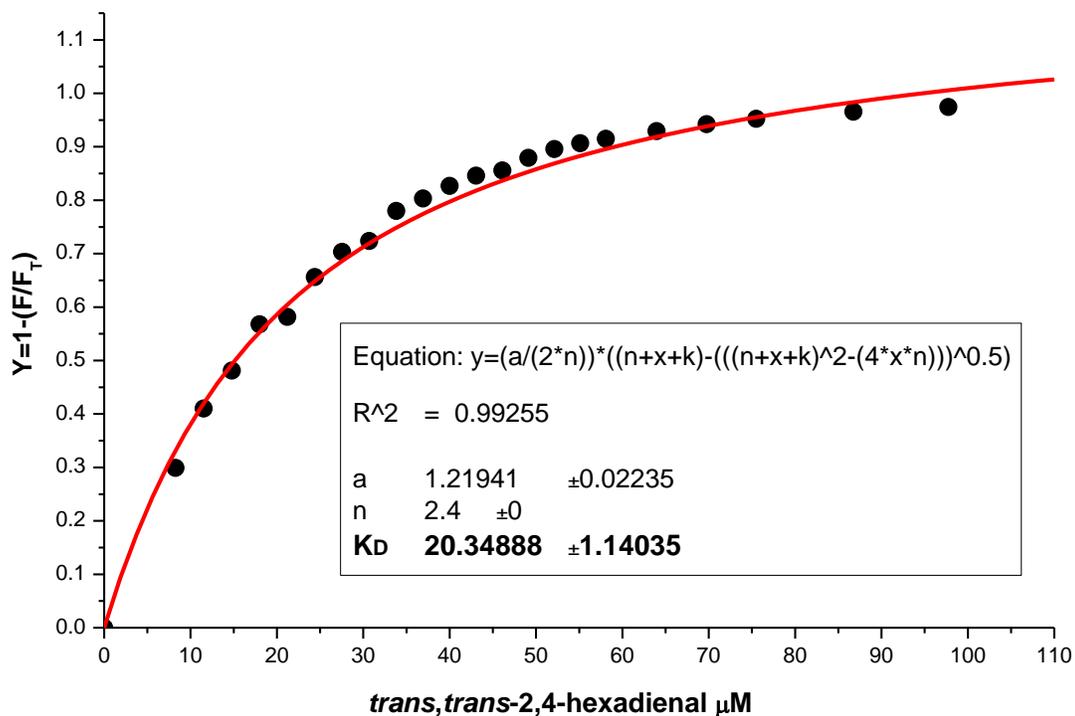


Figura 14. Gráfica de proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración de tt-HDE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del tt-HDE con la TcGST. Esta gráfica se construyó a partir de los datos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca que se obtuvieron en la gráfica de la Figura 13.

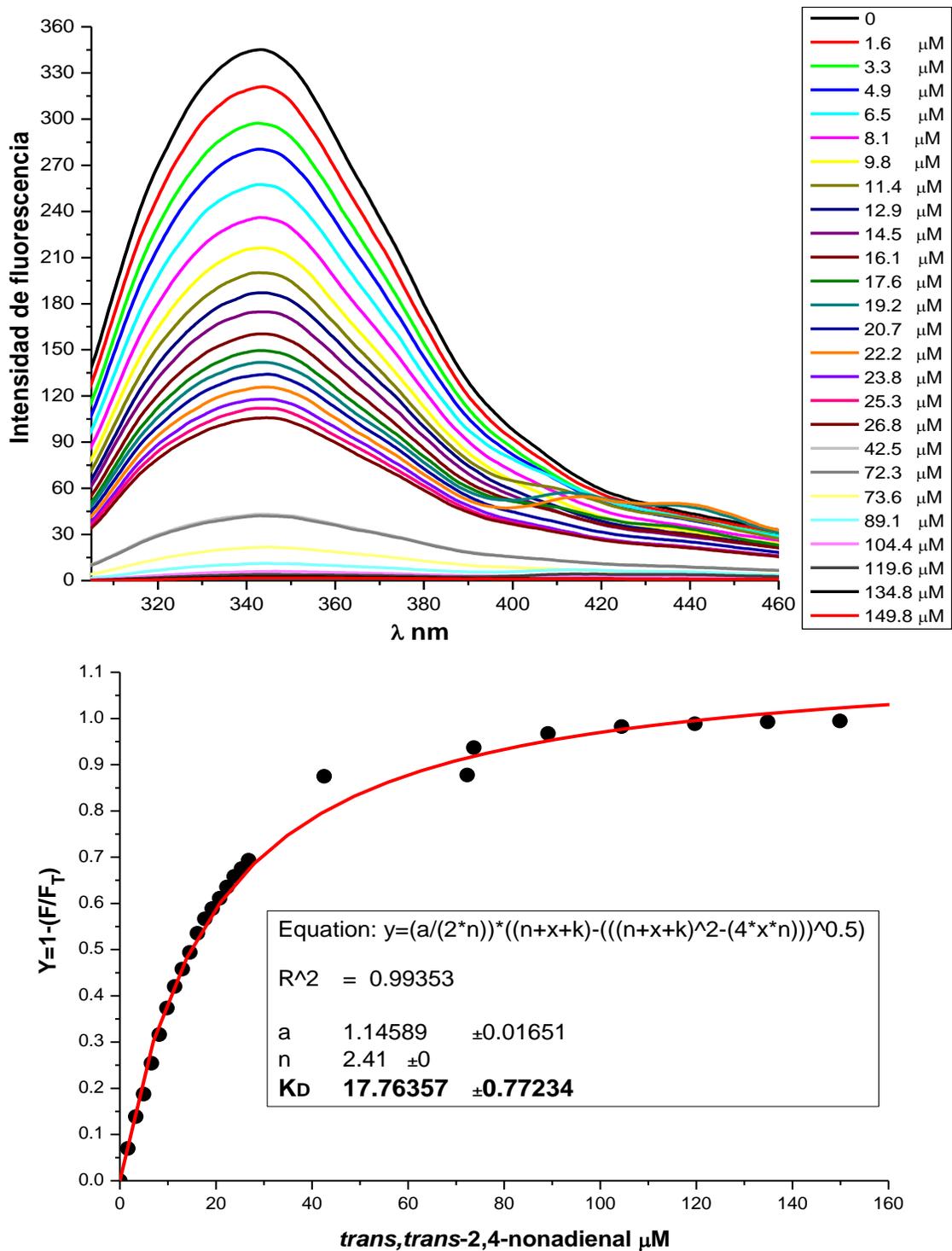


Figura 15. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del tt-NDE con la TcGST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la TcGST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del tt-NDE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del tt-HDE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del tt-NDE con la TcGST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

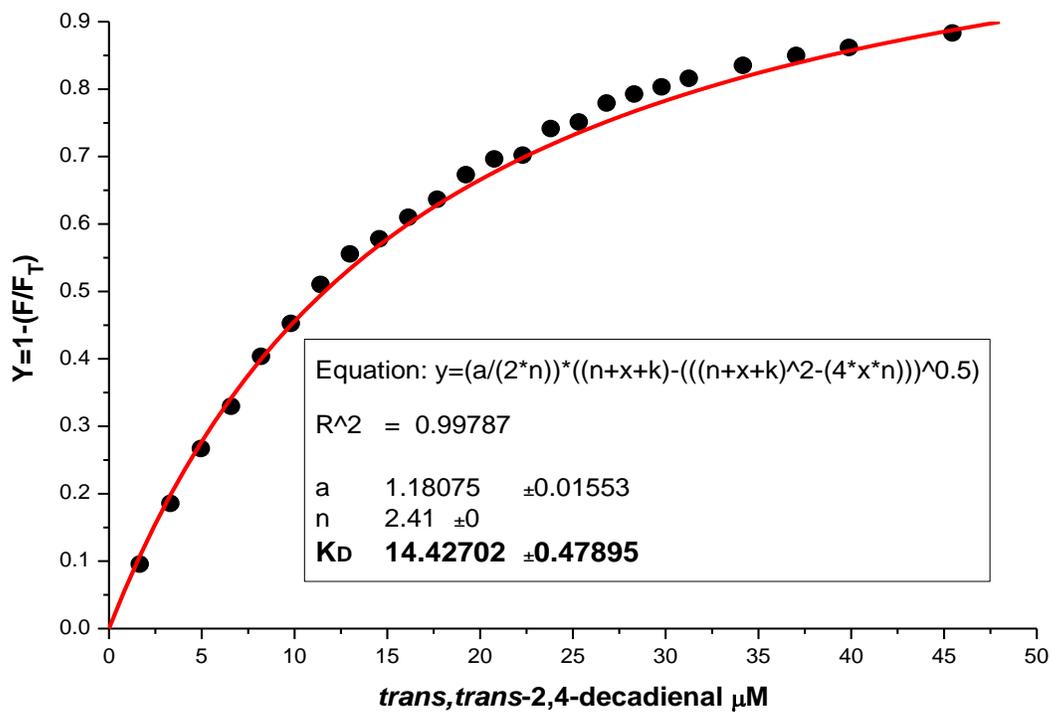
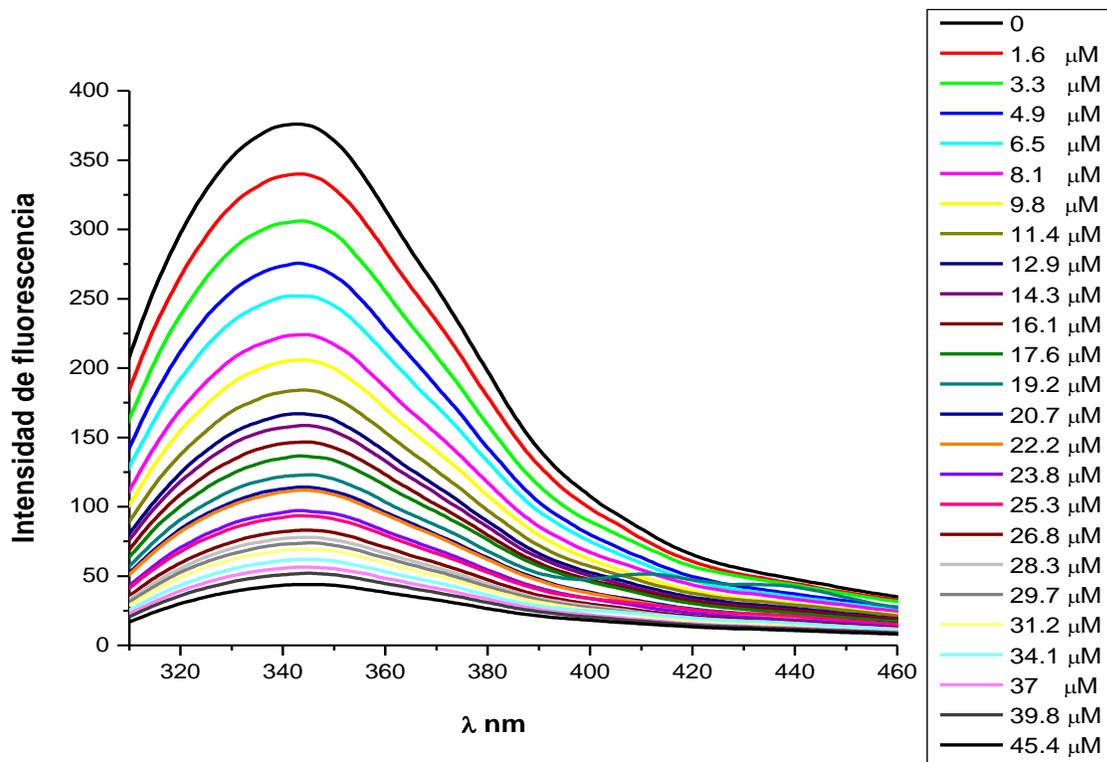


Figura 16. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del tt-DDE con la TcGST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la TcGST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del tt-DDE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del tt-DDE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del tt-DDE con la TcGST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

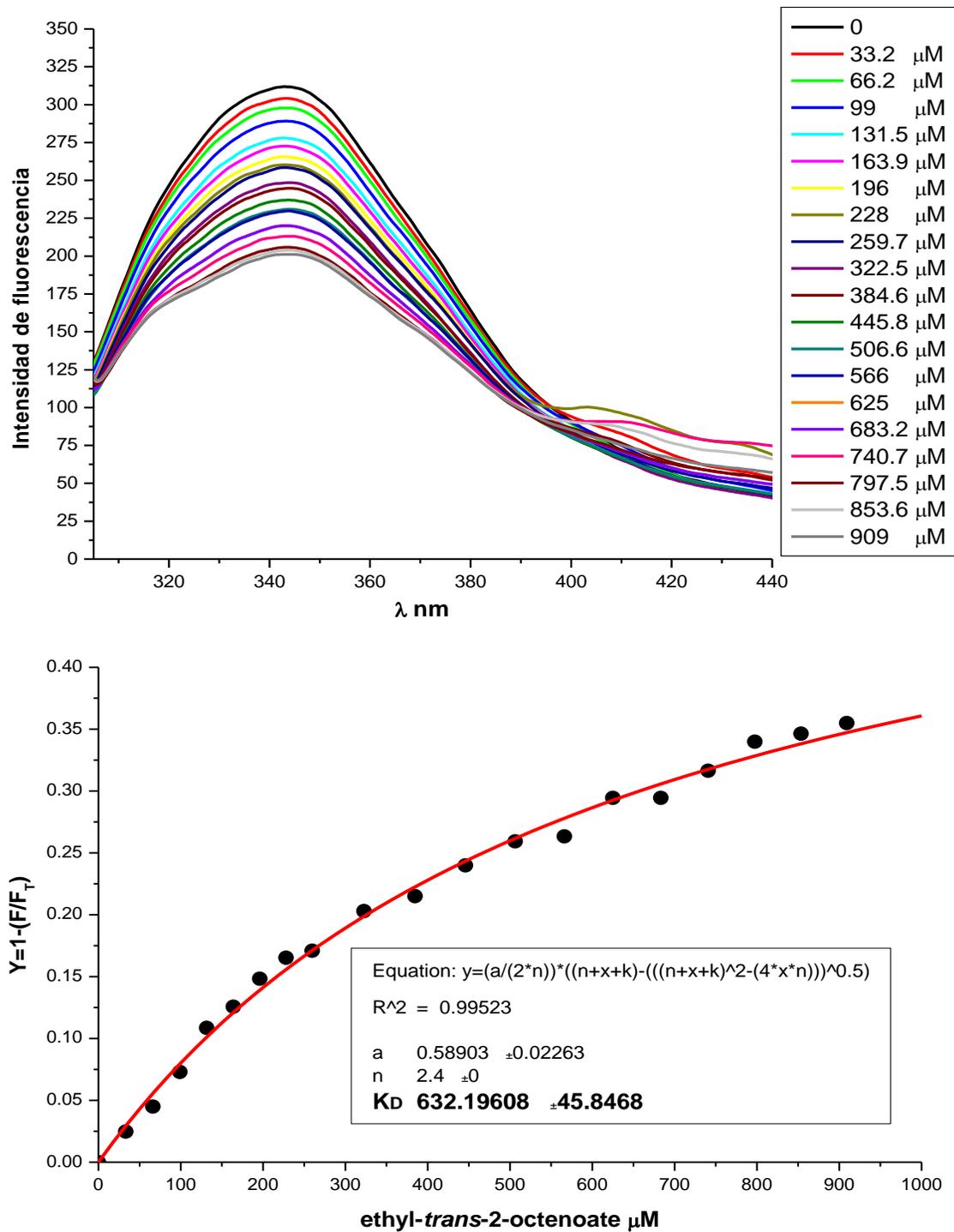


Figura 17. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del et-ONE con la TcGST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la TcGST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del et-ONE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ethyl,trans-2-octenoate, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del ethyl,trans-2-octenoate con la TcGST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

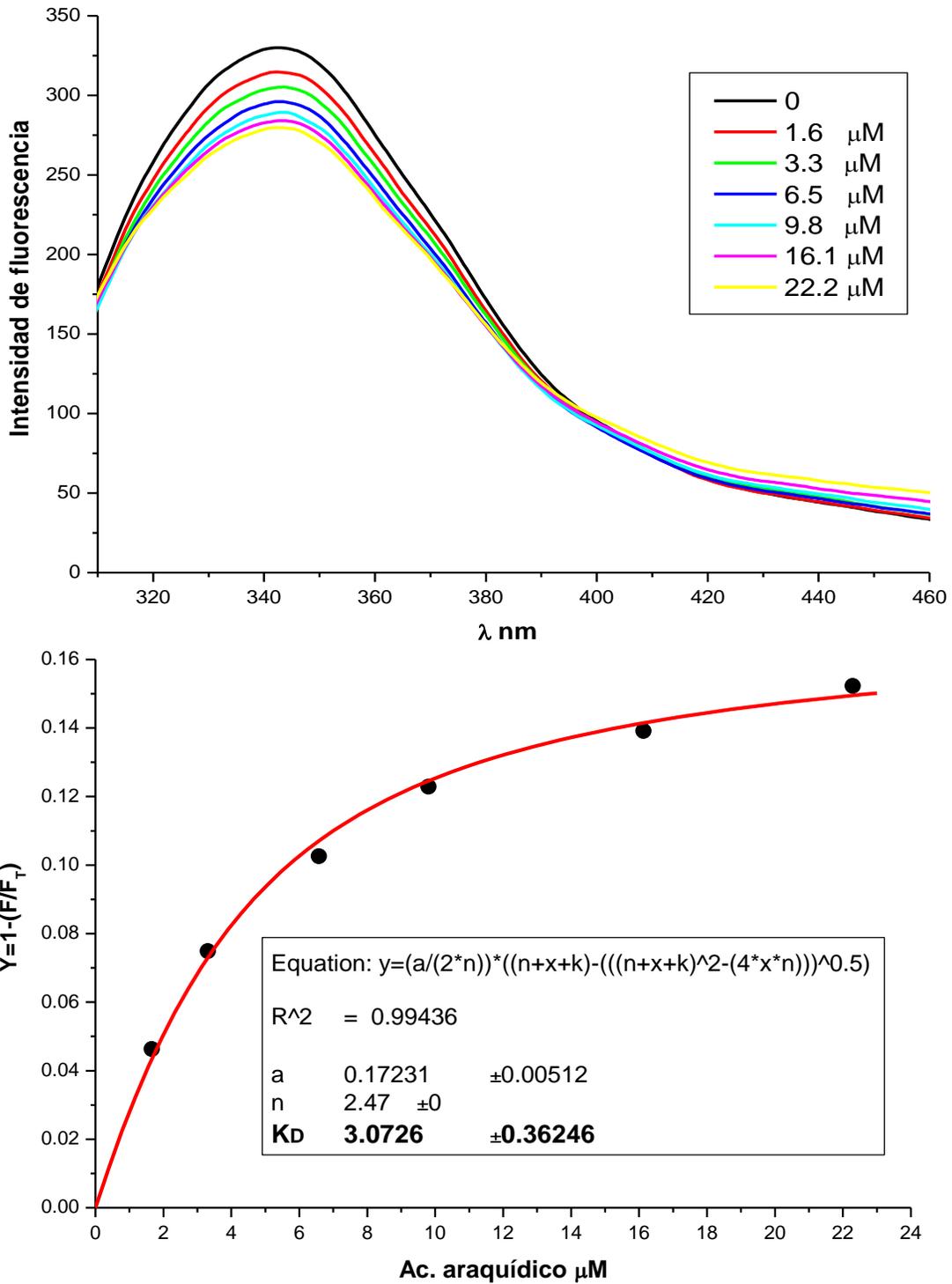


Figura 18. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del ácido araquídico con la TcGST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la TcGST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del ácido araquídico que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ácido araquídico, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del ácido araquídico con la TcGST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

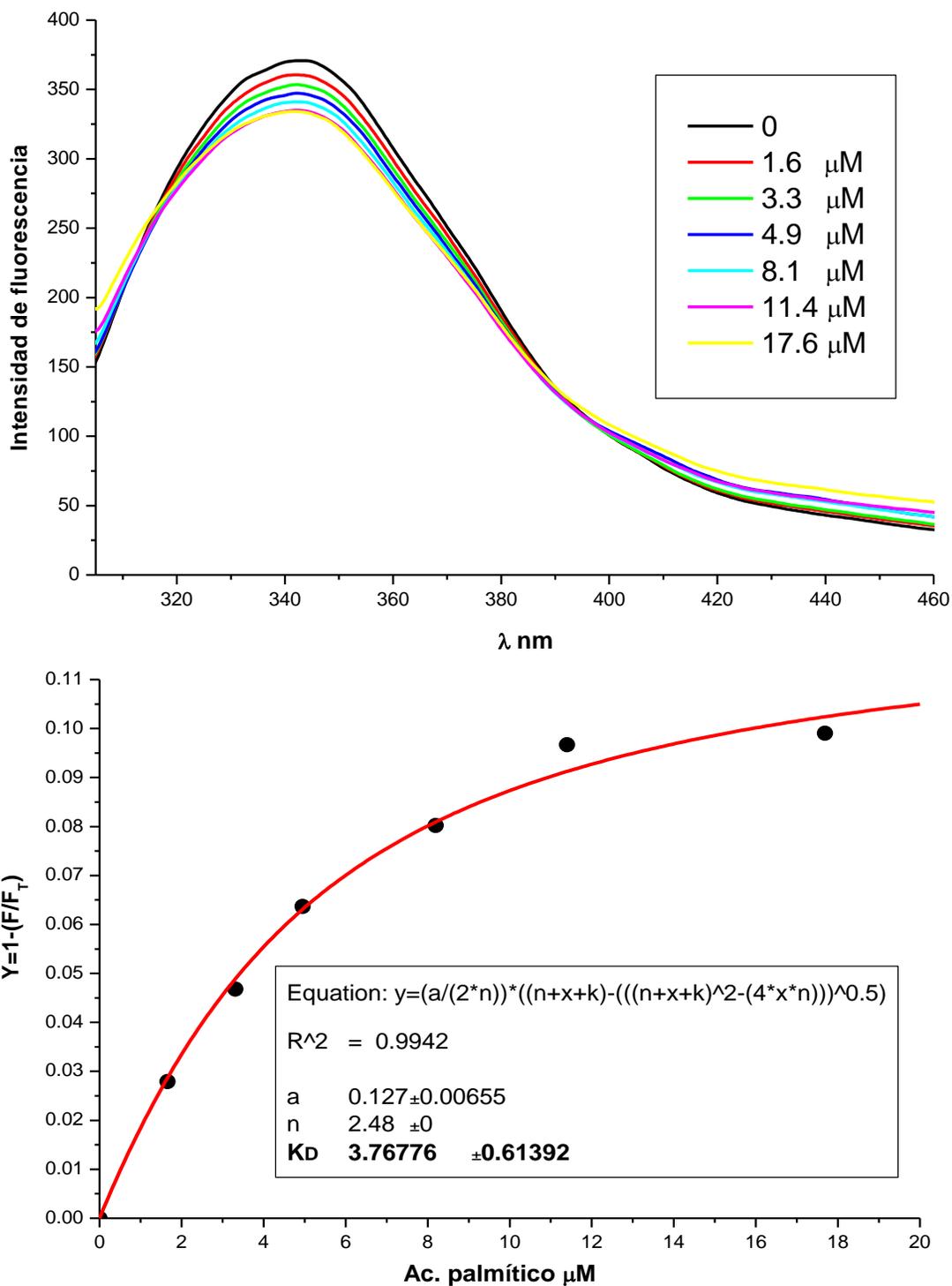


Figura 19. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del ácido palmítico con la TcGST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la TcGST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del ácido palmítico que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ácido palmítico, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del ácido palmítico con la TcGST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

En las figuras (20 a la 26) se muestran las gráficas de apagamiento de la fluorescencia intrínseca y de proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ligando para: el tt-HDE, tt-NDE, tt-DDE, et-ONE, ácido araquídico, ácido palmítico y el (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal (HNE-D) con la Ts26GST.

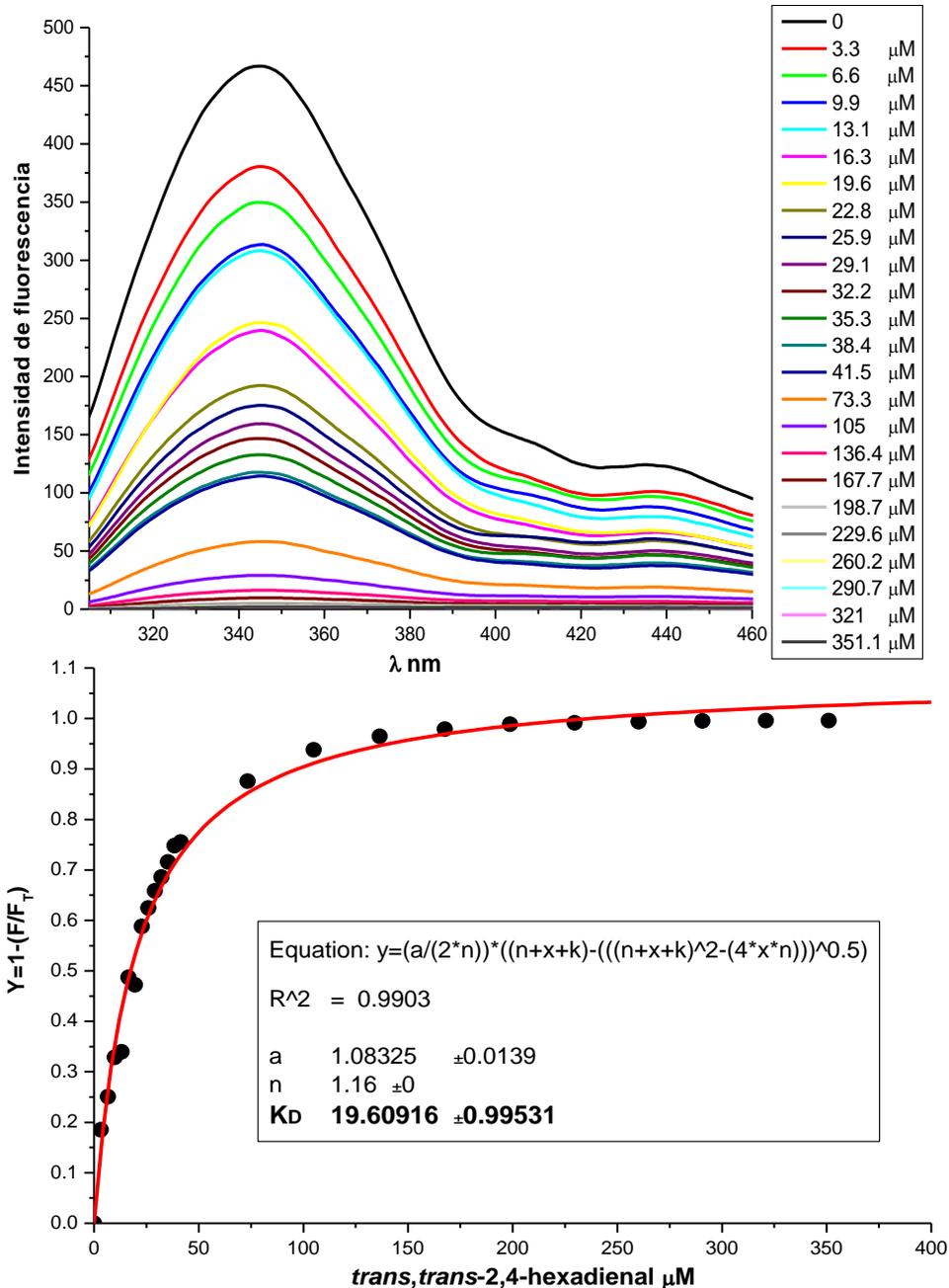


Figura 20. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del tt-HDE con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del tt-HDE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del tt-HDE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del tt-HDE con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

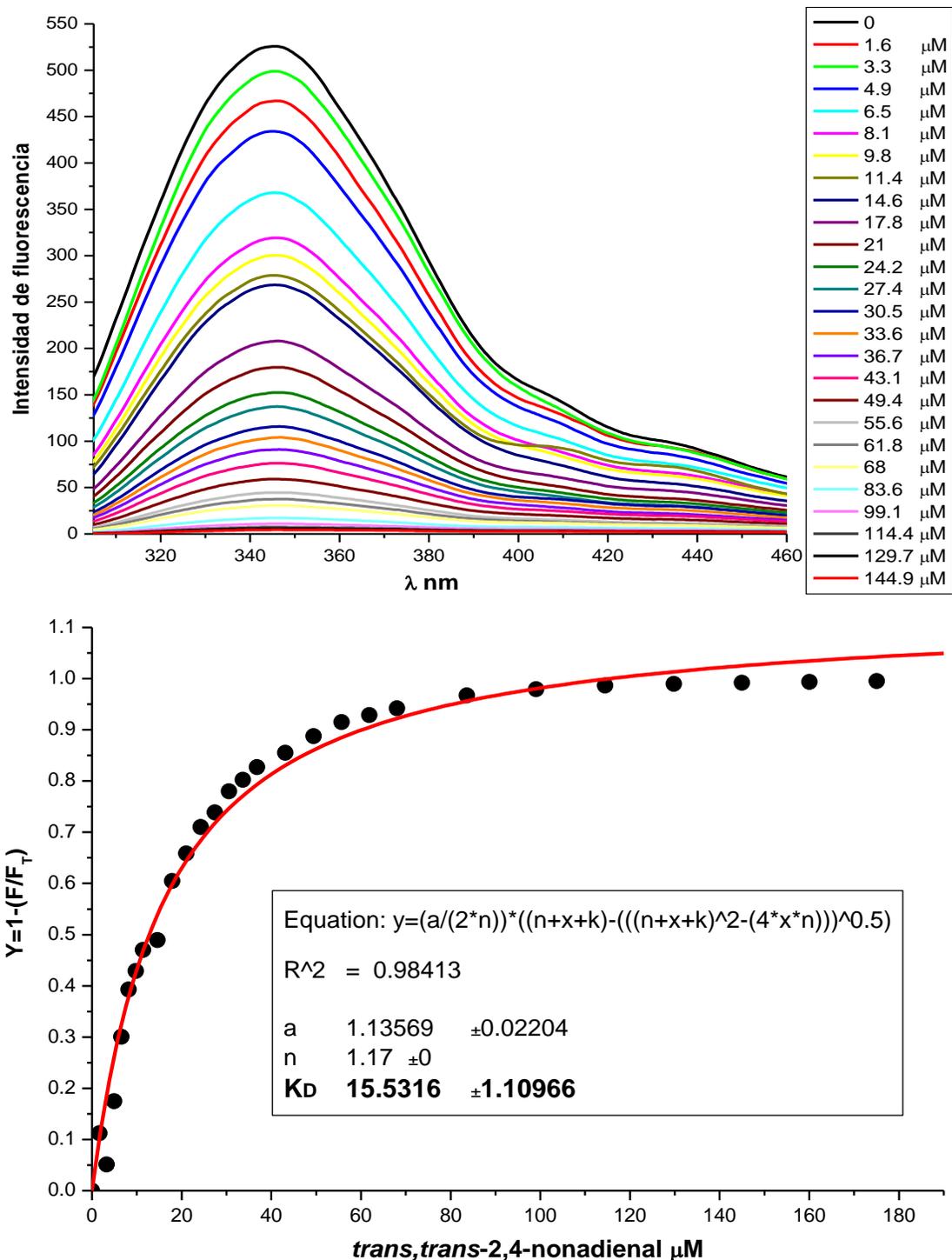


Figura 21. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del tt-NDE con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del tt-NDE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del tt-HDE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del tt-NDE con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

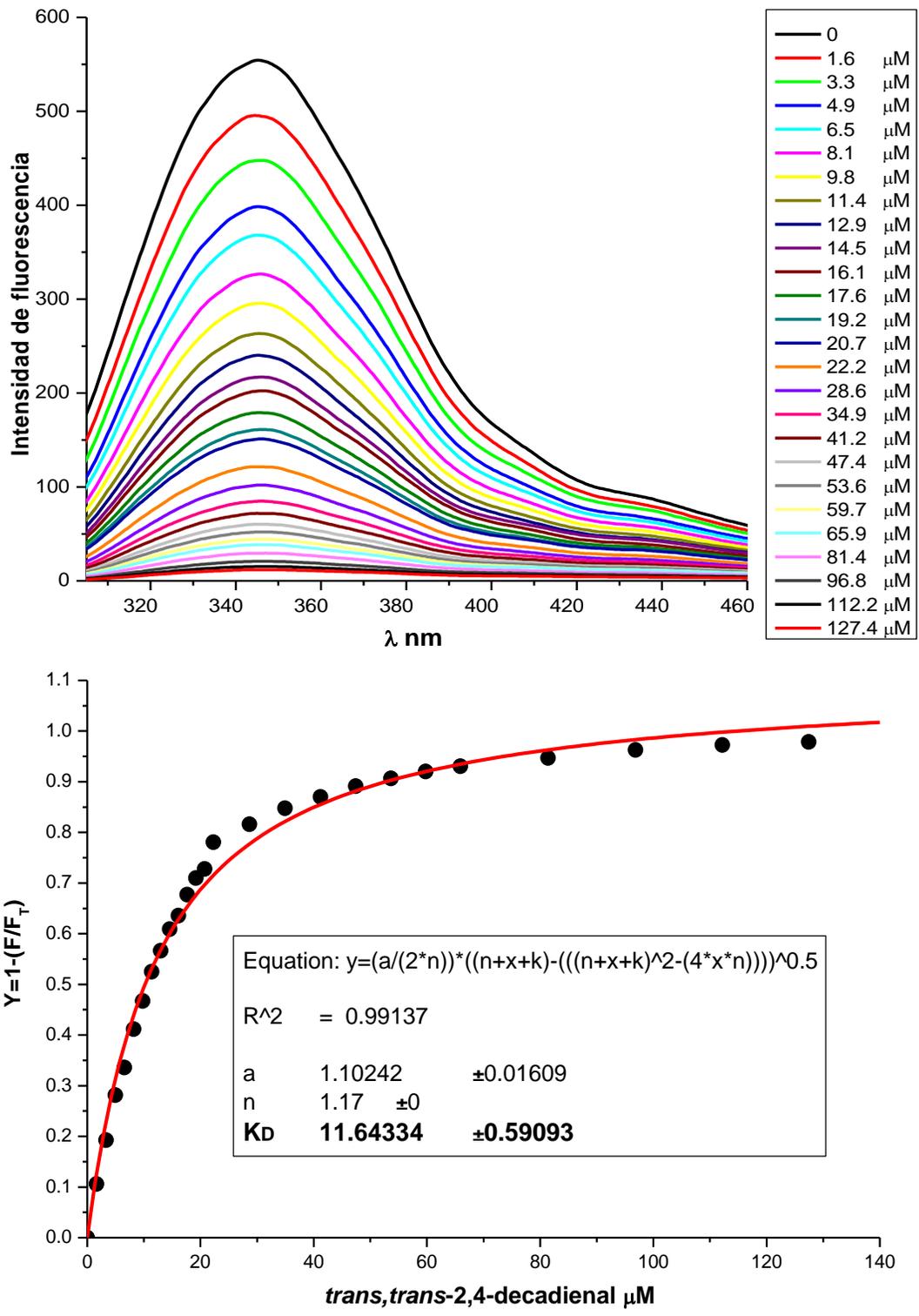


Figura 22. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del tt-DDE con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del tt-DDE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del tt-DDE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del tt-DDE con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior

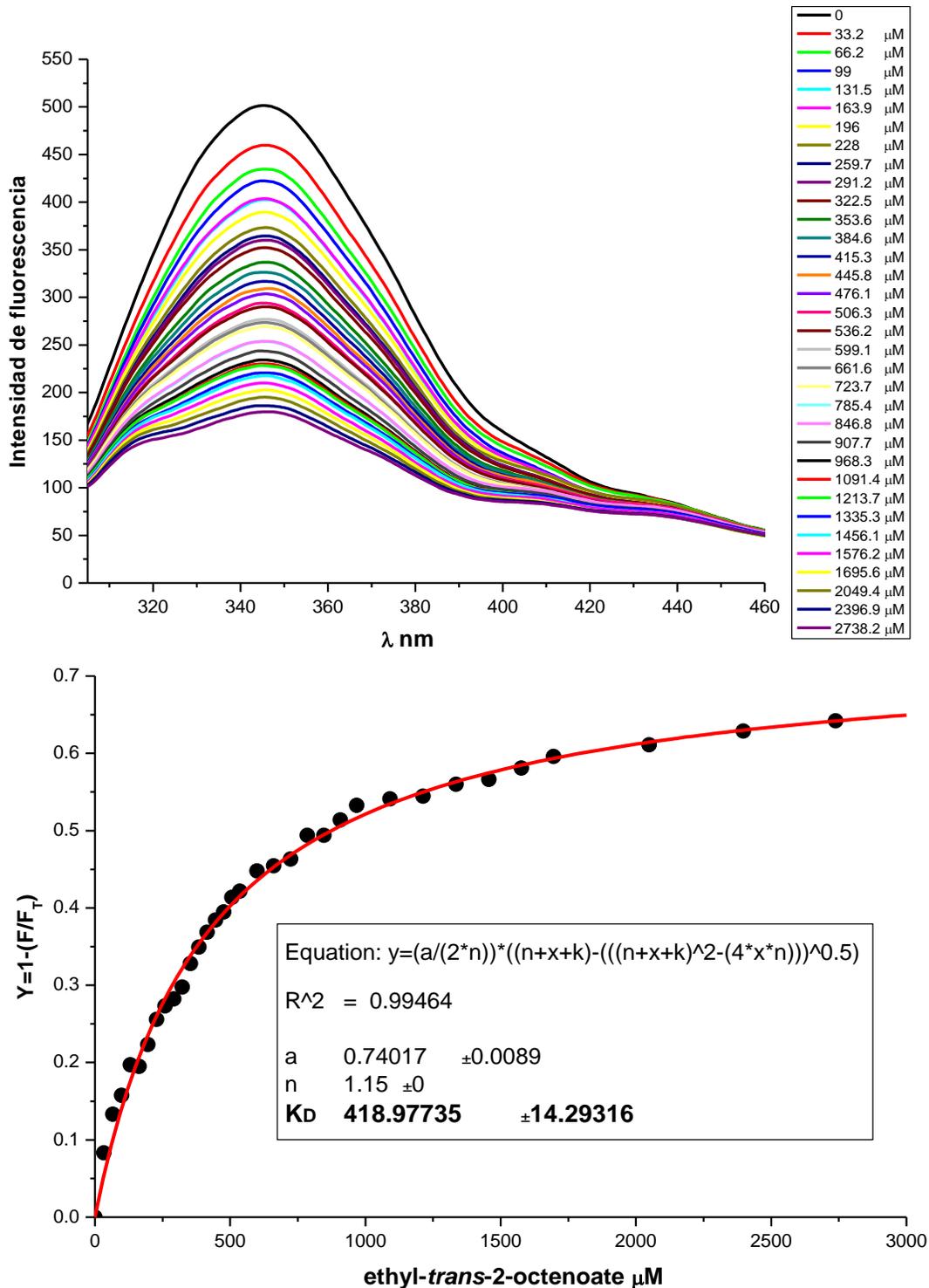


Figura 23. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del et-ONE con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del et-ONE que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del et-ONE, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del et-ONE con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

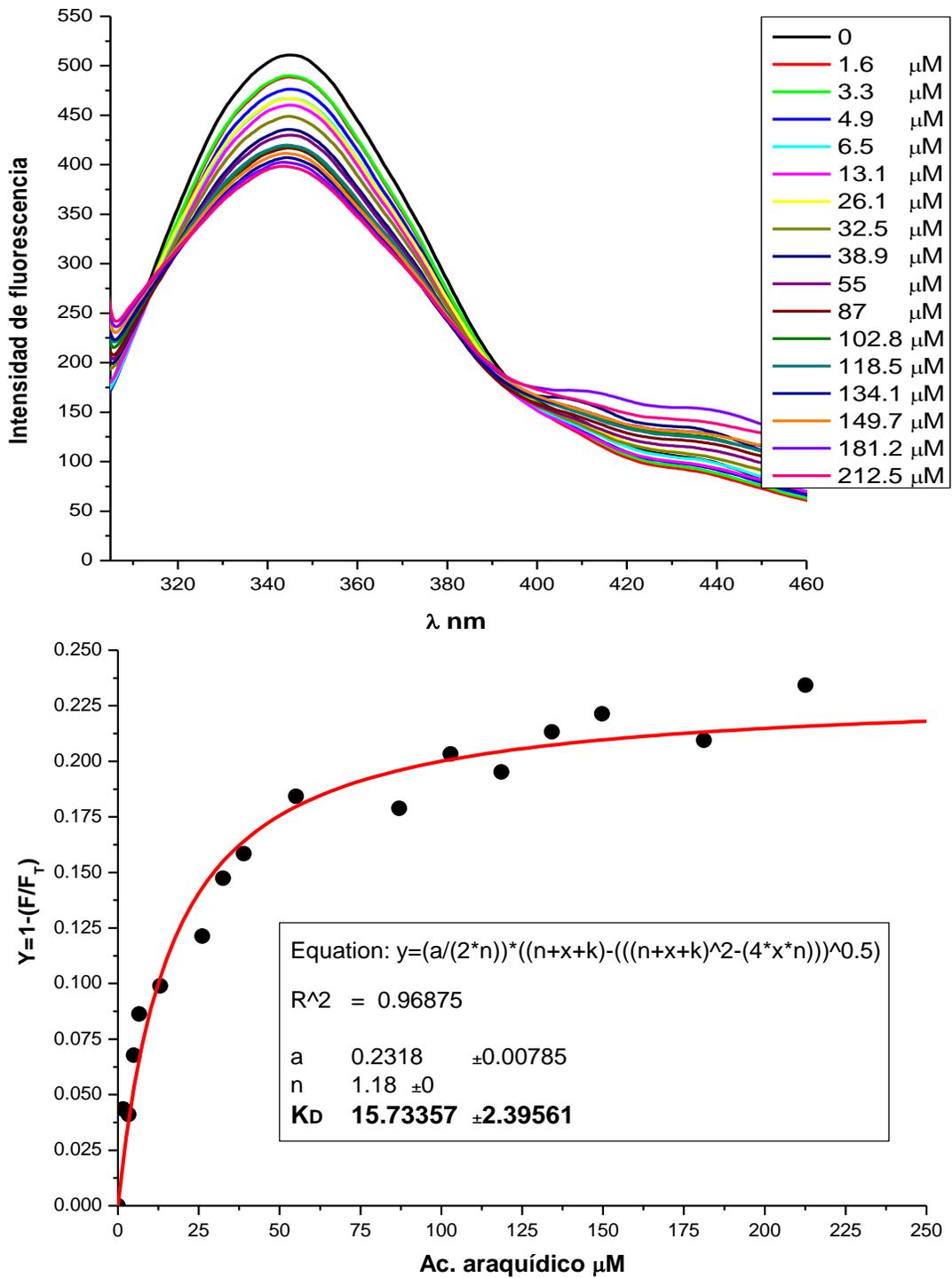


Figura 24. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del ácido araquídico con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del ácido araquídico que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ácido araquídico, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del ácido araquídico con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

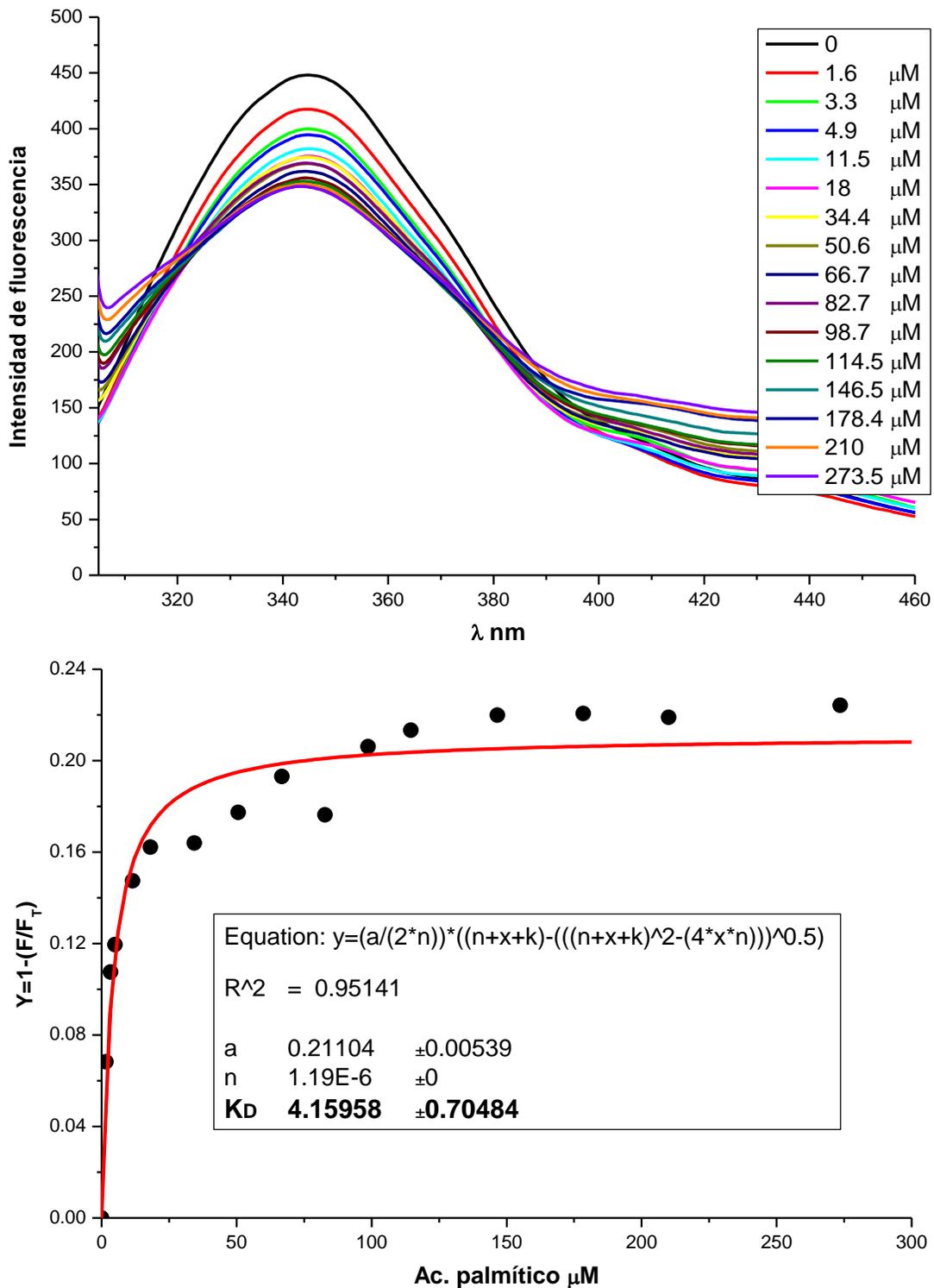


Figura 25. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del ácido palmítico con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del ácido palmítico que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración del ácido palmítico, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del ácido palmítico con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

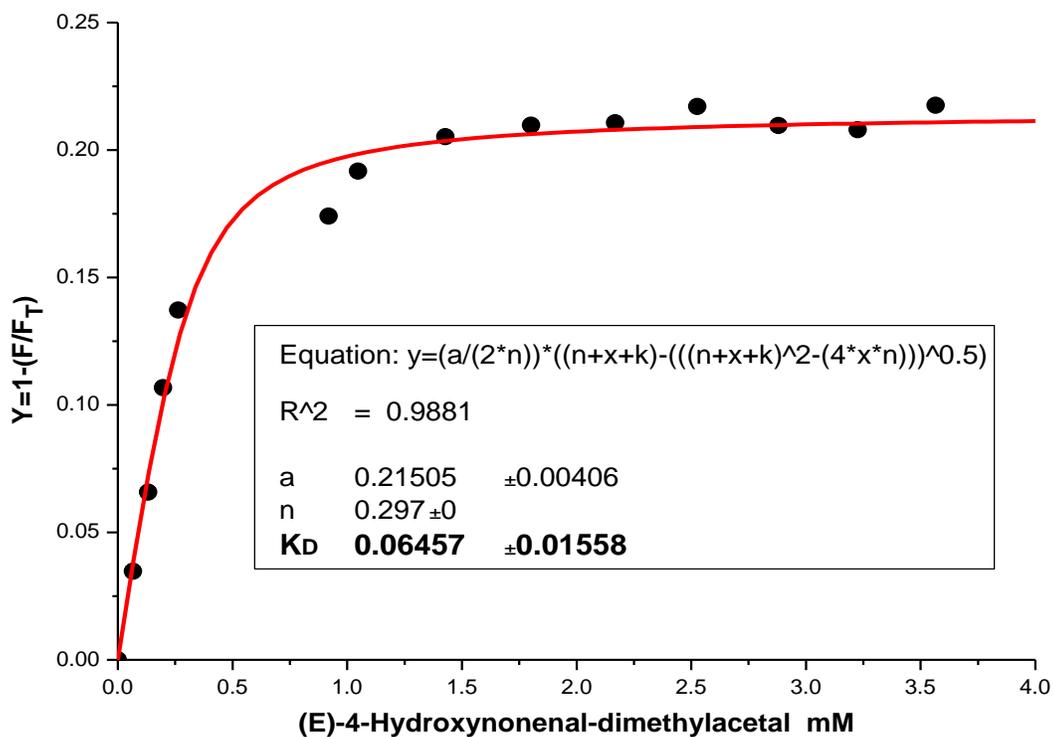
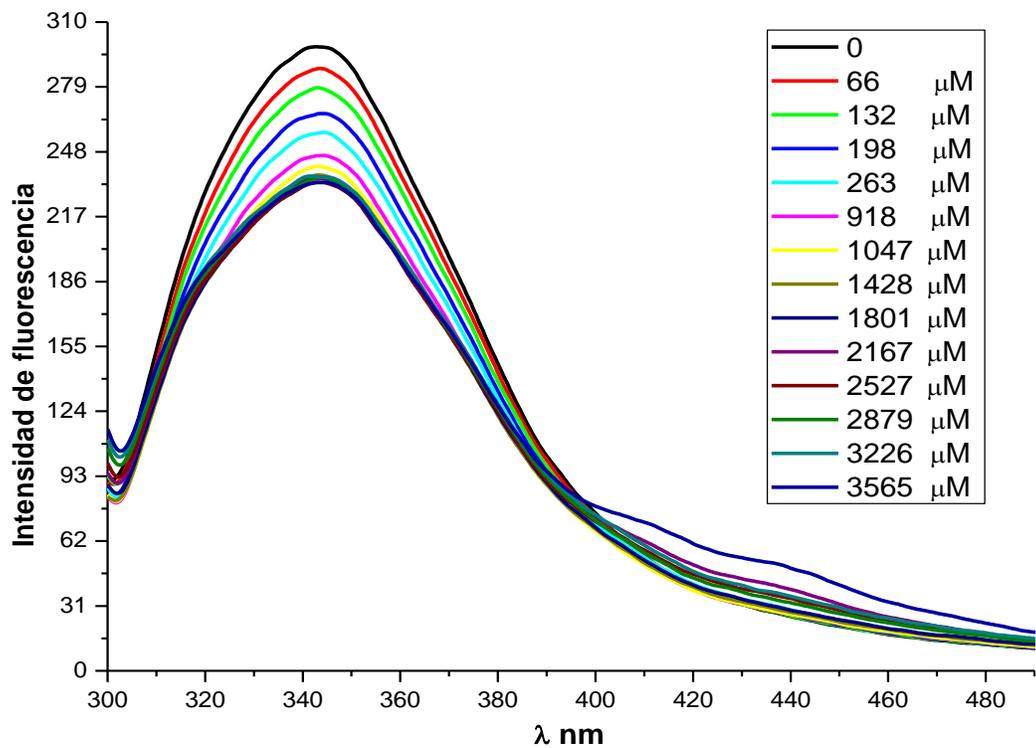


Figura 26. Gráficas que se utilizaron para determinar la K_D del HNE-D con la Ts26GST. Gráfica superior, apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST frente a la longitud de onda (nm), las concentraciones del HNE-D que corresponden para cada línea se indican en el recuadro de la derecha. Gráfica inferior, proporción de la fluorescencia (Y) frente a la concentración de HNE-D, utilizada para determinar el valor de la K_D de la unión del HNE-D con la Ts26GST. La gráfica inferior se construyó a partir de los datos que se obtuvieron con la gráfica superior.

Como se puede apreciar en las gráficas de las Figuras 13 a la 26, tanto el apagamiento de la fluorescencia intrínseca como el valor de K_D son similares entre las dos GSTs como entre los diferentes tipos de ligando. Siendo los dialdehídos los que apagaron prácticamente el 100% de la fluorescencia intrínseca a diferencia de los ácidos grasos que solo apagaron entre el 9 y 25% la fluorescencia intrínseca. Con respecto a la K_D , fueron los ácidos grasos los que presentaron un valor de K_D menor, lo que significa una mayor afinidad de los ácidos grasos con respecto al resto de los ligandos, siendo el et-ONE el que presentó una K_D más alta, lo que significa una menor afinidad de ambas GSTs por este compuesto.

En la Tabla 5 se muestran los datos del porcentaje de apagamiento de la fluorescencia y los valores de K_D de ambas GSTs para cada uno de los ligandos que se obtuvieron con las gráficas de las Figuras 13 a la 26.

Tabla 5. Valores porcentuales del apagamiento de la fluorescencia intrínseca y las K_D 's de cada ligando, con la TcGST y la Ts26GST.

| Ligandos | TcGST | | Ts26GST | |
|-------------------------------------|-------|------------------|---------|------------------|
| | % F | K_D (μ M) | % F | K_D (μ M) |
| ácido araquídico | 15.25 | 3.07 | 24.74 | 15.73 |
| ácido palmítico | 9.91 | 3.76 | 22.41 | 4.15 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-hexadienal | 100 | 20.34 | 99.76 | 19.6 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal | 100 | 17.76 | 99.5 | 15.53 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal | 100 | 14.42 | 99.71 | 11.64 |
| ethyl- <i>trans</i> -2-octenoate | 44.28 | 632.19 | 73.18 | 418.97 |
| (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal | ND | ND | 21.7 | 64.57 |

% F: porcentaje de apagamiento de la fluorescencia, ND: No determinada.

4.4. Estequiometría

Adicionalmente, se buscó determinar el número de sitios de unión que las GSTs tienen para cada uno de los ligandos analizados. Con este fin se utilizó una metodología descrita por Caccuri *et al.*, 1990, basada en los datos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las GSTs y que se describió anteriormente en la sección 3.7.

La figura 27 muestra el decaimiento de la fluorescencia intrínseca de la TcGST en función del incremento del tt-HDE. En el recuadro se puede apreciar el valor de $Q = 0.0130$ (Ecuación 4), equivalente al valor de E en la Ecuación 5, con la que se ajustaron los datos de ésta gráfica. La confiabilidad de la prueba resultó ser de $r^2 = 0.9988$.

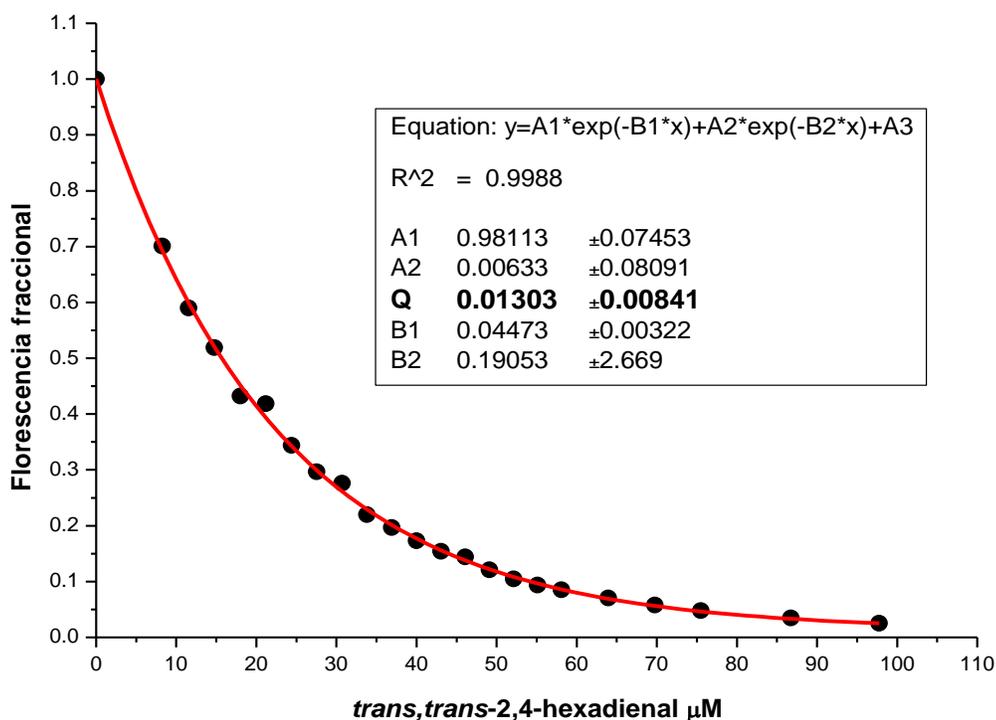


Figura 27. Gráfica de la Fluorescencia fraccional frente a la concentración de tt-HDE utilizando a la TcGST, con la cual se obtuvo Q (0.0130 de Fluorescencia fraccional).

Con el valor de Q se procedió a usar las Ecuaciones 4 y 6 para calcular tanto el ligando libre (L) como el unido a la TcGST (V) y con estos valores construir la gráfica de la Figura 28. Dicha gráfica nos indica el número de sitios de unión así como la afinidad de cada uno de estos sitios.

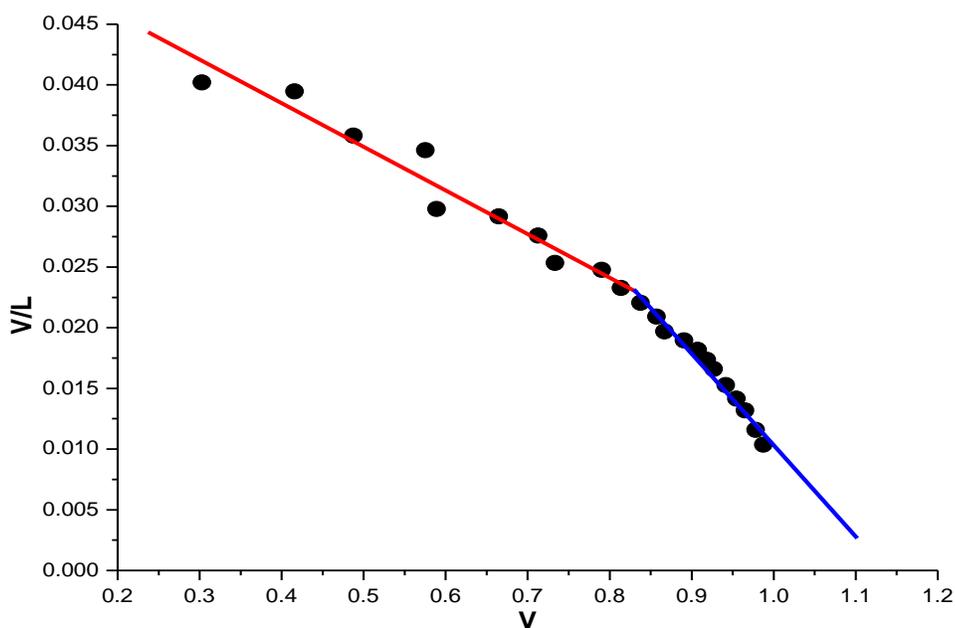


Figura 28. Gráfica de Scatchard del tt-HDE unido a la TcGST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de baja afinidad (—) de 0 a 36.91 μM y otro de alta afinidad (—) de 40 a 97.74 μM de tt-HDE.

De las Figuras 29 a la 40 se muestran las gráficas que se utilizaron para determinar el número de sitios de unión presentes en la TcGST y la Ts26GST para los otros ligandos.

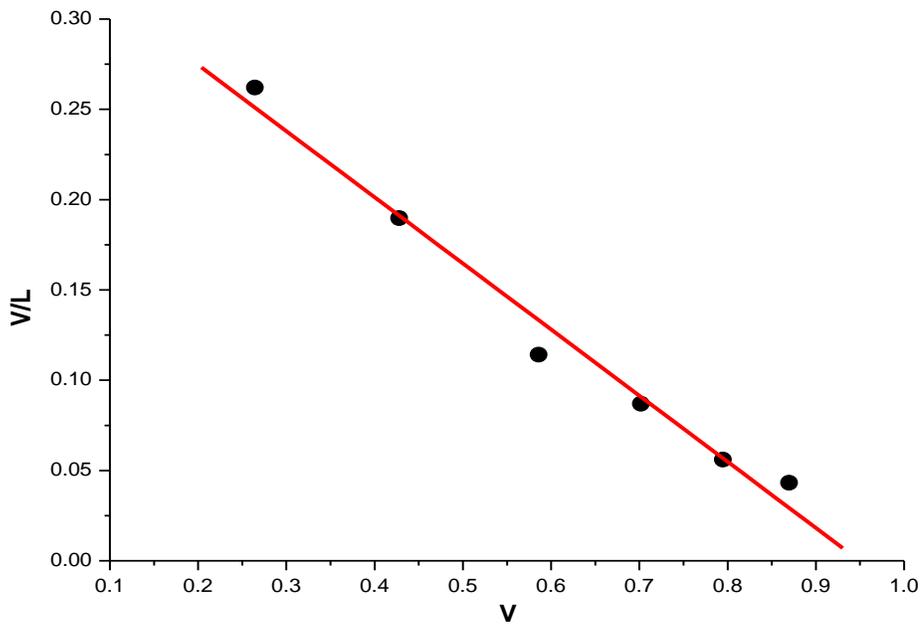


Figura 29. Gráfica de Scatchard del ac. araquídico unido a la TcGST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar una sola pendiente que tiende hacia el 0.95 en el eje de las abscisas, lo que nos indica un solo sitio de unión para el ac. araquídico.

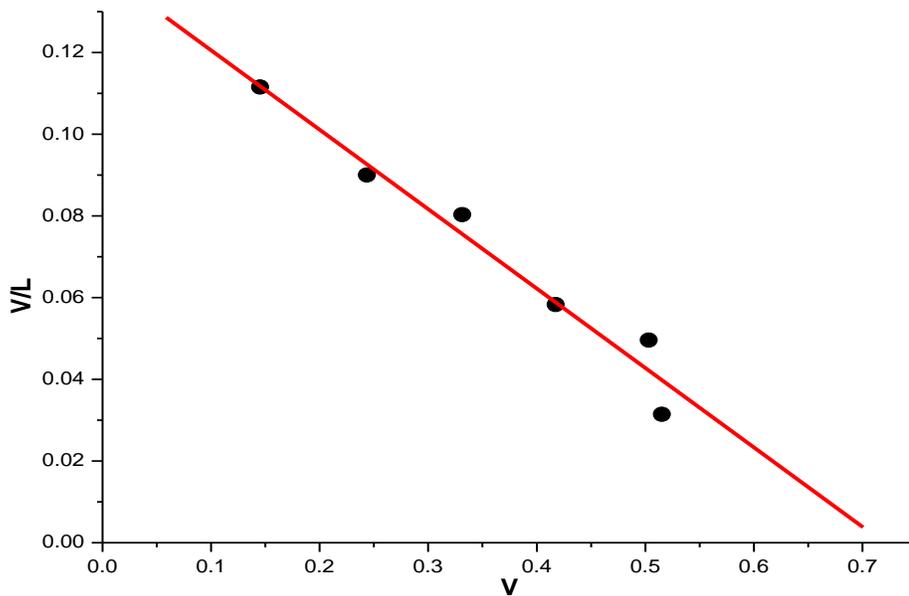


Figura 30. Gráfica de Scatchard del ac. palmítico unido a la TcGST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar una sola pendiente que tiende hacia el 0.7 en el eje de las abscisas, lo que nos indica un solo sitio de unión para el ac. palmítico.

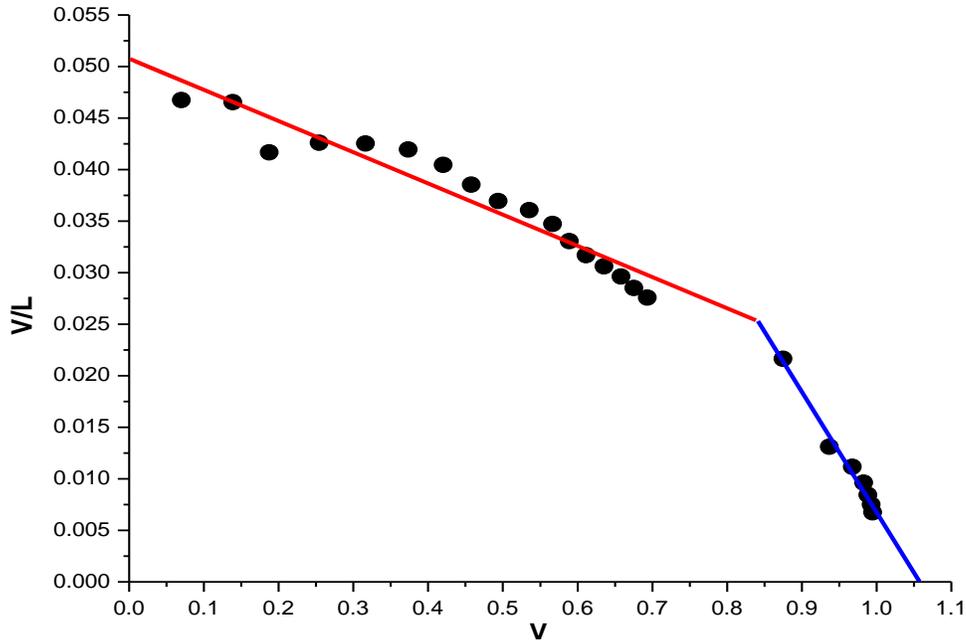


Figura 31. Gráfica de Scatchard del tt-NDE unido a la TcGST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de baja afinidad (—) de 0 a 26.81 μM y otro de alta afinidad (—) de 42.53 a 149.89 μM de tt-NDE.

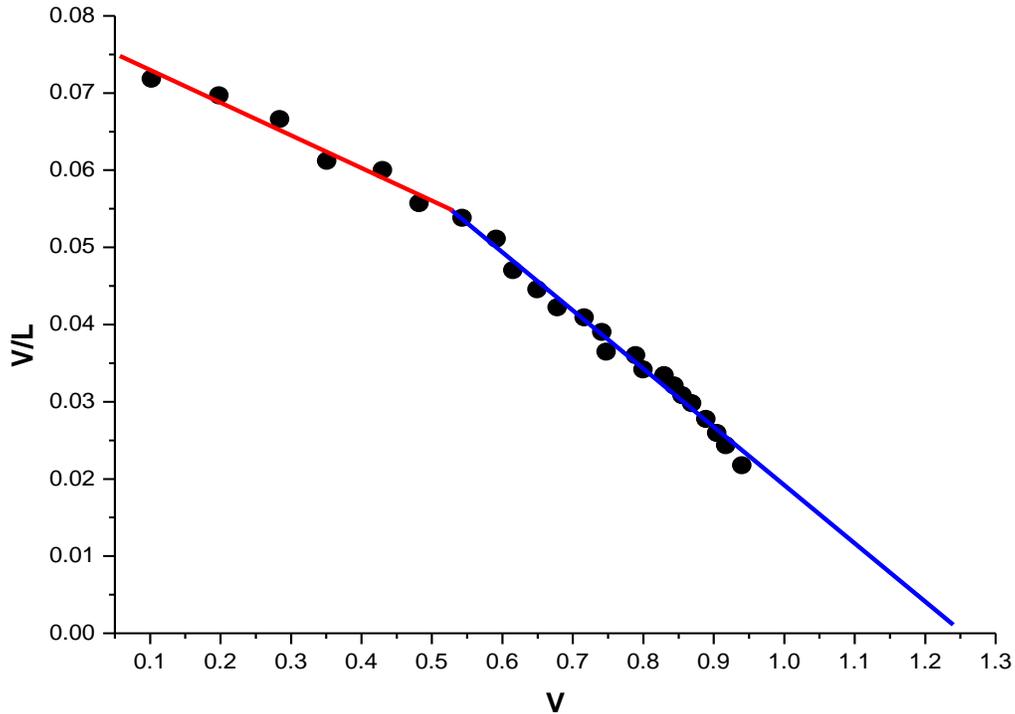


Figura 32. Gráfica de Scatchard del tt-DDE unido a la TcGST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de baja afinidad (—) de 0 a 8.19 μM y otro de alta afinidad (—) de 9.8 a 45.45 μM de tt-DDE.

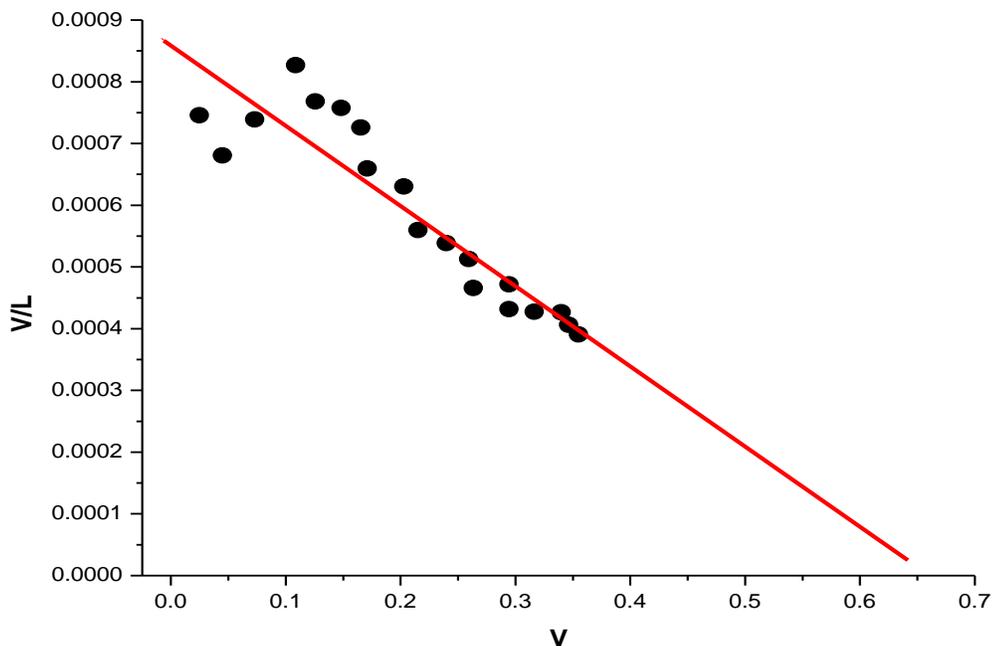


Figura 33. Gráfica de Scatchard del et-ONE unido a la TcGST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar una sola pendiente que tiende hacia el 0.65 en el eje de las abscisas, lo que nos indica un solo sitio de unión para el ac. et-ONE.

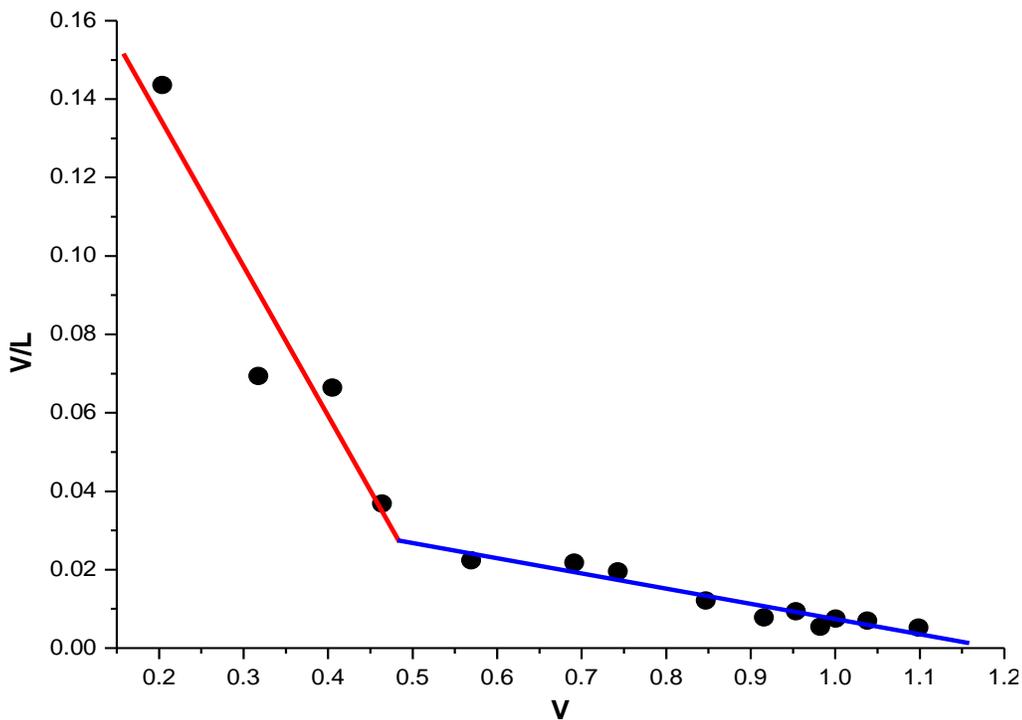


Figura 34. Gráfica de Scatchard del ac. araquídico unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de alta afinidad (—) de 0 a 26.12 μM y otro de baja afinidad (—) de 32.55 a 212.59 μM de ac. araquídico.

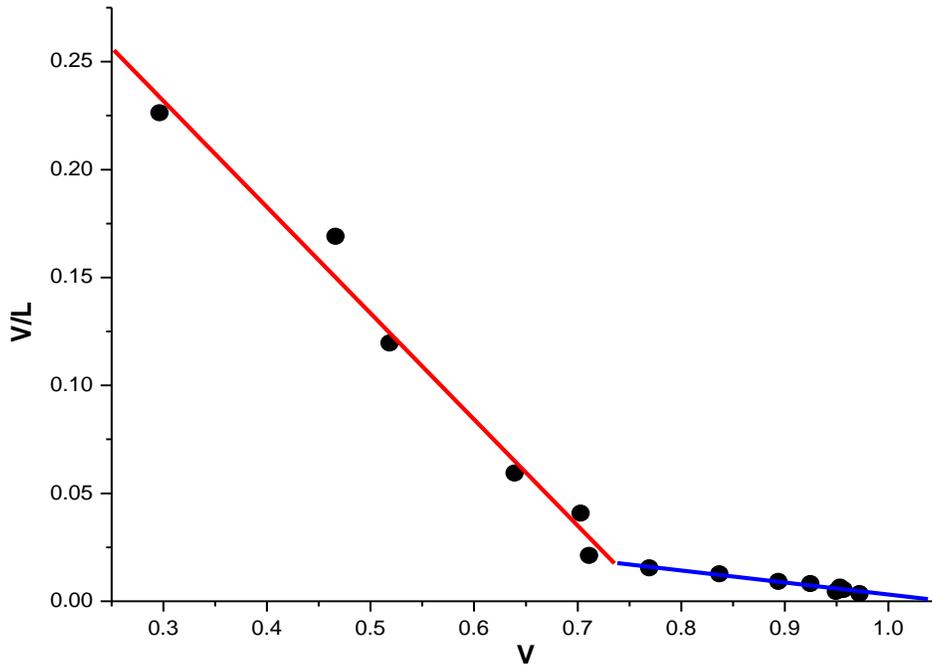


Figura 35. Gráfica de Scatchard del ac. palmítico unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de alta afinidad (—) de 0 a 26.12 μM y otro de baja afinidad (—) de 32.55 a 212.59 μM de ac. palmítico.

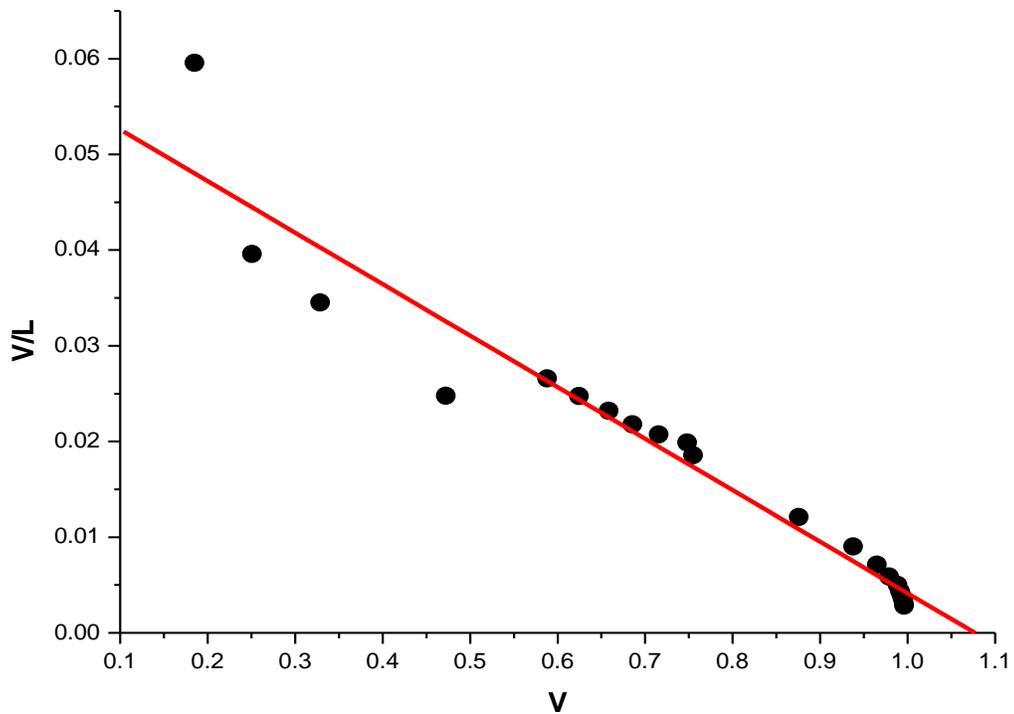


Figura 36. Gráfica de Scatchard del tt-HDE unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar una sola pendiente que tiende hacia el 1.07 en el eje de las abscisas, lo que nos indica un solo sitio de unión para el tt-HDE.

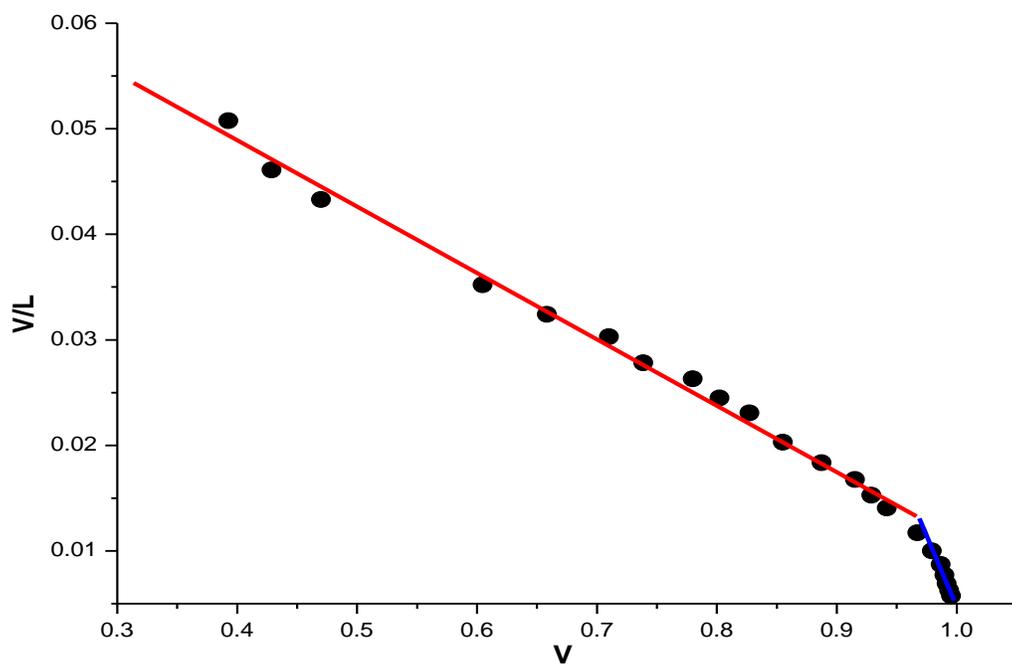


Figura 37. Gráfica de Scatchard del tt-NDE unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de baja afinidad (—) de 0 a 43.12 μM y otro de alta afinidad (—) de 49.41 a 175.08 μM de tt-NDE.

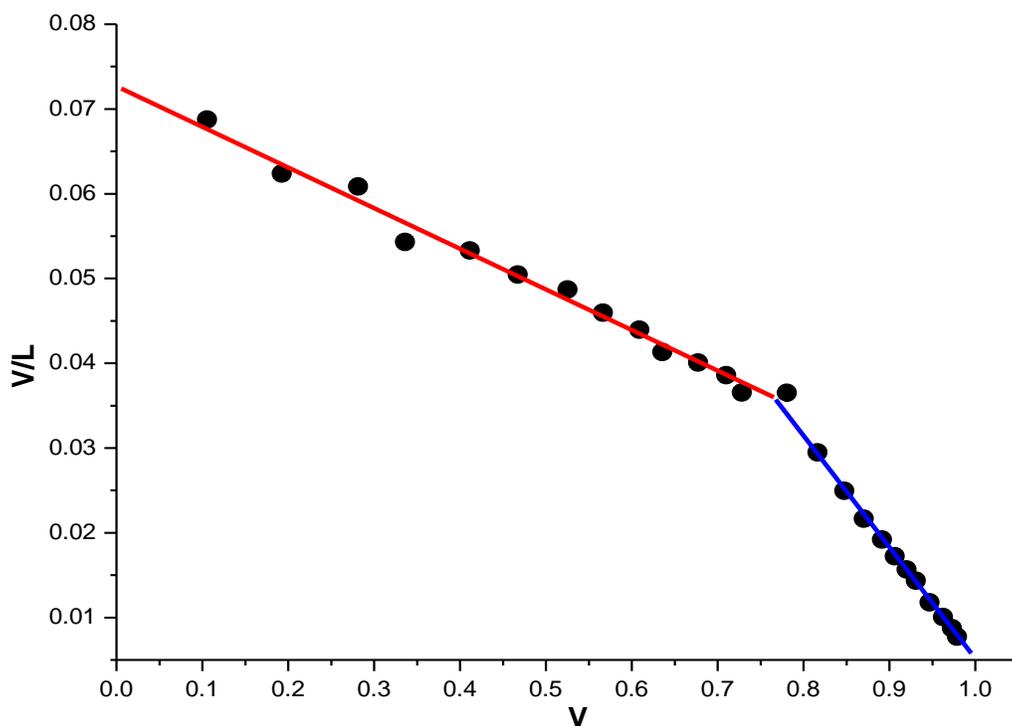


Figura 38. Gráfica de Scatchard del tt-DDE unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de baja afinidad (—) de 0 a 22.29 μM y otro de alta afinidad (—) de 28.64 a 127.44 μM de tt-DDE.

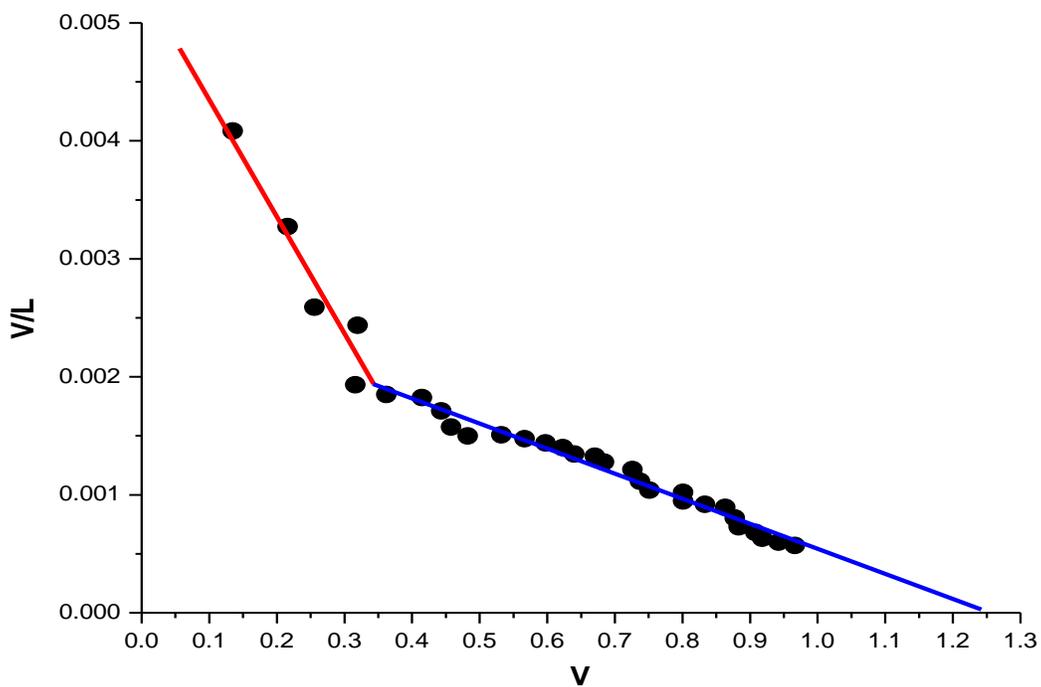


Figura 39. Gráfica de Scatchard del et-ONE unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar dos sitios de unión (pendientes), uno de alta afinidad (—) de 0 a 196.07 μM y otro de baja afinidad (—) de 228.01 a 2738.28 μM de et-ONE.

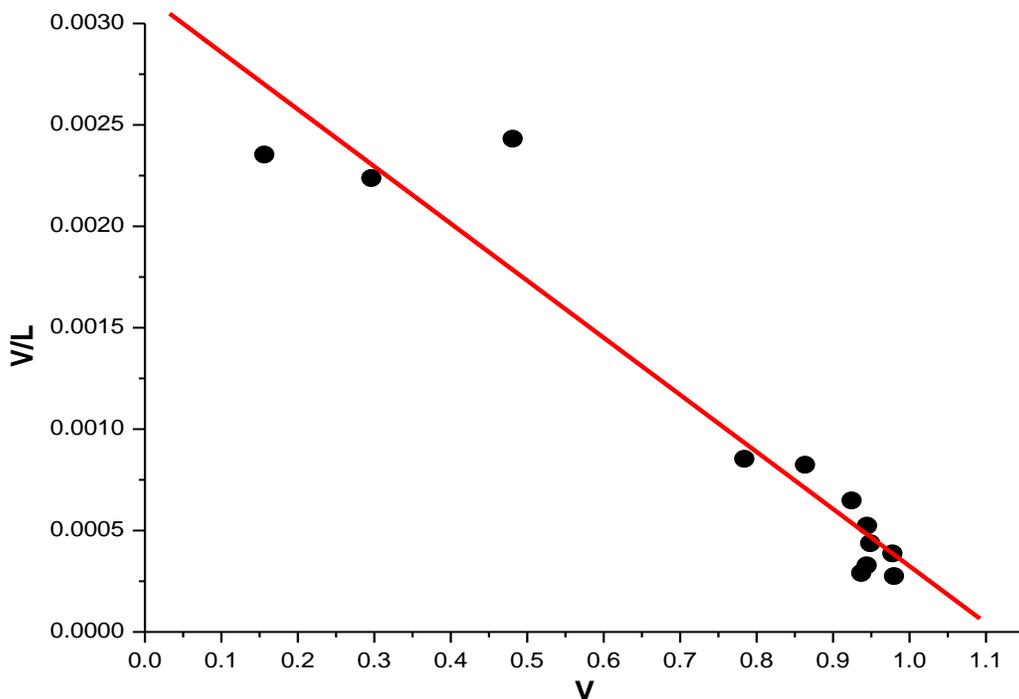


Figura 40. Gráfica de Scatchard del HNE-D unido a la Ts26GST. V y L se obtuvieron con las Ecuaciones 5 y 7. En la gráfica se pueden observar una sola pendiente que tiende hacia el 1.1 en el eje de las abscisas, lo que nos indica un solo sitio de unión para el HNE-D.

Con las gráficas de las Figuras 28 a la 40 se determinó que todos los ligandos que utilizamos a excepción del HNE-D, presentan de uno a dos sitios de unión en ambas GSTs. El HNE-D presentó sólo un sitio de unión para la Ts26GST siendo la única GST con la que se pudo hacer el análisis estequiométrico de este ligando. Una ventaja de estos análisis, es que las pendientes de las gráficas nos indicaron diferencias de afinidad entre los sitios de unión presentes en una misma GST.

Los resultados obtenidos por este método son similares a lo reportados por Sluis-Cremer *et al.*, 1996, quienes indican que las GSTs poseen un sólo sitio de alta afinidad para la unión de ligandos aniónicos hidrofóbicos, que se encuentra en la hendidura formada por las dos subunidades. Es importante comentar que las gráficas de las Figuras 29, 31, 34, 36 y 40, presentan mucha dispersión y/o una falta de puntos (mediciones); sin embargo, creemos que en general los datos obtenidos son confiables.

Una de las causas posibles de la dispersión observada en las gráficas pudo ser, el uso de soluciones con diferentes concentraciones de ligando en los ensayos de inhibición de la fluorescencia intrínseca, por lo tanto, la dispersión observada podría reducirse con algunas repeticiones de los ensayos, el uso de menos saltos de concentración de ligando en los mismos y aumentando el número de mediciones en los ensayos que así lo requieran.

En la Tabla 6 se indica el número de sitios de unión que tiene cada una de las GSTs para cada ligando, estos datos se determinaron con ayuda de las gráficas de las Figuras 28 a la 40, las cuales se construyeron con los datos que se obtuvieron de gráficas como la de la Figura 27 que se llevaron a cabo para cada uno de los ligandos y con cada una de las GSTs.

Tabla 6. Número de sitios de unión para cada ligando en la TcGST y la Ts26GST.

| Ligandos | TcGST | Ts26GST |
|-------------------------------------|-------|---------|
| ácido araquídico | 1 | 2 |
| ácido palmítico | 1 | 2 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-hexadienal | 2 | 1 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal | 2 | 2 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal | 2 | 2 |
| ethyl- <i>trans</i> -2-octenoate | 1 | 2 |
| (E)-4-Hydroxynonenal-dimethylacetal | ND | 1 |

ND: No determinada.

4.5. Análisis cinéticos (inhibición)

Una forma adicional de corroborar que cada uno de los ligandos utilizados en este trabajo se están uniendo a cada una de las dos GSTs, es a través de su efecto inhibitorio sobre la función catalítica de ambas enzimas parasitarias. De la figura 41 a la 49 se observan las gráficas del porcentaje de la actividad residual versus el logaritmo de la concentración de los ligandos así como las gráficas de doble inversa (Linweaver-Burk), utilizadas para determinar tanto el tipo de inhibición como los valores de la K_i para ambas enzimas parasitarias.

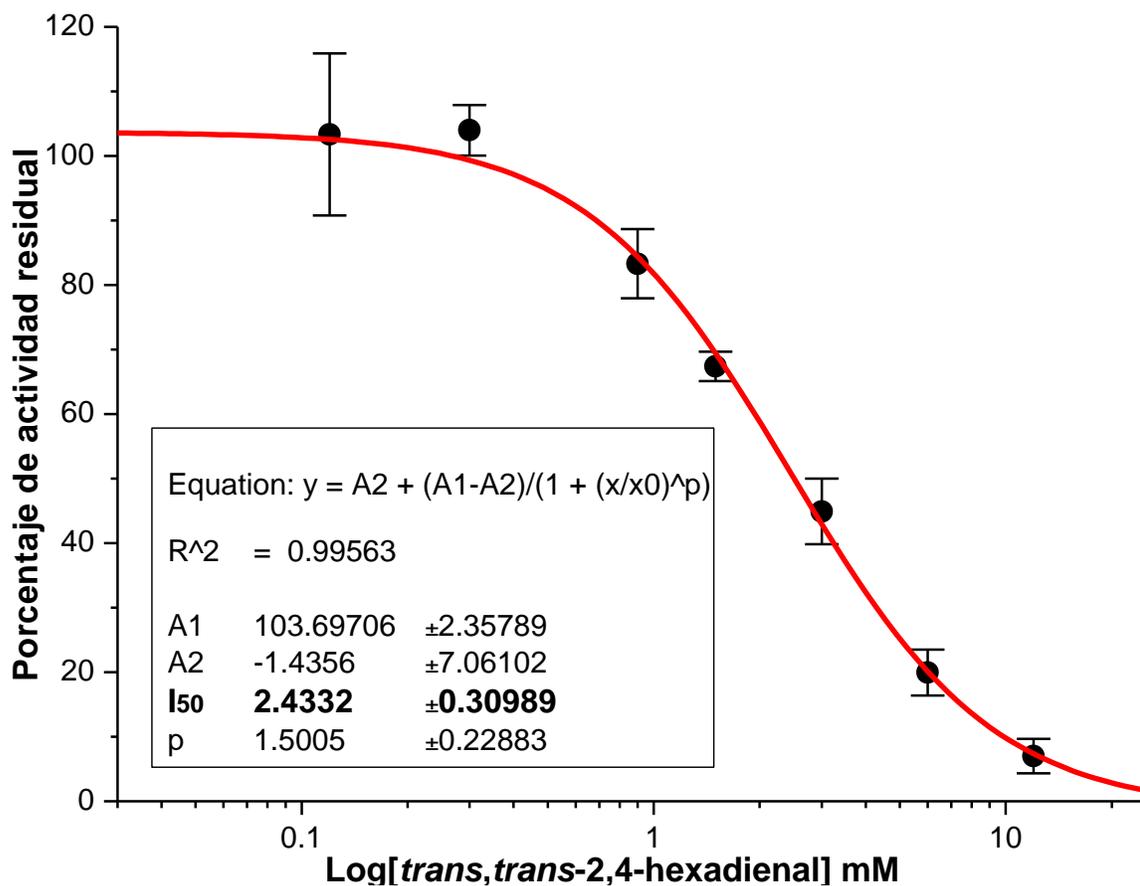


Figura 41. Gráfica del porcentaje de actividad residual de la TcGST frente a la concentración del tt-HDE para calcular el valor de I_{50} de la enzima hacia este compuesto.

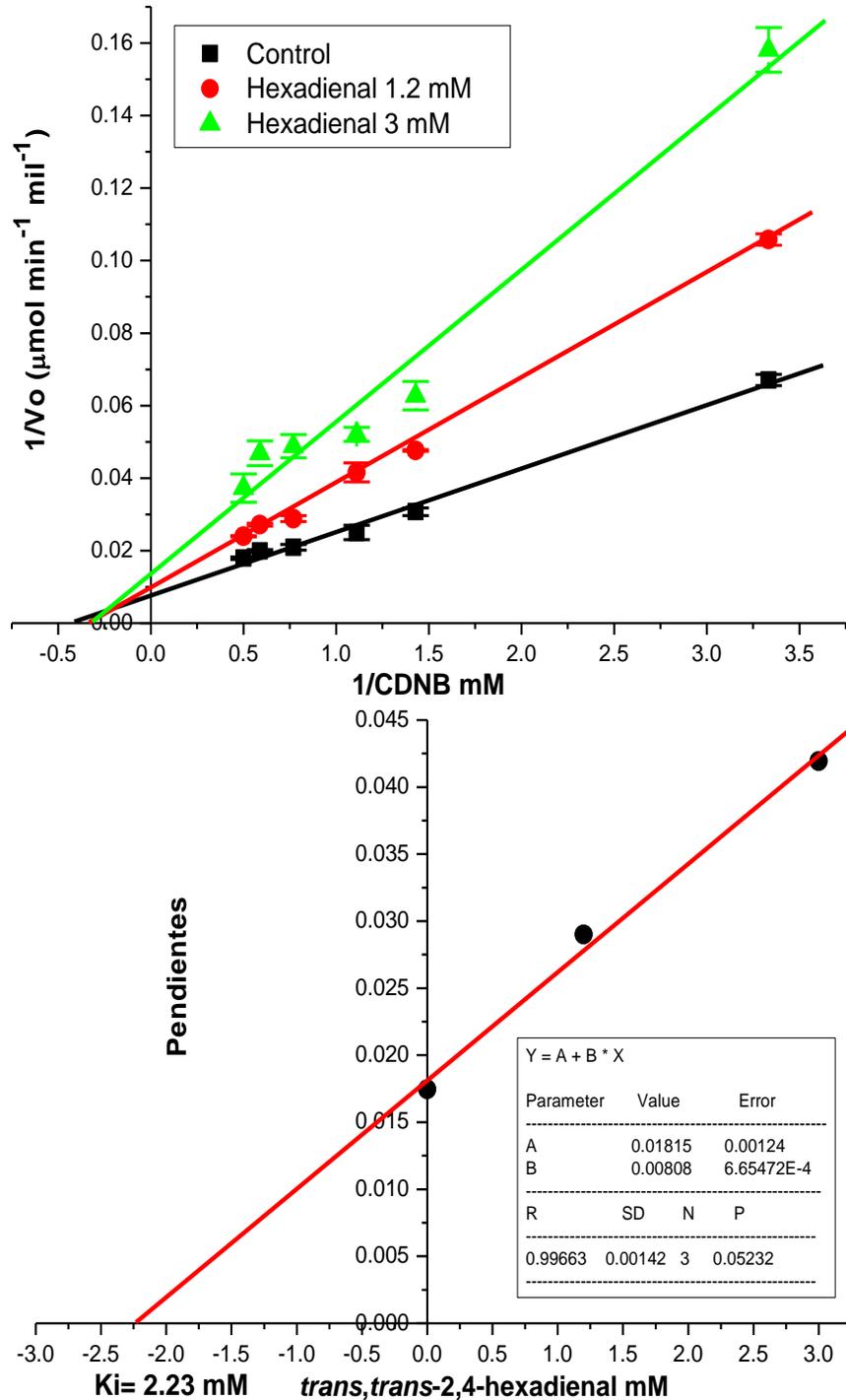


Figura 42. Tipo de inhibición (gráfica superior) y K_i (gráfica inferior) del *tt*-HDE sobre la actividad de la TcGST. Gráfica superior muestra el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de *tt*-HDE 1.2 mM (●) y 3 mM (▲) respectivamente. Gráfica inferior, gráfica secundaria derivada de la doble inversa que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en esta última se graficó el valor de la pendiente de cada una de las series de la gráfica superior frente a la concentración del *tt*-HDE. El valor de la $K_i=2.23$ mM lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

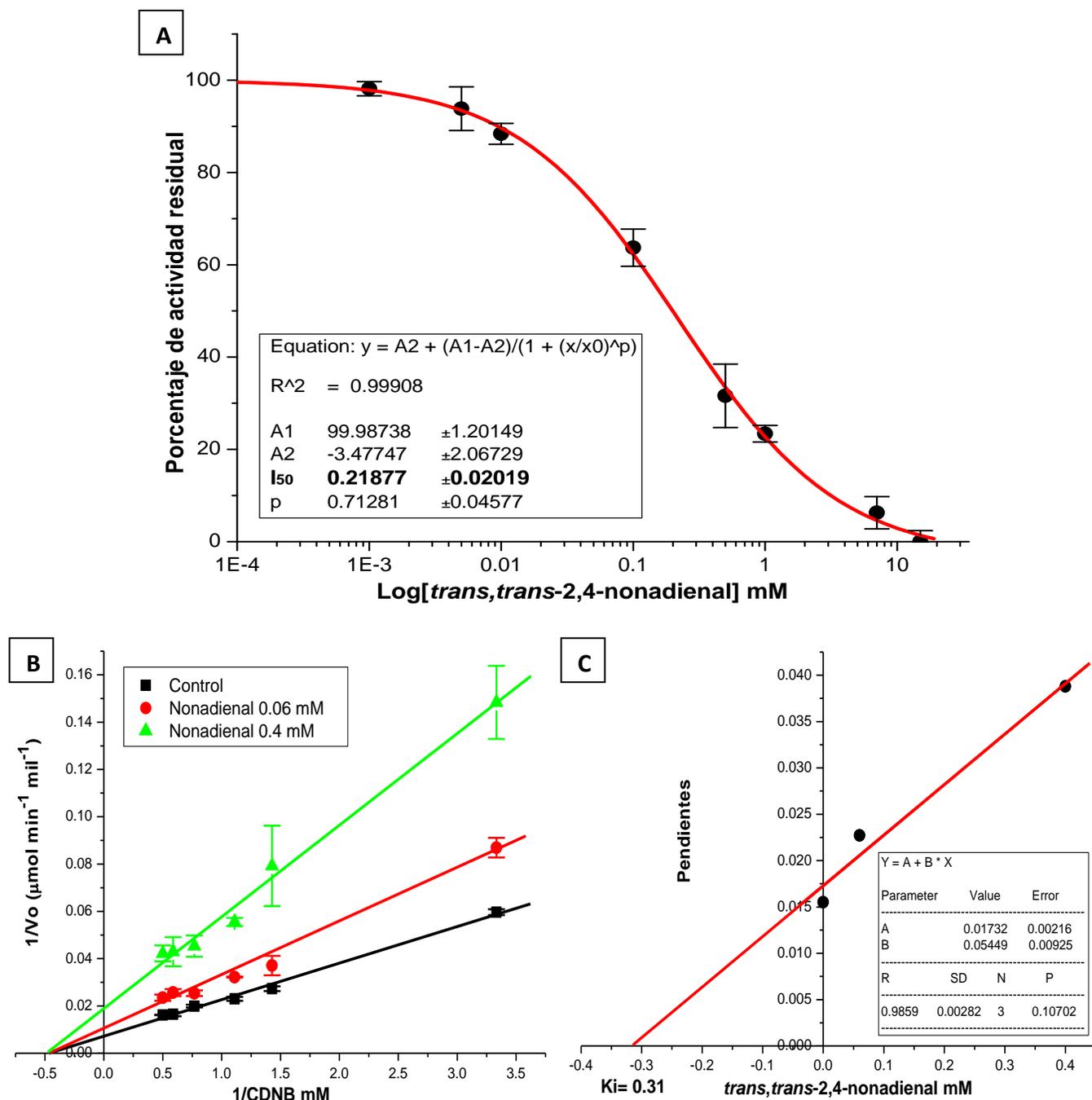


Figura 43. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del tt-NDE con la TcGST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del tt-NDE para calcular el valor de I_{50} . Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de tt-NDE 0.06 mM (●) y 0.4 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de la pendiente de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del tt-NDE. El valor de la $K_i=0.31$ mM lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

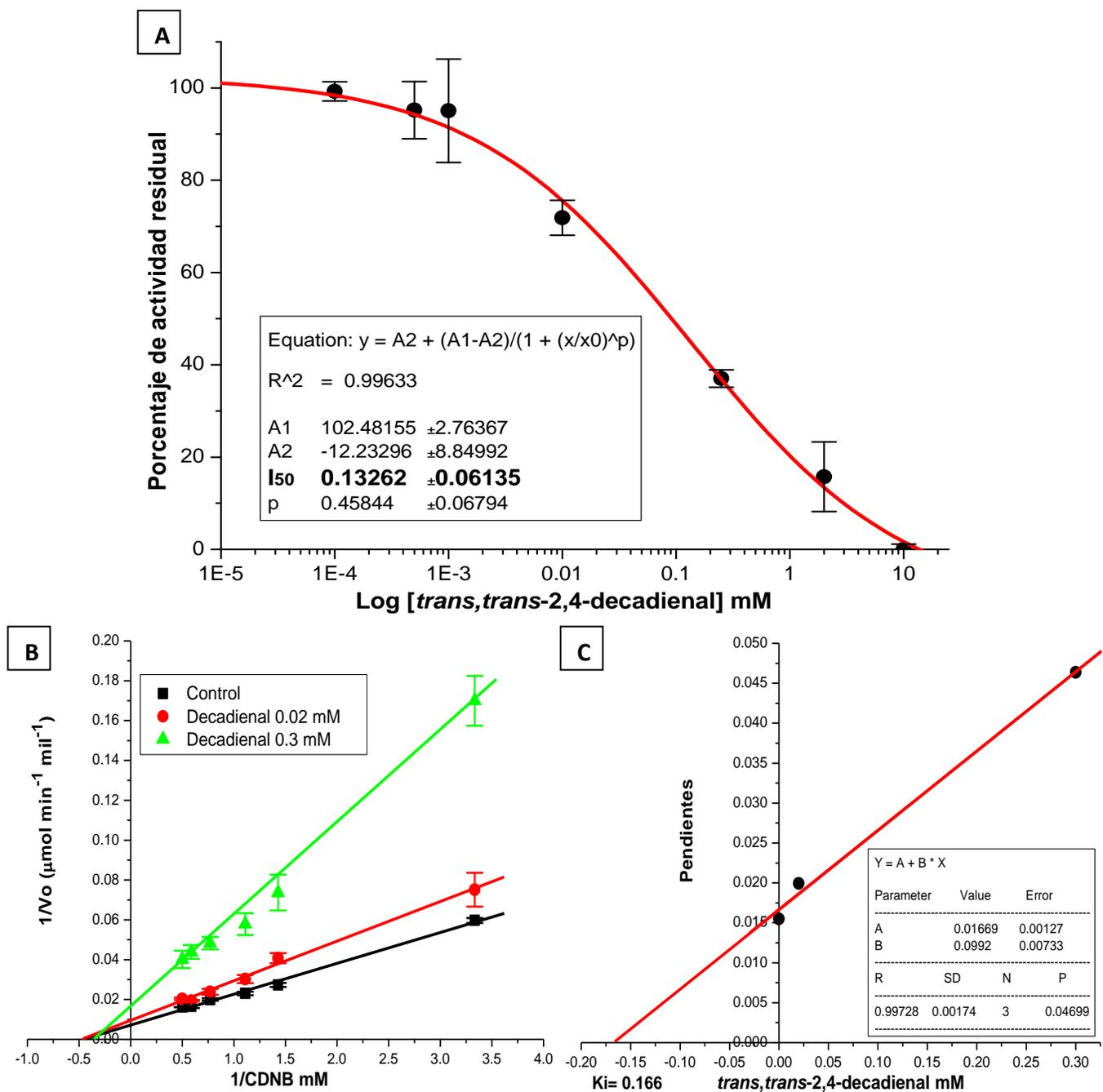


Figura 44. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del tt-DDE con la TcGST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del tt-DDE para calcular el valor de I50. Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de tt-DDE 0.02 mM (●) y 0.3 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de la pendiente de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del tt-DDE. El valor de la $K_i=0.166$ mM lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

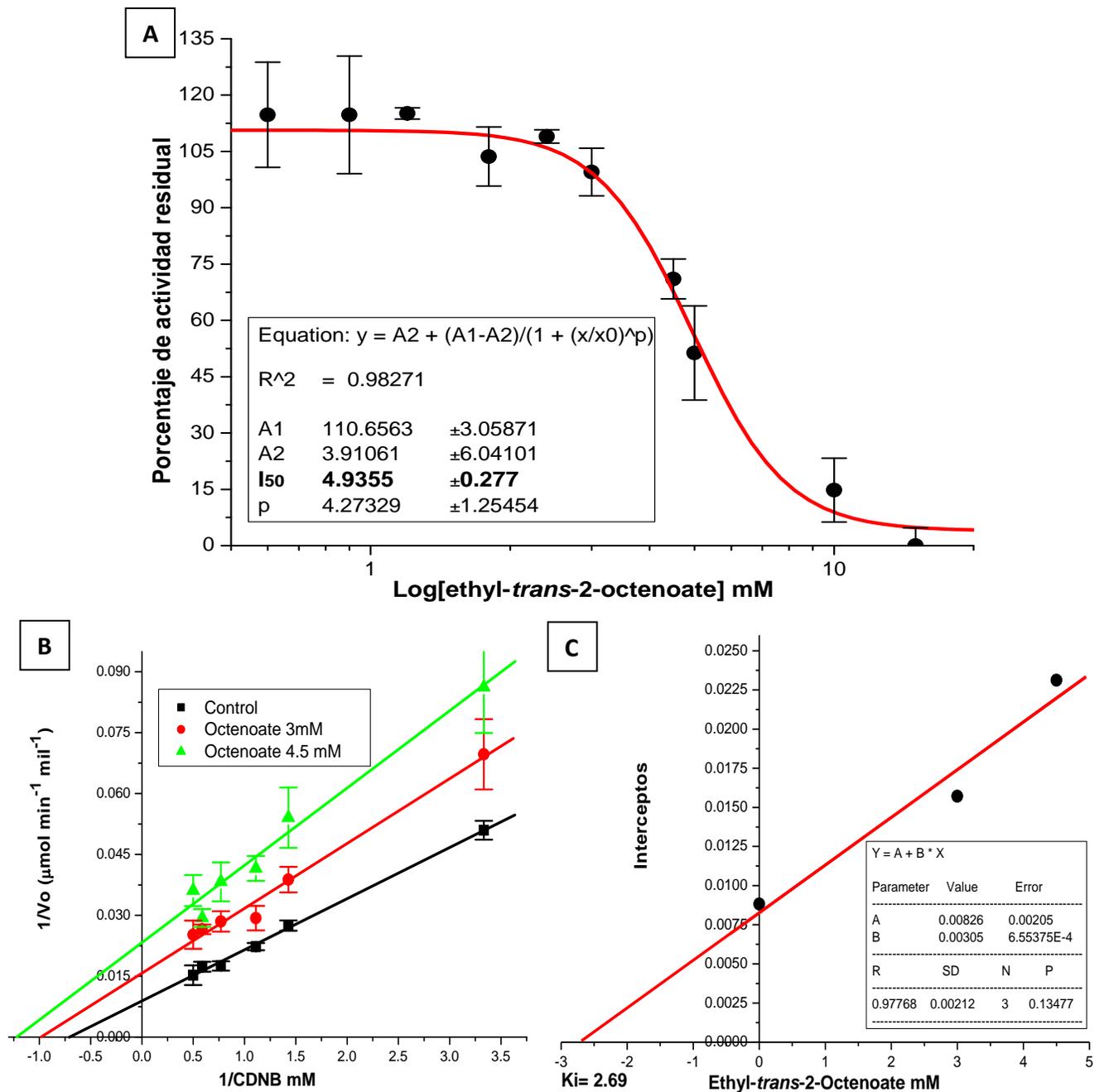


Figura 45. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del et-ONE con la TcGST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del et-ONE para calcular el valor de I50. Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de et-ONE 3 mM (●) y 4.5 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de los interceptos en el eje de las ordenadas de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del et-ONE. El valor de la $K_i=2.69$ mM lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

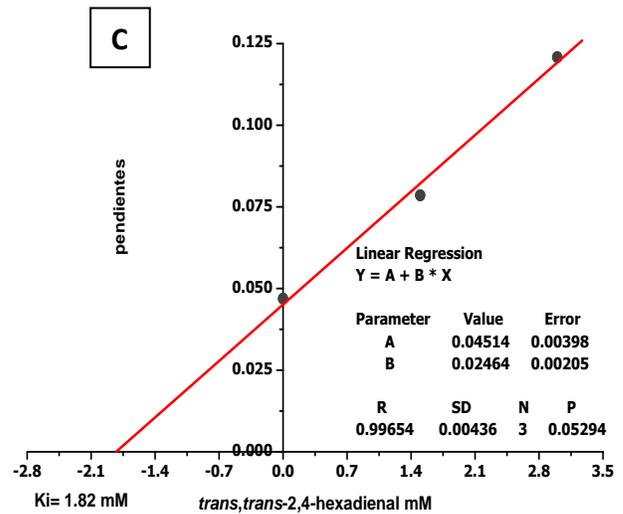
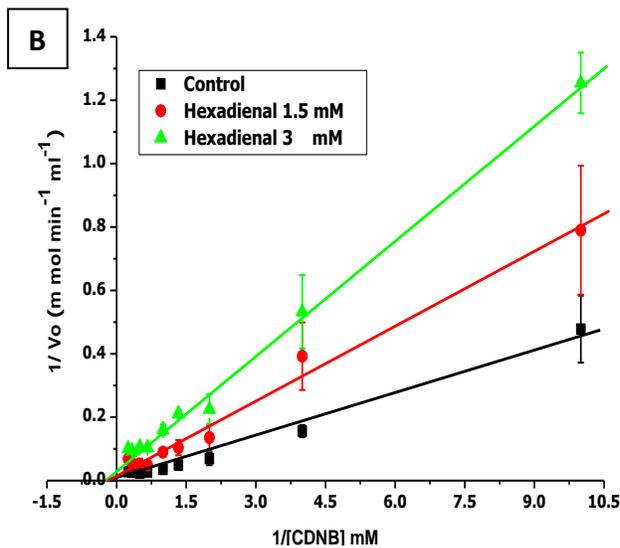
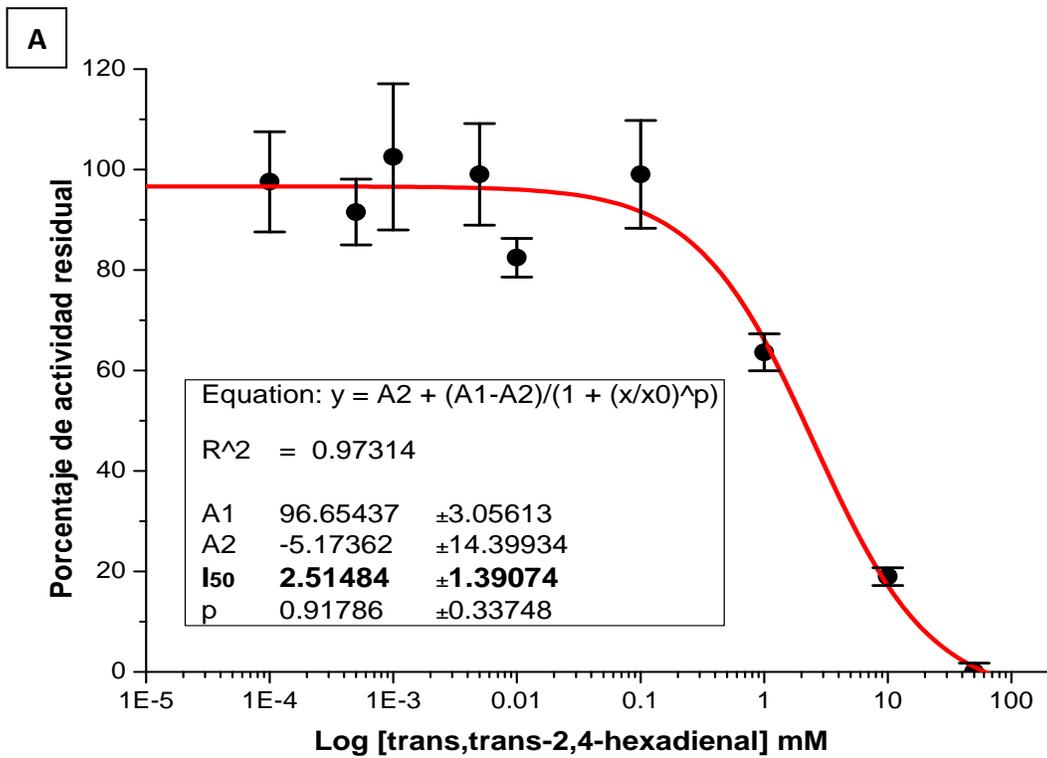


Figura 46. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del tt-HDE con la Ts26GST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del tt-HDE para calcular el valor de Iso. Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de tt-HDE 1.5 mM (●) y 3 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de la pendiente de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del tt-HDE. El valor de la $K_i = 1.82 \text{ mM}$ lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

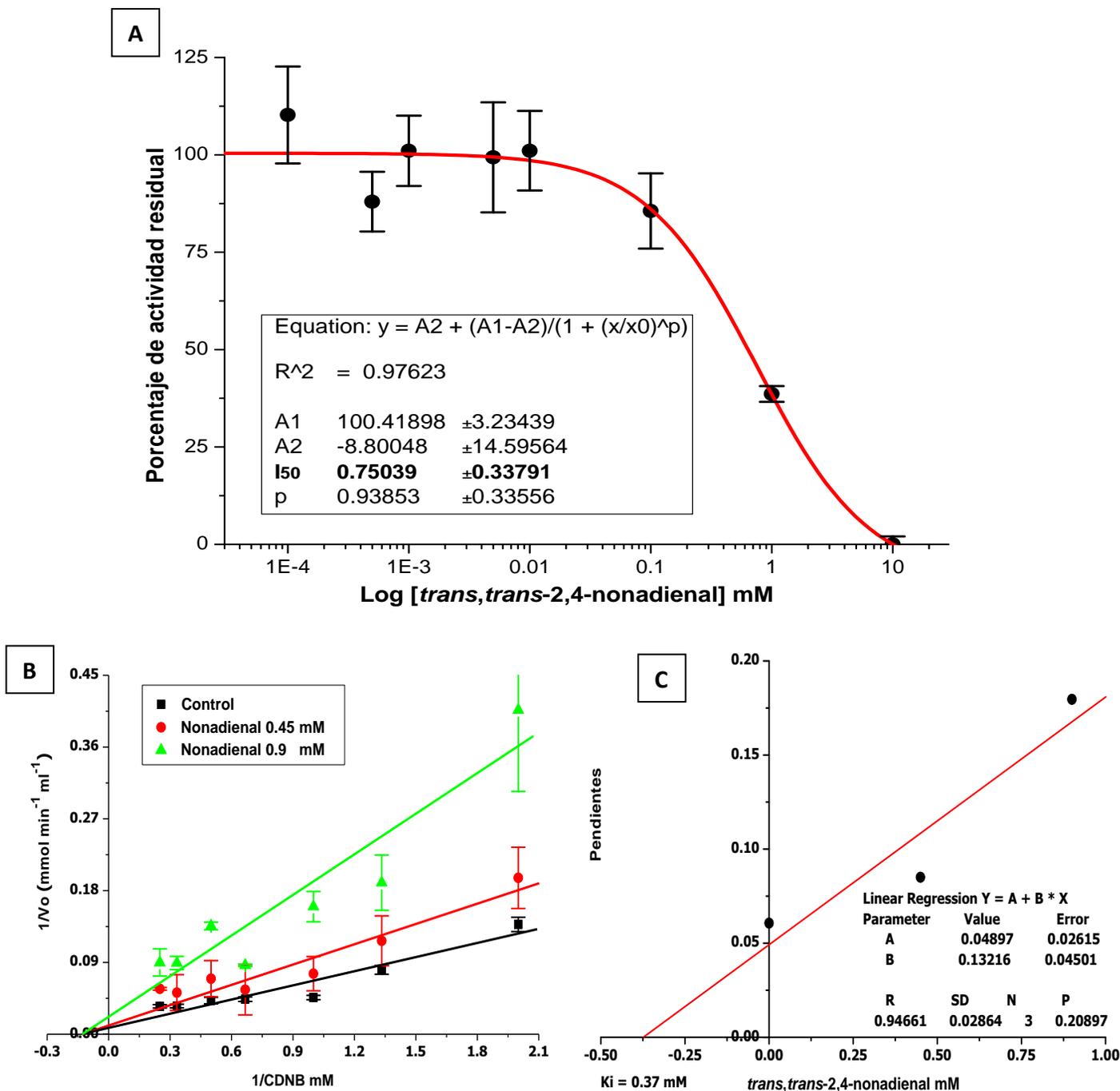


Figura 47. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del tt-NDE con la Ts26GST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del tt-NDE para calcular el valor de I50. Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de tt-NDE 1.5 mM (●) y 3 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de la pendiente de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del tt-NDE. El valor de la $K_i=0.37 \text{ mM}$ lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

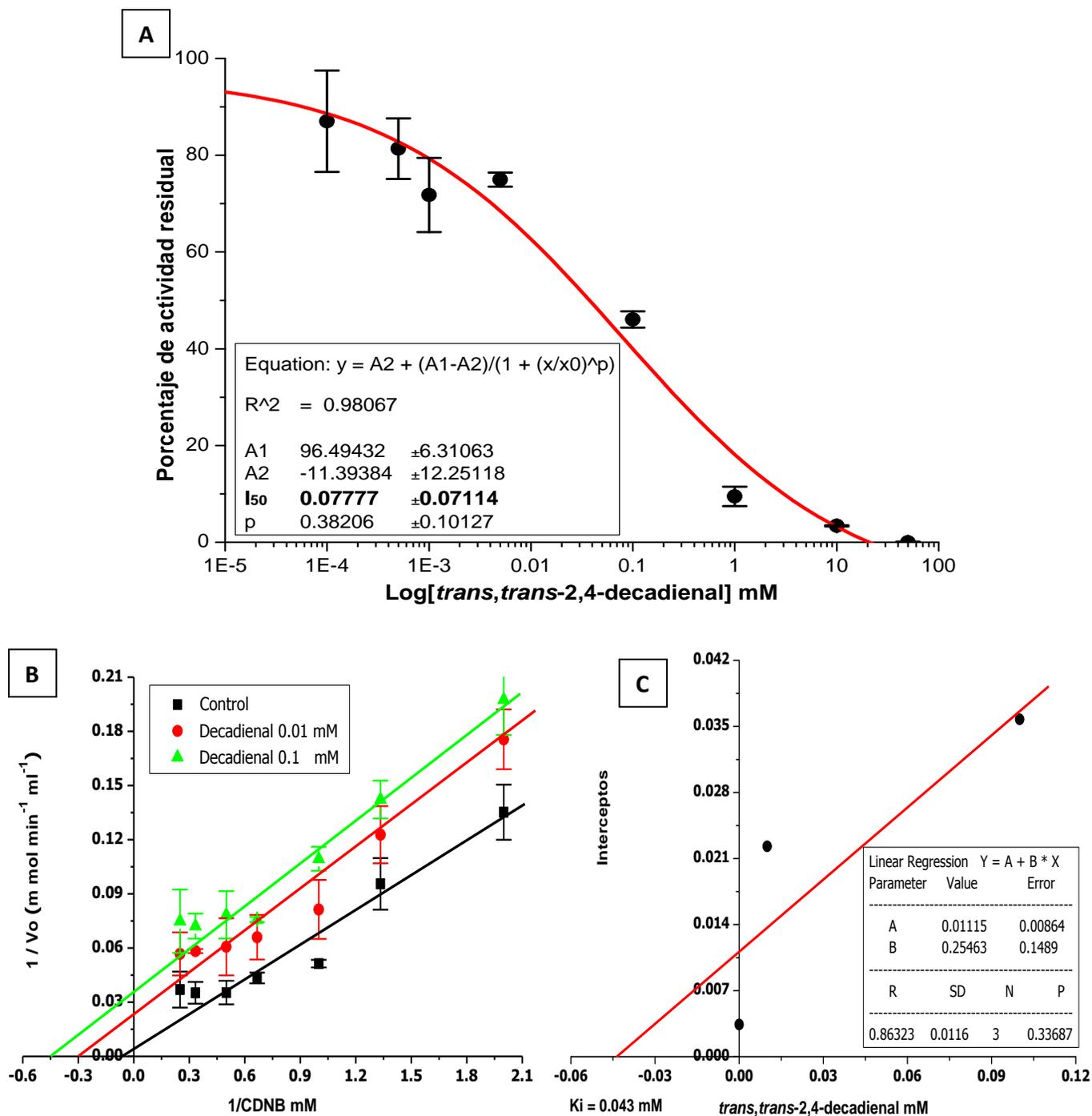


Figura 48. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del tt-DDE con la Ts26GST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del tt-DDE para calcular el valor de I_{50} . Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de tt-DDE 1.5 mM (●) y 3 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de los interceptos en el eje de las ordenadas de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del tt-DDE. El valor de la $K_i=0.043$ mM lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas.

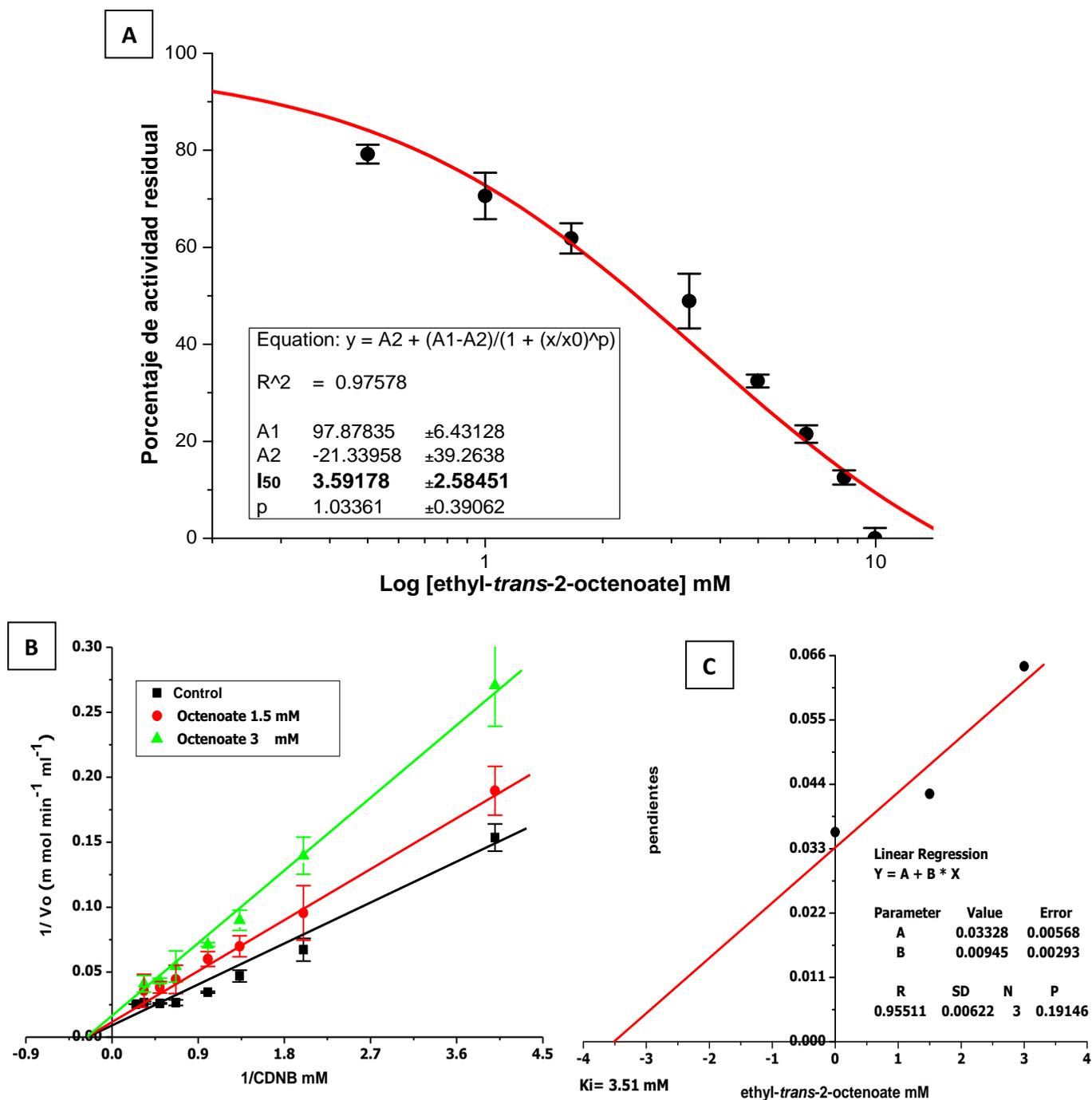


Figura 49. Gráfica del porcentaje de actividad residual (A), tipo de inhibición (B) y K_i (C) del et-ONE con la Ts26GST. La gráfica (A) nos muestra el porcentaje de actividad residual frente a la concentración del et-ONE para calcular el valor de I50. Gráfica (B) presenta el inverso de la V_o frente al inverso de la concentración del CDNB en ausencia (■) y presencia de et-ONE 1.5 mM (●) y 3 mM (▲) respectivamente. Gráfica (C), gráfica secundaria derivada de la gráfica (B), que se utilizó para determinar el valor de la K_i , en ésta última se graficó el valor de la pendiente de cada una de las series de la gráfica (B) frente a la concentración del et-ONE. El valor de la $K_i=3.51 \text{ mM}$ lo indica el punto de intersección de la recta (regresión lineal) en el eje de las abscisas

Con el ácido araquídico y el ácido palmítico no fue posible determinar la I_{50} , el tipo de inhibición, ni la K_i , debido a que, dichos ligandos no se pudieron disolver en las concentraciones a las que se necesitaban en los ensayos para determinar la I_{50} . En las Figuras 50 y 51 se pueden ver las gráficas que indican hasta que valor se pudo determinar el porcentaje de actividad residual del ácido araquídico y el ácido palmítico con las dos GSTs.

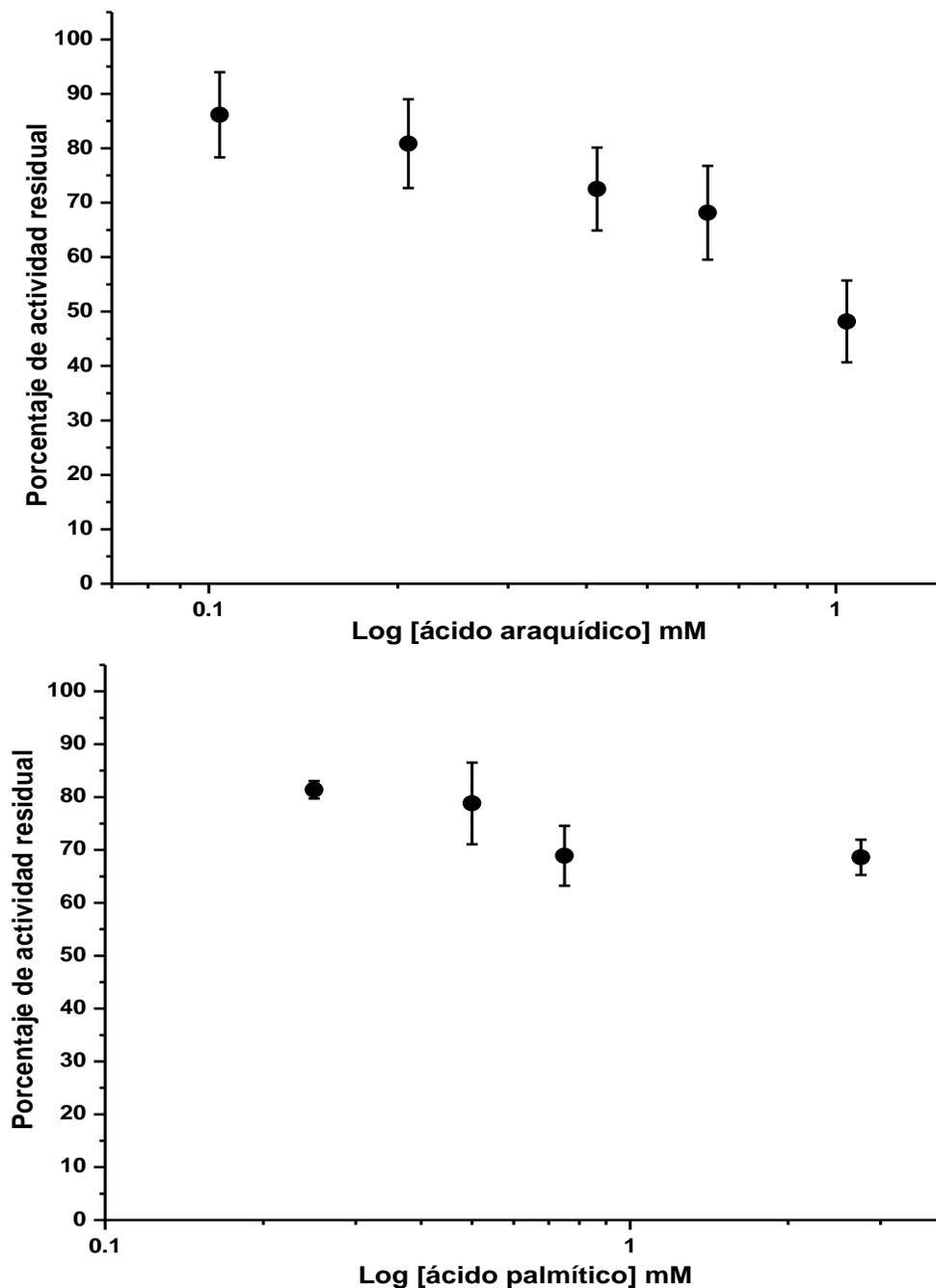


Figura 50. Gráficas del porcentaje de actividad residual de la TcGST frente a la concentración de ácido araquídico (gráfica superior) y de ácido palmítico (gráfica inferior), como se puede observar solo se pudo inhibir el 52% con el ácido araquídico y el 30% con el ácido palmítico, de la actividad de la TcGST debido a problemas de solubilidad de los ligandos.

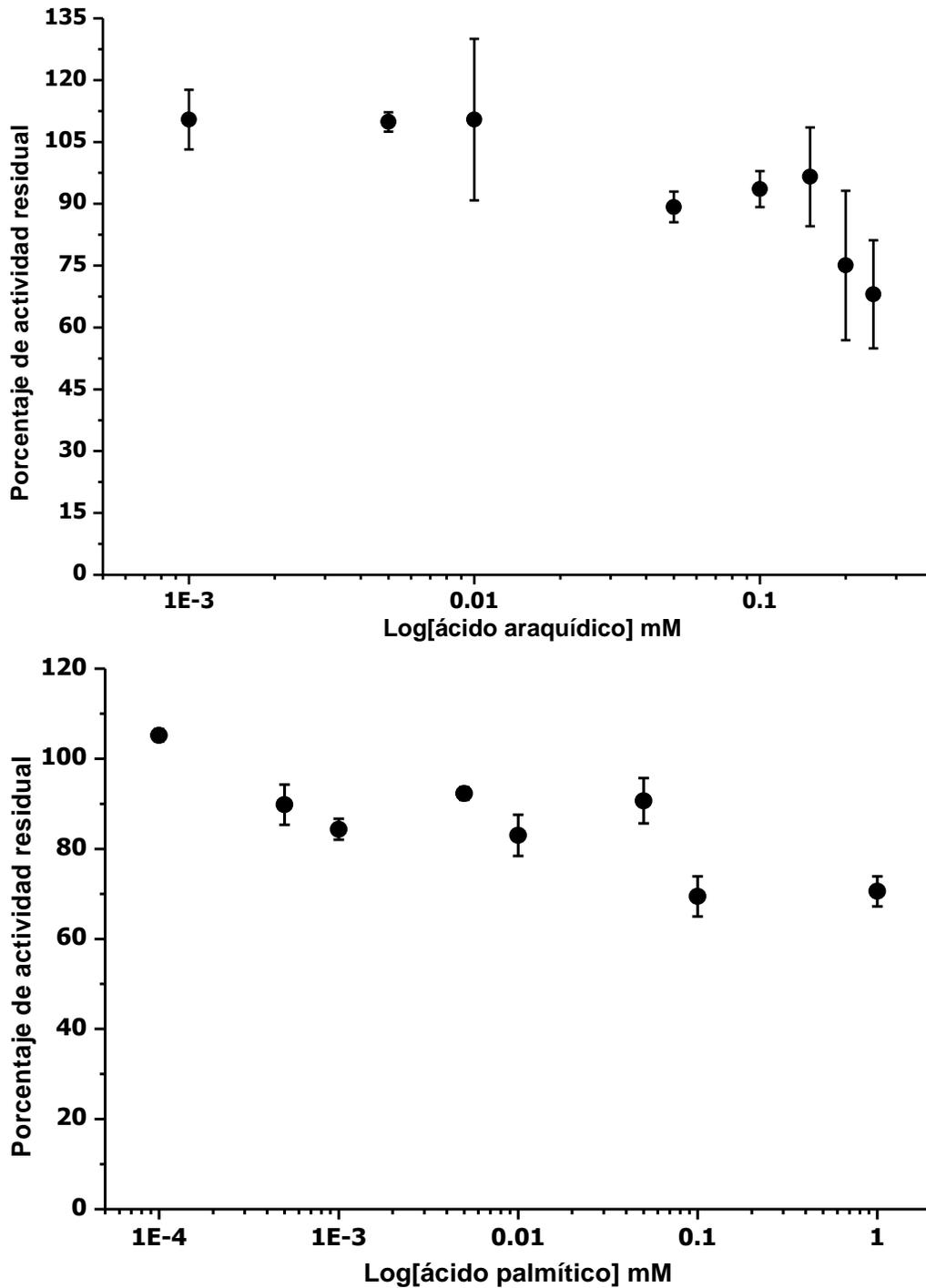


Figura 51. Gráficas del porcentaje de actividad residual frente a la concentración de ligando de la Ts26GST frente a la concentración de ácido araquídico (gráfica superior) y de ácido palmítico (gráfica inferior), de la misma forma que en las gráficas de la Figura 50 se observa que solo se pudo inhibir el 35% con el ácido araquídico y el 28% con el ácido palmítico, de la actividad de la Ts26GST debido a problemas de solubilidad de los ligandos.

Usando las gráficas de las Figuras 41 a la 49 se logró determinar la I₅₀ de cada uno de los ligandos, a partir de este dato se pudo determinar por gráficas de doble inversa el tipo de inhibición y con una regresión lineal la K_i de los ligandos. En la Tabla 7 se reunieron los valores de I₅₀, así como los de la K_i y el tipo de inhibición obtenidos en las gráficas mencionadas, los dos últimos valores se obtuvieron en ambos casos por métodos de análisis lineal.

Tabla 7. Datos de inhibición de los diferentes ligandos con la TcGST y la Ts26GST

| | TcGST | | | Ts26GST | | |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | Tipo de inhibición | I ₅₀ mM | K _i * mM | Tipo de inhibición | I ₅₀ mM | K _i * mM |
| <i>trans,trans</i> -2,4-hexadienal | NC | 2.43 | 2.23 | NC | 2.51 | 1.82 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal | NC | 0.21 | 0.31 | NC | 0.75 | 0.37 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal | NC | 0.13 | 0.16 | AC | 0.077 | 0.043 |
| ethyl- <i>trans</i> -2-octenoate | AC | 4.93 | 2.69 | NC | 3.59 | 3.51 |
| ácido araquídico | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| ácido palmítico | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

*: Ajuste lineal, NC: No competitiva, AC: Acompetitiva, ND: No determinada.

Con la finalidad de corroborar los valores obtenidos de las variables inhibitorias calculadas a partir de métodos lineales (gráficas de Lineweaver-Burk y regresión lineal), los mismos datos se analizaron también por métodos no lineales (ecuaciones para cada tipo de inhibición del modelo de Michaelis-Menten). Con este fin se elaboraron gráficas de V_o frente a [CDNB] ajustando de forma global todos los datos a las ecuaciones de inhibición del modelo de Michaelis-Menten para calcular la K_i de el tt-HDE, tt-NDE, tt-DDE y del et-ONE para cada una de las GSTs, en las figuras 52 a la 58 se pueden ver las gráficas con las que se llevó a cabo este tipo de análisis.

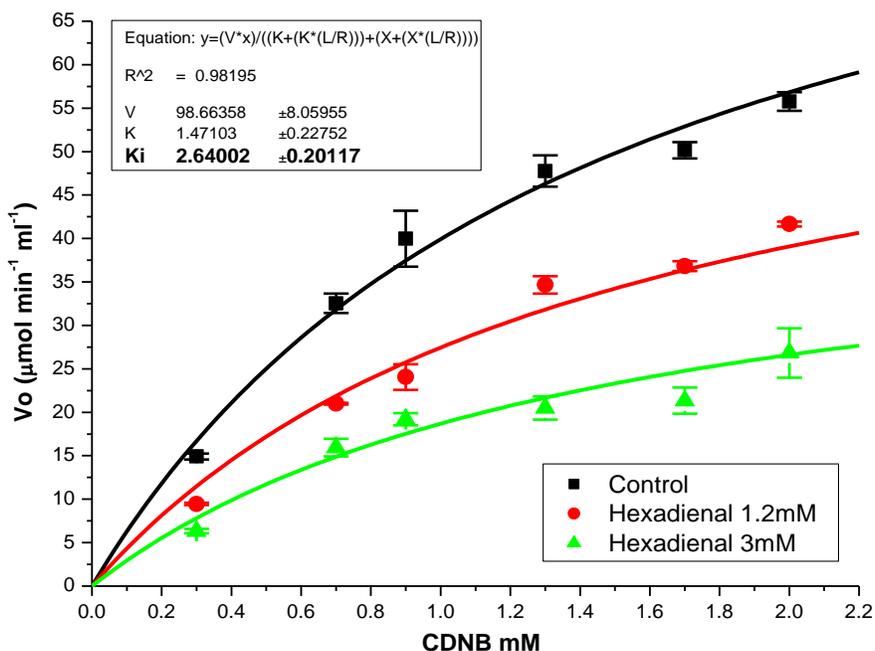


Figura 52. Gráfica de la V_o frente a la [CDNB] para determinar la K_i del tt-HDE sobre la actividad de la TcGST en ausencia (■) y presencia del tt-HDE 1.2 mM (●) y 3 mM (▲). En esta gráfica todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición no competitiva del modelo de Michaelis-Menten.

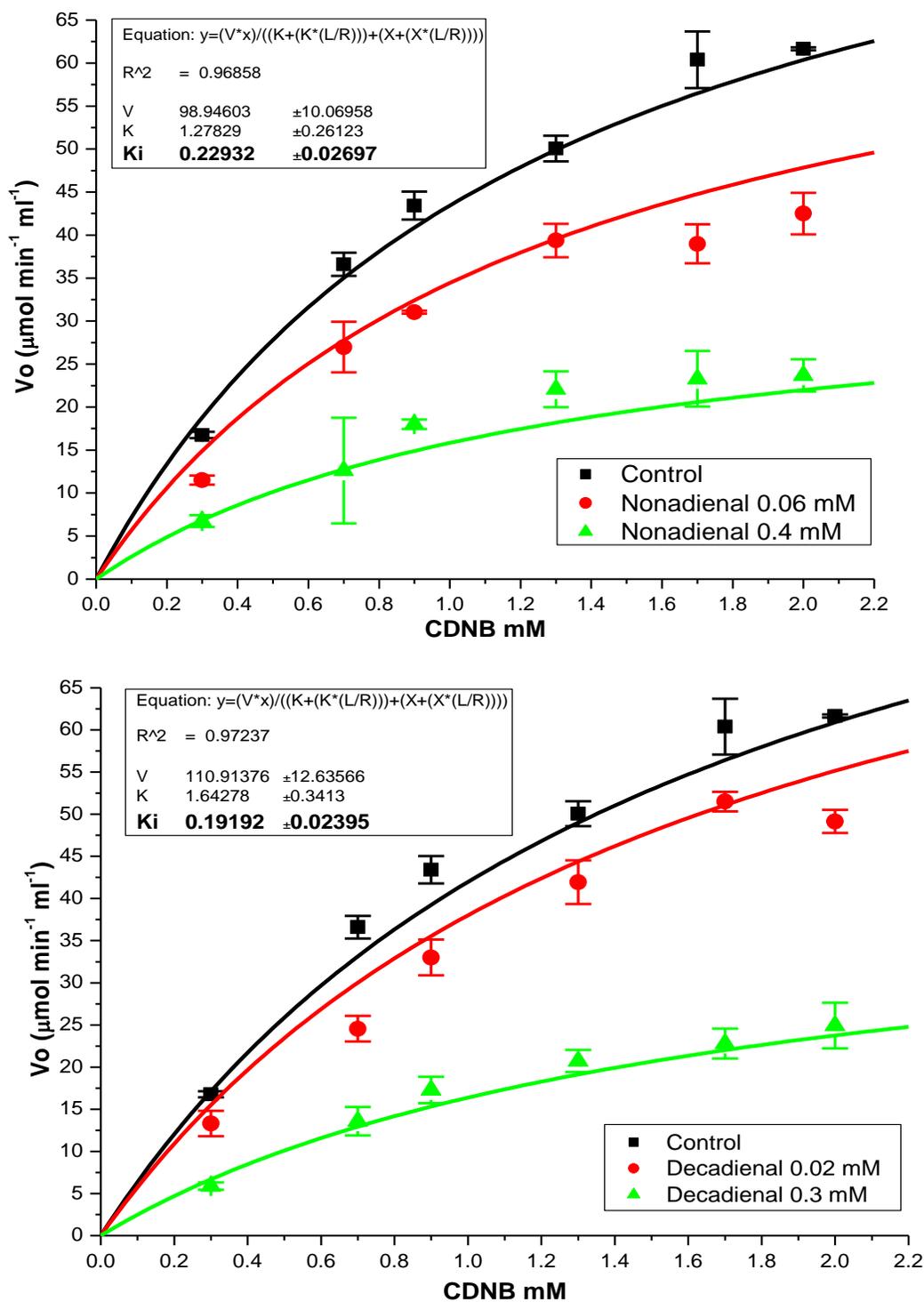


Figura 53. Gráficas de la V_o frente a la [CDNB] para determinar la K_i del tt-NDE (Gráfica superior) y del tt-DDE sobre la actividad de la TcGST. En la Gráfica superior las concentraciones del tt-NDE son: ausencia (■), 0.06 mM (●) y 0.4 mM (▲). En la Gráfica inferior las concentraciones del tt-DDE son: ausencia (■), 0.02 mM (●) y 0.3 mM (▲). En ambas gráficas todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición no competitiva del modelo de Michaelis–Menten.

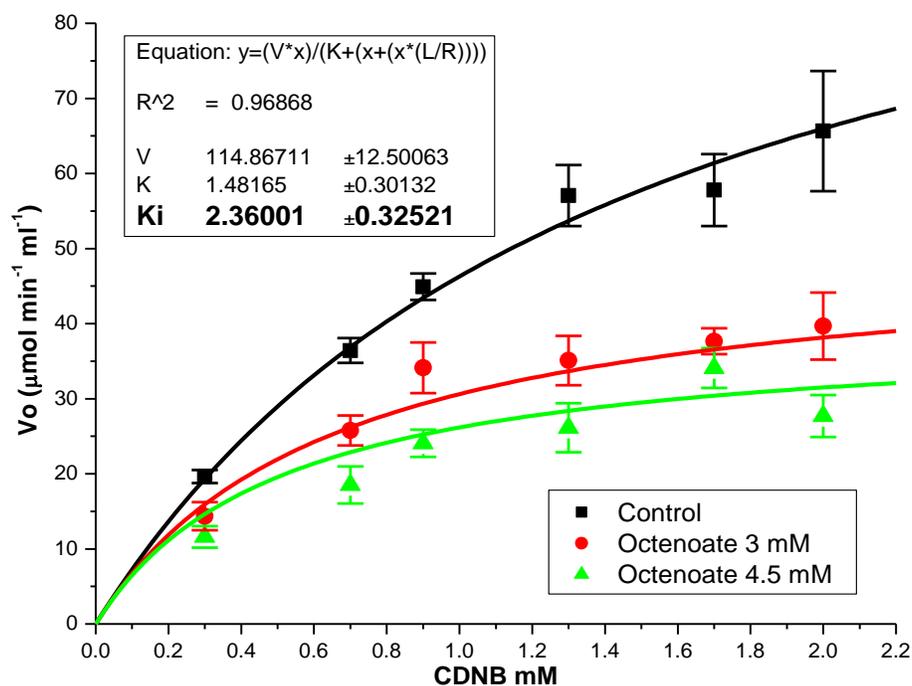


Figura 54. Gráfica de la V_o frente a la [CDNB] para determinar la K_i del et-ONE sobre la actividad de la TcGST en ausencia (■) y presencia del et-ONE 3 mM (●) y 4.5 mM (▲). En esta gráfica todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición acompetitiva del modelo de Michaelis–Menten.

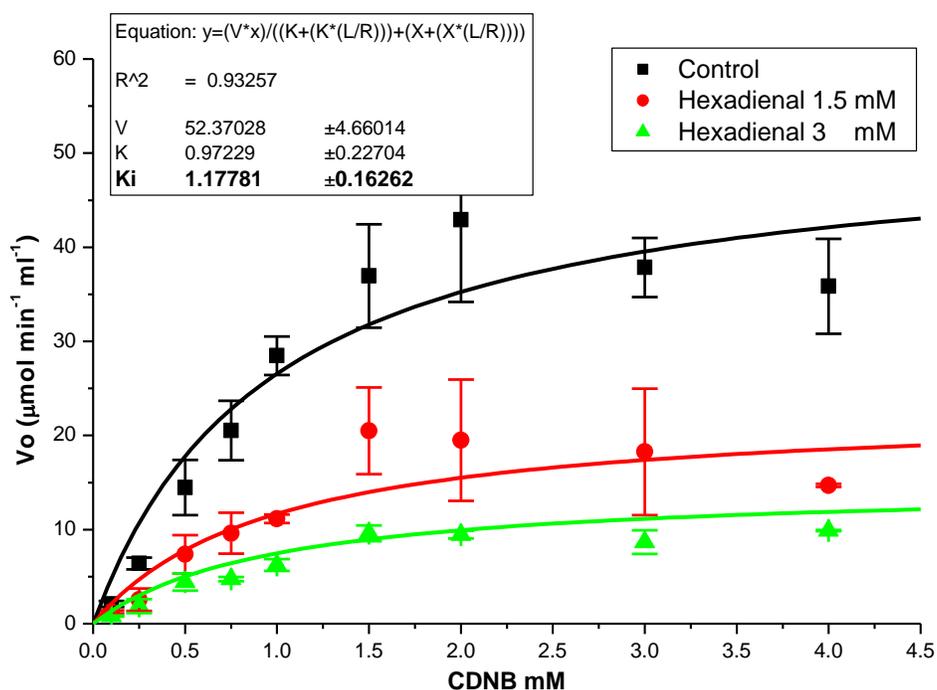


Figura 55. Gráfica de la V_o frente a la [CDNB] para determinar la K_i del tt-HDE sobre la actividad de la Ts26GST en ausencia (■) y presencia del tt-HDE 1.5 mM (●) y 3 mM (▲). En esta gráfica todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición no competitiva del modelo de Michaelis–Menten.

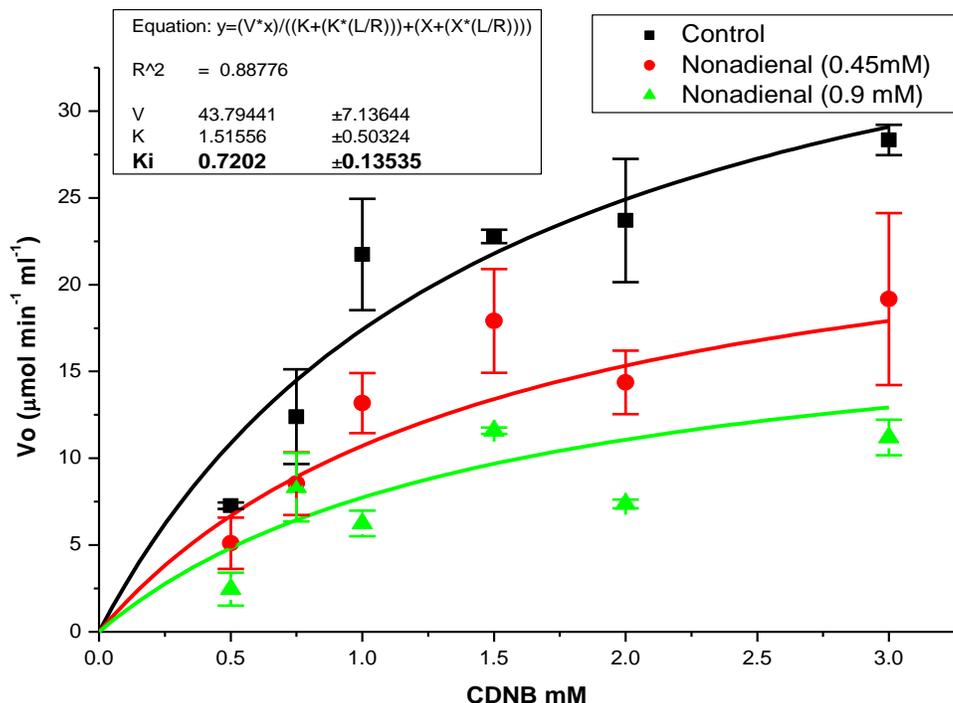


Figura 56. Gráfica de la V_o frente a la [CDNB] para determinar la K_i del tt-NDE sobre la actividad de la Ts26GST en ausencia (■) y presencia del tt-NDE 0.45 mM (●) y 0.9 mM (▲). En esta gráfica todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición no competitiva del modelo de Michaelis–Menten.

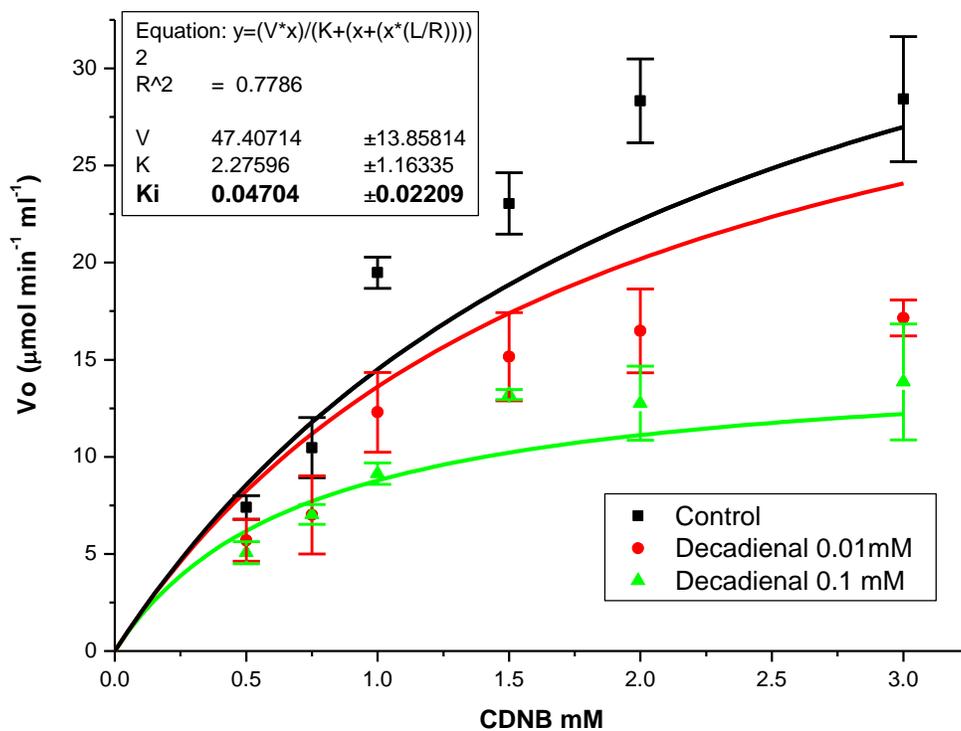


Figura 57. Gráfica de la V_o frente a la [CDNB] para determinar la K_i del tt-DDE sobre la actividad de la Ts26GST en ausencia (■) y presencia del tt-DDE 0.01 mM (●) y 1 mM (▲). En esta gráfica todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición acompetitiva del modelo de Michaelis–Menten.

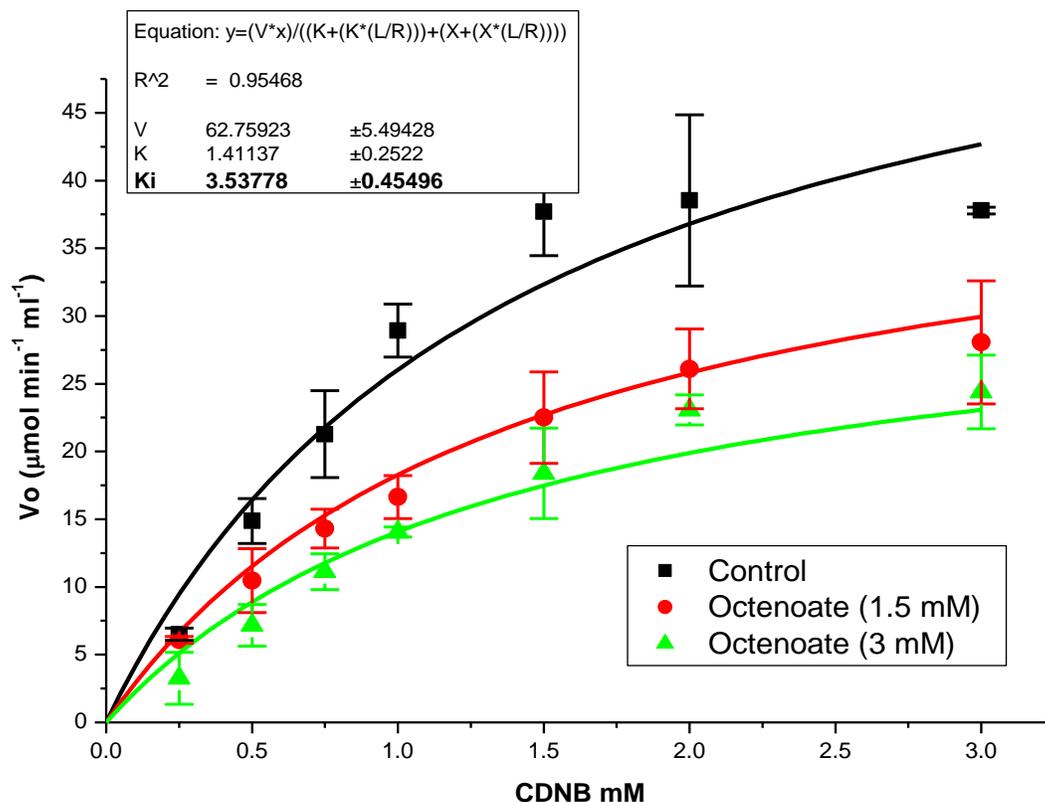


Figura 58. Gráfica de la Vo frente a la [CDNB] para determinar la Ki del et-ONE sobre la actividad de la Ts26GST en ausencia (■) y presencia del et-ONE 1.5 mM (●) y 3 mM (▲). En esta gráfica todos los datos se ajustaron a la ecuación de la inhibición no competitiva del modelo de Michaelis–Menten.

Como se mencionó, en las gráficas de las Figuras 52 a la 58 los puntos se ajustaron a las Ecuaciones 8 y 9 que son respectivamente las de inhibición no competitiva y acompetitiva del modelo de Michaelis-Menten, además, los análisis realizados en estas gráficas que son del tipo no lineal se hicieron para comparar los resultados obtenidos por métodos lineales Figuras 41 a la 49 y Tabla 7.

En la Tabla 8, se muestran los resultados comparativos de los métodos que se utilizaron para determinar la Ki y se observa que no hay una gran diferencia entre ambos métodos. Sin embargo, se prefirió utilizar los datos del método no lineal debido a que el análisis por Lineweaver-Burk es propenso al error a altas concentraciones de sustrato y a exagerar la importancia de los puntos en bajas concentraciones (Fersht A, 1980).

Tabla 8. Comparación de valores de Ki obtenidos por métodos lineales y no lineales

| | TcGST | | Ts26GST | |
|------------------------------------|-------|-------|---------|-------|
| | Ki * | Ki ** | Ki * | Ki ** |
| | mM | mM | mM | mM |
| <i>trans,trans</i> -2,4-hexadienal | 2.23 | 2.64 | 1.82 | 1.17 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-nonadienal | 0.31 | 0.22 | 0.37 | 0.72 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-decadienal | 0.16 | 0.19 | 0.043 | 0.047 |
| <i>ethyl-trans</i> -2-octenoate | 2.69 | 2.36 | 3.51 | 3.53 |

*: Ajuste lineal, **: Ajuste no lineal, NC: No competitiva, AC: Acompetitiva.

En la Tabla 9, se indican los valores de I_{50} , tipo de inhibición y K_i , para cada uno de los ligandos, con las TcGST y la Ts26GST. En esta tabla, a diferencia de la Tabla 7, los valores de K_i son los que se obtuvieron por métodos no lineales, es decir, de las gráficas de las Figuras 52 a la 58.

Tabla 9. Datos de inhibición de los diferentes ligandos con la TcGST y la Ts26GST

| | TcGST | | | Ts26GST | | |
|--|--------------------|-------------|------------|--------------------|-------------|------------|
| | Tipo de inhibición | I_{50} mM | K_i * mM | Tipo de inhibición | I_{50} mM | K_i * mM |
| <i>trans,trans-2,4-hexadienal</i> | NC | 2.43 | 2.64 | NC | 2.51 | 1.17 |
| <i>trans,trans-2,4-nonadienal</i> | NC | 0.21 | 0.22 | NC | 0.75 | 0.72 |
| <i>trans,trans-2,4-decadienal</i> | NC | 0.13 | 0.19 | AC | 0.077 | 0.047 |
| <i>ethyl-trans-2-octenoate</i> | AC | 4.93 | 2.36 | NC | 3.59 | 3.53 |
| Ac. Araquídico | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Ac. Palmítico | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

*: Ajuste no lineal, NC: No competitiva, AC: Acompetitiva, ND: No determinada.

Como puede verse en la Tabla 9 los valores de I_{50} y K_i de cada uno de los ligandos son similares entre las dos enzimas. En cuanto al tipo de inhibición, en la mayoría de los casos fue del tipo no competitivo, aunque se presentaron dos casos con inhibición acompetitiva el et-ONE con la TcGST y el tt-DDE con la Ts26GST.

Los inhibidores no competitivos, se unen a la enzima en un sitio diferente al sitio activo pero al hacerlo bloquean la interacción del sustrato con el sitio activo. El mecanismo de inhibición no competitivo implica que la velocidad de la reacción debe disminuir, pero el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) no (Peña A, 2004), lo anterior se puede visualizar en las gráficas de doble inversa por la intersección de las rectas en el eje de las ordenadas para la velocidad de reacción y en el eje de las abscisas para la K_m . De esta forma se identificó este tipo de inhibición en las gráficas de doble inversa de las Figuras 42, 43, 44, 46, 47 y 49.

En la inhibición acompetitiva, el inhibidor se une al complejo enzima sustrato, pero no a la enzima libre. El inhibidor acompetitivo, no siempre se asemeja al sustrato y al parecer distorsiona el sitio activo. Las gráficas de doble inversa de la inhibición acompetitiva, presentan una serie de líneas paralelas (Voet D, 2006), indicativas de que se modifica la velocidad de reacción y la K_m . Este tipo de inhibición se identificó en las gráficas de doble inversa de las Figuras 45 y 48.

4.6. Competencia entre hematina y 8-anilino-1-naftalen sulfonato

Como se mencionó en la sección 3.9, para caracterizar el sitio de unión de las enzimas para la hematina se llevaron a cabo ensayos de competencia entre el ANS y dicho ligando, comprobando primero la existencia de un punto isoemisivo, indicativo de que el rendimiento cuántico fluorescente del ANS unido a la GST es igual en el rango de valores utilizados (concentraciones de GST y ANS). El ANS es un fluoróforo que al unirse a sitios hidrofóbicos y ser excitado a cierta longitud de onda (≈ 400 nm) emite fluorescencia con un pico máximo entre los 480 y los 500 nm. En la Figura 59 se muestran las gráficas con la que se determinó el punto isoemisivo, mientras que en la Figura 60 se puede ver la gráfica con los ensayos de competencia del ANS con la Hematina. En la Figura 61 se observa la gráfica con la que se determinó la K_D de la Hematina al competir con el ANS.

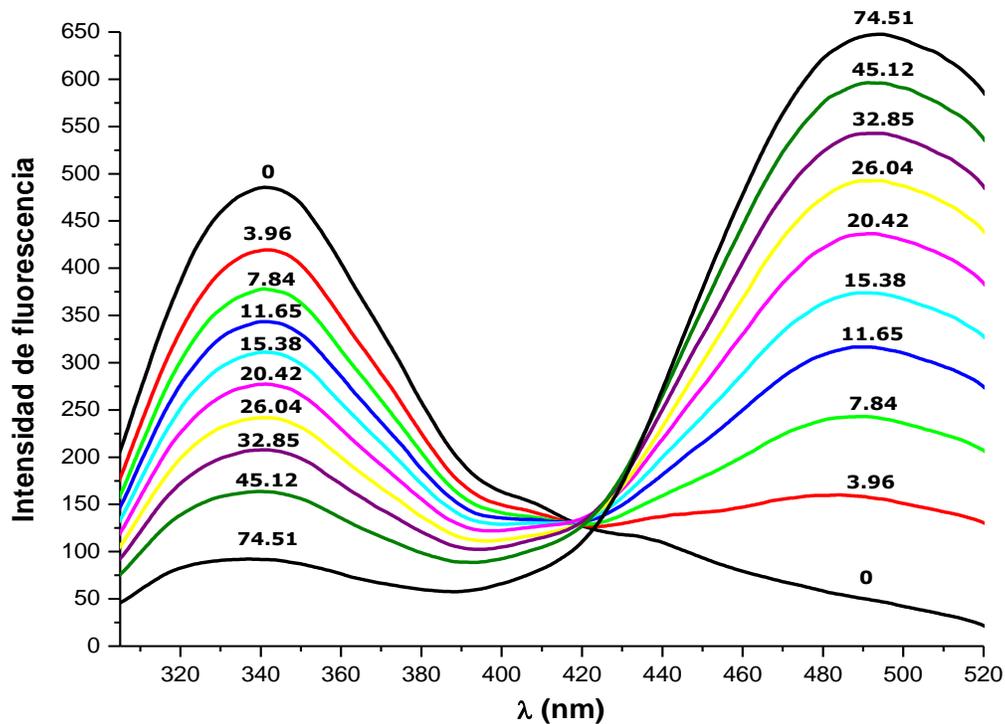


Figura 59. Gráfica de intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda (λ) con la que se determinó el punto isoemisivo (419 nm) de la Ts26GST con el ANS. Los números en la gráfica indican la concentración del ANS μM en cada uno de las mediciones (líneas), el ANS fue agregado a una solución que contenía $4.14 \mu\text{M}$ de Ts26GST.

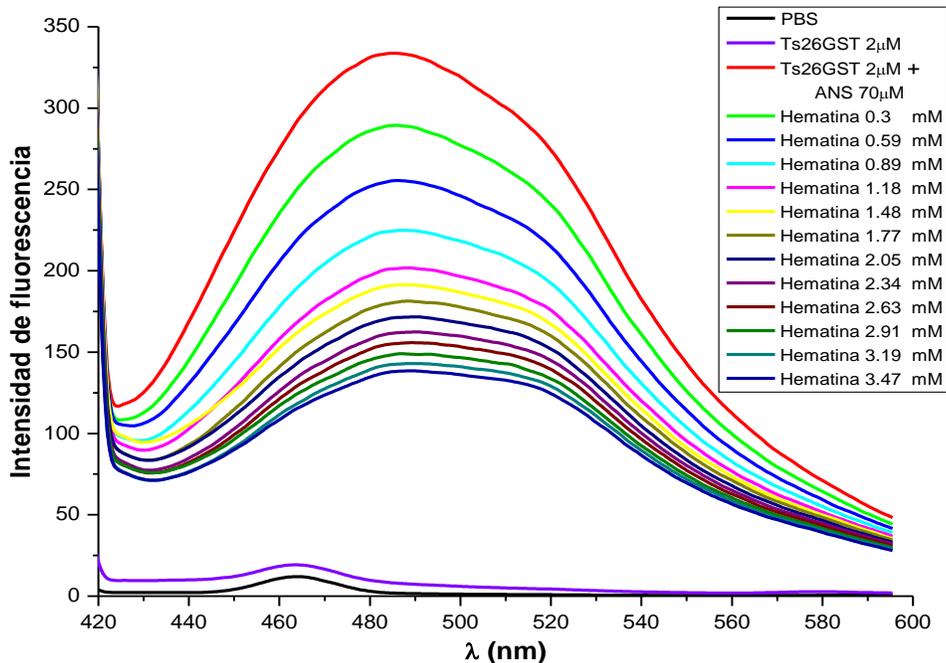


Figura 60. Ts26GST, gráfica de intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda (nm), donde se observa el apagamiento de la fluorescencia del ANS al ser desplazado de los sitios hidrofóbicos por la hematina. En el recuadro de la derecha se indican las concentraciones de ligandos y enzima, de esta gráfica se tomó el valor de mayor intensidad de la fluorescencia $\approx 480 \text{ nm}$ de cada una de las curvas para calcular la K_D con la gráfica de la Figura 61.

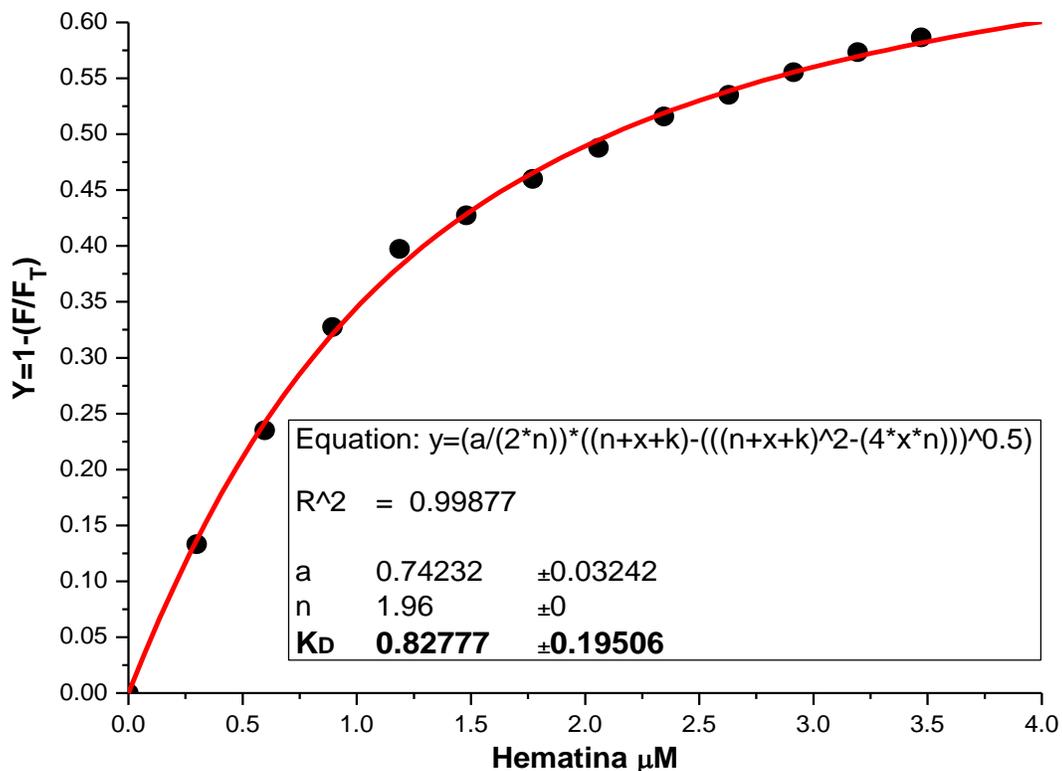


Figura 61. Ts26GST, Y frente a la concentración de la hematina utilizada para determinar el valor de la K_D de la hematina al competir con el ANS por los sitios hidrofóbicos de la enzima. Los datos de Y que se obtuvieron a partir de los valores de intensidad de fluorescencia de la gráfica de la Figura 60, se analizaron con la Ecuación 1 para determinar la K_D .

Para poder utilizar el ANS y llevar a cabo los ensayos de competencia, primero fue necesario determinar las concentraciones tanto del ANS, como de la enzima, a las cuales los valores de fluorescencia son confiables. Lo anterior se determinó con la gráfica de la Figura 59 donde se aprecia un punto isoemisivo a los 419 nm con concentraciones de 4.14 μM para la Ts26GST y de 0 a 74.51 μM de ANS.

Con los datos aportados por la gráfica de la Figura 59 se llevaron a cabo los ensayos de competencia con las siguientes condiciones Ts26GST 2 μM , ANS 70 μM y adicionando de forma creciente la hematina (0-3.47 mM). Posteriormente, se determinó la K_D de la hematina en los ensayos de competencia utilizando los valores de apagamiento de la fluorescencia del ANS de la forma en que se describe en la sección 3.6.1.

El valor de K_D en este caso fue de 0.82 μM que es similar al obtenido por Hernández M, 2012, que fue de 0.7 μM y se obtuvo al analizar los datos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la Ts26GST.

5. Discusión

Las enzimas GSTs citosólicas son una familia de proteínas homodímeras y heterodímeras, que catalizan la adición nucleofílica del grupo tiol (SH) del glutatión (γ -glutamil-cisteina-glicina) a centros electrófilos en una gran variedad de sustratos electrófilos e hidrofóbicos, incluyendo aluros de alquilo y arilo, epóxidos, quinonas y alquenos activados. Todas las GSTs comparten un plegamiento proteico común, cada una de sus dos subunidades tiene dos dominios estructurales. El dominio 1, cercano al amino terminal, presenta una topología de plegamiento $\beta\alpha\beta\beta\alpha$, esta es una estructura conservada que forma parte del sitio activo de estas enzimas. El dominio 2, cercano al carboxilo terminal, tiene sólo el tipo de plegamiento α . Así, las GSTs presentan dos sitios activos diméricos, estructuralmente independientes y en cada uno de ellos se encuentra en el dominio 1, el sitio G donde se une el GSH y en el dominio 2, el sitio H donde se unen los sustratos electrofílicos-hidrofóbicos. El diseño de esta estructura permite realizar la función catalítica en las GSTs.

Aunado a la función catalítica de las GSTs, estas enzimas también son consideradas transportadores intracelulares de varios compuestos hidrofóbicos no sustratos tales como esteroides, bilirrubina, sales biliares, etc. Esta función de unir diversos ligandos en las GSTs se denomina función de ligandina.

No obstante, que a nivel estructural se sabe que las GSTs poseen un solo sitio (sitio L) por dímero de alta afinidad para la unión de ligandos aniónicos hidrofóbicos y que está presente en la hendidura formada por las dos subunidades (Sluis-Cremer *et al.*, 1996), la función de ligandina ha sido poco estudiada en los organismos incluyendo los helmintos.

La observación de Sluis-Cremer y col. resulta alentadora para realizar estudios con las GSTs de los cestodos en búsqueda de la función de ligandina en estas enzimas. Adicionalmente, estos estudios se justifican debido a que esta función parece ser de gran importancia en diversos procesos fisiológicos como son el almacenamiento intracelular de una gran variedad de compuestos no-sustratos incluyendo hormonas, metabolitos y fármacos. Así, la unión de estos ligandos a las GSTs prevendría la unión de estas moléculas apolares a sitios lipofílicos como las membranas celulares y se podrían enviar a la vía del ácido mercaptúrico o a sus sitios blanco (Arias *et al.*, 1980; Bates *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2004; Paumi *et al.*, 2004; Boyer y Olsen, 1991).

En nuestro laboratorio inicialmente se demostró la función de ligandina en *T. crassiceps* y posteriormente en *Taenia solium*, empleando diversos ligandos (Hernández *et al.*, 2009, Hernández M, 2012). Siguiendo con esta línea investigación y para incrementar nuestro conocimiento de los cestodos al respecto, en este trabajo evaluamos si ciertos derivados de la PL funcionan como ligandos para las GSTs de *T. solium* y *T. crassiceps*. Con este fin, se utilizaron diversas técnicas como: espectroscopía de fluorescencia, inhibición cinética, además se utilizó al ANS como un marcador de sitios hidrofóbicos en ensayos de competencia. Los ligandos que se usaron en este trabajo presentan la característica de que pueden ser tóxicos o no, dependiendo de su concentración en los organismos. Adicionalmente, se pudo comprobar en este trabajo que ninguno de los ligandos utilizados a excepción del HNE-D son sustratos catalíticos de las GSTs; éste último fue el único ligando utilizado que demostró ser tanto un ligando como un sustrato para la Ts26GST; sin embargo, fueron pocos los ensayos que se pudieron hacer con este ligando y sólo se obtuvo su KD.

Los ensayos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca (quenching) de las GSTs mostraron que todos los ligandos que se utilizaron en esta investigación fueron capaces de apagar en diferentes proporciones la fluorescencia intrínseca de ambas GSTs, lo que implica que estos ligandos se unen no catalíticamente a las GSTs. El porcentaje de apagamiento de la fluorescencia intrínseca y la KD de los ligandos son similares en las dos GSTs. Un resultado interesante fue que todos los dinaldehídos lograron, a diferencia de los otros ligandos, apagar prácticamente el 100% de la fluorescencia intrínseca sin que en este proceso se haya apreciado el corrimiento del pico máximo de longitud de onda hacia la izquierda o a la derecha del espectro de fluorescencia, lo que nos podría haber indicado, que la enzima se volvía más hidrofóbica o hidrofílica respectivamente.

Con los ensayos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las proteínas se determinaron los valores de KD para cada uno de los ligandos, resultando en que la KD de los dinaldehídos fue similar entre las GSTs. Por otro lado, los ensayos de inhibición cinética usando al CDNB como sustrato, nos confirmaron que los ligandos que utilizamos se unen a la enzima y que es inhibida por los ligandos. Hay que tomar en cuenta que los ácidos grasos no pudieron ser evaluados con este tipo de ensayos debido a que las concentraciones que se requerían de estos compuestos no se pudieron diluir en los ensayos de inhibición.

Con respecto al tipo de inhibición, sólo el tt-DDE para la Ts26GST y el et-ONE para la TcGST presentaron un tipo de inhibición incompetitiva, mientras que el resto de los ligandos presentó un tipo de inhibición no competitivo. Los valores de I50 y de KI de los dinaldehídos y del octenoate fueron similares aunque en menor grado que la KD entre las dos enzimas, estos resultados se asemejan a los reportados de I50 y KI por Asköfold *et al.*, 1975 con un enzima parasitaria utilizando al S-alkylglutathione, un alquilo de cadena larga.

Los resultados anteriores confirmaron que las GSTs de *T. solium* y *T. crassiceps* se unen no catalíticamente a los derivados de la PL y, por lo tanto, que la función de ligandina se presenta en las GSTs de ambos parásitos.

La función de ligandina puede estar involucrada en el transporte de diferentes sustancias, algo que está apoyado por el descubrimiento de que las GSTs pueden funcionar como un medio de transporte proteico o de proteínas que introduce a la célula moléculas exógenas como péptidos y proteínas (Namiki *et al.*, 2003) y esto es llevado a cabo por el motivo estructural de las GSTs denominado "GST-Fold" (Morris *et al.*, 2009). Por lo tanto si las GSTs tienen la capacidad de unir sustancias y transportarlas, es muy probable que dichas enzimas estén involucradas en procesos de desintoxicación de las células, lo que incluiría el transporte de sustancias tóxicas como los PPL lipídica los cuales, como se demuestra en este trabajo, son unidos no catalíticamente a estas enzimas.

A diferencia de otras GSTs de helmintos (Brophy and Barret, 1990), en el que se ha demostrado que las GSTs presentan actividad catalítica con algunos dinaldehídos, las GSTs de *T. solium* y *T. crassiceps* no presentaron actividad catalítica frente a los diferentes dinaldehídos PPL que se usaron en este trabajo. Sin embargo, fueron estos ligandos los únicos capaces de apagar la fluorescencia intrínseca de las GSTs en un 100% en ambas GSTs. Con respecto a lo anterior, sólo con el HNE-D se encontró que puede funcionar como sustrato y como ligando, lo que concuerda con Alin *et al.*, 1985 donde se demuestra que los 4-Hydroxynonenal-2-enales son sustratos para las GSTs.

Con respecto al número de sitios de unión de los diferentes ligandos que se utilizaron en este trabajo, ambas GSTs presentaron como máximo dos sitios de unión para el tt-HDE, tt-NDE y tt-

DDE con la TcGST y para el ácido araquídico, ácido palmítico, tt-NDE, tt-DDE y et-ONE con la Ts26GST; mientras que sólo presentaron un sitio de unión el ácido araquídico, ácido palmítico y et-ONE con la TcGST y el tt-HDE y HNE-D con la Ts26GST. Lo anterior se determinó con la metodología empleada por Caccuri *et al.*, 1990, un método que sólo utiliza las mediciones de apagamiento de la fluorescencia intrínseca de las enzimas que se usaron para determinar la KD. Por lo tanto, para confirmar de que los resultados obtenidos siguiendo el método de Caccuri y col. son correctos, sería cotejándolos con procedimientos de Calorimetría de titulación isotérmica. De ser similares ambos procedimientos nos demostraría que se puede determinar el número de sitios de unión de los ligandos con una metodología sencilla y que emplea menor cantidad de muestra.

La NC está asociada con la inducción de la PL por las células inflamatorias, los pacientes con cisticercos vesiculares y coloidales así como respuestas inflamatorias severas son particularmente propensos a mostrar grandes cantidades de PLs en el líquido cefalorraquídeo (Rodríguez *et al.*, 2008); sin embargo, hasta ahora no se ha llevado a cabo una caracterización de los PLs encontrados en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con NC.

Uno de los efectos de la PL es la descomposición de los lípidos de las membranas, lo que provoca cambios en éstas que frecuentemente se han considerado como básicos en el daño celular (Recknagel and Ghoshal, 1966). Los dienaldehídos son PPL y particularmente exhiben una alta toxicidad (Carvalho *et al.*, 2001; Loureiro *et al.*, 2000). Aunque no se han caracterizado los PLs presentes en el líquido cefalorraquídeo de los paciente con NC, es muy probable que entre ellos se encuentren los dienaldehídos; por lo tanto, la presencia de la GSTs capaces de atrapar y probablemente transportar este tipo de compuestos daría a los parásitos una herramienta importante para su desintoxicación. Lo anterior puede ser uno de los motivos por los que ciertos pacientes sean asintomáticos pues exhiben una respuesta inmune muy baja tanto en el SNC como en otros tejidos (Dixon and Lipscomb, 1961; Flisser *et al.*, 1993).

Por otro lado, las GSTs de ambos parásitos mostraron diferentes afinidades hacia los distintos tipos de compuestos. Lo anterior podría indicar que estas enzimas pueden ser selectivas y tener una mayor afinidad hacia compuestos que pueden ser tóxicos, convirtiendo a la función de ligandina en una parte importante para el metabolismo de ciertos compuestos (principalmente tóxicos) dentro de las células parasitarias.

6. Conclusiones

La información obtenida en este trabajo nos indica que las GSTs son una parte importante para el metabolismo de desintoxicación de estos parásitos, no sólo por su actividad catalítica que las involucra en la Fase II del metabolismo oxidativo de xenobióticos sino también como proteínas involucradas en la unión no catalítica y posterior transporte de compuestos tóxicos dentro de las células. Estas propiedades, particularmente de la Ts26GST, permiten sugerir a esta enzima como un objetivo importante en el tratamiento contra *T. solium*.

Por otro lado, el mostrar que la TcGST es también una ligandina, vuelve a ésta un modelo experimental importante para futuras investigaciones sobre la función de desintoxicación pasiva en los cestodos.

7. Literatura citada

- Abdussalam M. 1975. El problema de la Teniasis–Cisticercosis. VII Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica No. 295: 117-129.
- Acha P N, Szyfres B. 1986. Teniasis y cisticercosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación científica No. 503. Organización Panamericana de la salud. 763-774.
- Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J P, Larralde C, Madrazo I, Velazquez V, Willms K. 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de cultura económica. México. pp-116.
- Ames B N, Shigenaga M K, Hagen T M. 1993. Oxidants, antioxidants. Acad Sci. USA. 90: 7915-7922.

- Anderson WI, Scott, Hornbuckle WE, King JM, Tennant BC. 1990. *Taenia crassiceps* infection in the woodchuck: A retrospective study of 13 cases. *Veterinary Dermatology* 1: 85–92.
- Antoniuk S. 1999. Epidemiología de la neurocisticercosis. *Rev. Neurol.* 29 (4): 331-334.
- Alin P, Danielson UH, Mannervik B. 1985. 4-Hydroxynonenal-2-enals are substrates for glutathione transferase. *FEBS* 179: 267-270.
- Arias I M, Ohmi N, Bhargava M, Listowsky I. 1980. Ligandin: an adventure in liverland. *Mol Cell Biochem.* 29: 71–80.
- Askelöf P, Guthenberg C, Jakobson I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of two glutathione S-aryltransferase activities from rat liver. *Biochem J.* 147: 513–522.
- Bates D J P, Lively M O, Gorezynski M J, King S B, Townsend A J, Morrow Ch S, 2009. Noncatalytic interactions between glutathione S-transferases and nitroalkene fatty acids modulated nitroalkene-mediated activation of peroxisomal proliferator-activated receptor γ . *Biochemistry.* 48: 4159–4169.
- Beckman K B, Ames B N. 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Am Physiol Soc.* 78: 547-581.
- Benson A M, Talalay P, Keen J H, Jakoby W B. 1977. Relationship between the soluble glutathione-dependent delta 5-3-ketosteroid isomerase and the glutathione S-transferases of the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(1): 158-162.
- Bern C, Garcia H H, Evans C, Gonzalez A E, Verastegui M, Tsang V C, Gilman R H. 1999. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis.* 29: 1203–1209.
- Bartsch H, Nair J. 2005. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potential lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res* 591: 43-44.
- Boyer T D, Olsen E. 1991. Role of glutathione S-transferases in heme transport. *Biochem Pharmacol.* 42: 188–190.
- Boyland E, Chasseaud L F. 1969. The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 32: 173-219.
- Bröjer CM, Peregrine AS, Barrer IK, Carreno RA, Post C. 2002. Cerebral cysticercosis in woodchuck (*Marmota monax*). *Journal of Wildlife Diseases* 38: 621–624.
- Brophy P M, Barret J. 1990. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminthes. *Mol Biochem Parasitol.* 42: 205–212.

- Brophy PM, Pritchard DI. 1992. Immunity to helminths: Ready to tip the biochemical balance? *Parasitol Today*. 8(12):419-22.
- Burdock GA. 2010. *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. CRC Press. pp: 2135.
- Caccuri A, Aceto A, Piemonte F, Di Ilio C, Rosato N, Federici G. 1990. Interaction of hemin with placental glutathione transferase. *Eur. E. Biochem*. 189, 493-497.
- Callanhan H, Crouch R K, James E R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitol Today*. 4: 218-225.
- Cardona AE y Teale JM. 2002. Animal Models of *T. solium* Cysticercosis. In: G Singh, S Prabhakar (eds). *Taenia Solium Cysticercosis: From Basic to Clinical Science*. CABI Publishing. 35-45.
- Carvalho V M, Asahara F, Di Mascio P, Campos I P, Cadet J, Medeir M H. 2001. 1, N6-etheno-20-deoxyadenosine adducts from trans, trans-2-4-decadienal and tras-2-octenal. *Adv Exp Med Biol*. 500: 229–232.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 59: 527-605.
- Chang LW, Lo W, Lin P. 2005. Trans, Trans-2,4-Decadienal, a Product Found in Cooking Oil Fumes, Induces Cell Proliferation and Cytokine Production Due to Reactive Oxygen Species in Human Bronchial Epithelial Cells. *Toxicological Sciences*. 87(2): 337–343.
- Cheng T. 1986. *General Parasitology*. Harcourt Brace Haranovich, Publishers. New York.
- Clavijo A. 2002. *Fundamentos de química analítica. Equilibrio iónico y análisis químico*. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá. Bogotá. pp-1017.
- Comporti M. *Molec*. 1993. Lipid peroxidation biopathological significance. *Molec Aspects Med*. 14: 199-207.
- Craig F. 1970. *Clinical Parasitology*. Philadelphia. Lea & Febiger. 529-535.
- CIYUN Product data. Edi.No.11/1209. *Trans,trans-2,4-Nonadienal* ≥ 90.0% Natural-identical.
- Danielson U H, Mannervik B. 1985. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *Biochem. J*. 231(2): 263-266.
- Díaz S, Candil R, Uribe M, Willms K. 1990. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 84: 563-566.
- Dixon H B F, Lipscomb F M. 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. *Privy council for medical research Spec Rep Serv*. 229: 1–58.

- Dorado C, Rugerio C, Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM 46(6):229-235
- Escobar A. 1983. The pathology of neurocysticercosis in: Palacios E, Rodriguez-Carbajal J, Taveras JM (eds). Cysticercosis of the central nervous system. Thomas Springfield, USA. p 27-54, 1983.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic Biol Med 11:81-128.
- Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA. 2004. Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in Balb/cJ mice. Journal of Parasitology 90: 79–84.
- Fahey R C, Sundquist A R. 1991. Evolution of glutathione metabolism. Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol. 64: 1-53.
- Fersht A. 1980. Estructura y mecanismo de los enzimas. Ed. Reverté. Barcelona. pp-373
- Fleury A, Escobar A, Chavarría A, Carrillo-Meza R, Sciutto E. 2006. Cisticercosis en el ser humano. En: C Larralde, A S de Aluja (coords). Cisticercosis guía para los profesionales de la salud. Fondo de cultura económica. México. 41-86.
- Fleury A, Moreno J, Valdez, de Sayve M, Becerril P, Larralde C, Sciutto E. 2010. Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. PLoS Negl Trop Dis. 4(8):e805.
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1997. Cisticercosis Humana. Editorial El Manual Moderno. México.
- Flisser A, Madrazo I, Plancarte A, Schantz P, Allan J, Craig P, Sarti E. 1993. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniocidal dose of praziquantel. Lancet 342: 748.
- Fournier D, Bride J M, Poire M, Berge J B, Plapp, F W. 1992. Insect glutathione S-transferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. J. Biol. Chem. 267(3): 1840-1845.
- François A, Favennec L, Cambon-Michot C, Gueit I, Biga N, Tron F, Brasseur P, Hemet J. 1998. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome?. Am J Surg Pathol. Apr;22(4):488-92.
- Freeman RS. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology 40: 969–990.

- Freeman RS, Fallis AM, Shea M, Marbely AL, Walters J. 1973. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). Part II. The parasite. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 22: 493–495.
- García-García M L, Torres M, Correa D, Flisser A, Sosa-Lechuga A, Velasco O, Meza-Lucas A, Plancarte A, Avila G, Tapia R, Aguilar L, Mandujano A, Alcántara I, Morales Z, Salcedo A, Manon M L, Valdespino J L. 2000. Prevalence and risk of cysticercosis and taeniasis in an urban population of soldiers and their relatives. Am J Trop Med Hyg. 61: 386-389.
- Ghadge G D, Lee J P, Binodokas V P, Jordan J, Ma L, Miller R J, Roos R P. 1997. Mutant Superoxide Dismutase-1- Linked Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Molecular Mechanisms of Neuronal Death an Protection. J Neurosc. 17: 8756.
- Gil A. 2010. Tratado de nutrición. Tomo II Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Editorial Médica Panamericana. España. pp-786.
- Grove D I. 1990. A history of human helminthology. CAB Intl. Oxon, UX. 355-383.
- Gómez Alanís A. 1994. Dos casos de cisticercosis cutáneo – muscular en el hombre. An Inst Invest Cientif. 1(1): 79-93.
- González EG. 2004. Papel del residuo conservado Cys126 en la catálisis y estabilidad de la Triosafosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctor en Ciencias (Química). UAM. Pp-78.
- Gutierrez Yezid. 2000. Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations. Oxford University Press. Pp-777.
- Habig W H, Pabst M J, Jakoby W. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biol. Chem. 249: 7130-7139.
- Hardy P, Beauchamp M, Sennlaub F, Gobeil Jr. F, Tremblay L, Mwaikambo B, Lachpelle P, Chemtob S. 2005. New insights into the retinal circulation: inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 72: 301-325.
- Halliwell B, Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 57 (5Suppl.) 7155-7245.
- Halliwell B, Gutteridge J M C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. pp-936.
- Harman D. 1986. Free radicals theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In: A R Liss (ed). Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases. pp-3-49.
- Harvey R, Ferrier D R. 2011. Biochemistry. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. pp-520.

- Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R. 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 4: 51–88.
- Hayes J D, Wolf C R. 1990. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* 272: 281-295.
- Hernández M. 2012. Evaluación de la función de ligandina de la Glutación S-transferasa de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis Maestría en Ciencias de la producción y de la salud animal. UNAM. México. pp-81.
- Hernández M, Nava G, Palcarte A. 2009. Purificación, caracterización y demostración de la función acarreadora de la Glutación S-transferasa de *Taenia crassiceps*. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología.* 2: 150-158.
- Ishikawa T. 1992. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem Sci.* 17(11): 463–468.
- Ketterer K, Litwack L, Arias A. 1971. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234: 466-467.
- Kim S H, Bae Y A, Nam J S, Yang Y, Nawa Y, Kong Y. 2013. Fatty acid compositions of *Taenia solium* metacestode and its surrounding tissues. *Parasitol Int.* 62: 75–78.
- Kristal BS, Park BK, Yu BP. 1996. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 271:6033-6038.
- Kuchenmeister F. 1855. Offenes Sendschreiben an die k.k. Gesellschaft der Aertze zu Wien. Experimenteller Nachweis, dass *Cysticercus cellulosae* innerhalb des menschlichen Darmkanales sich in *Taenia solium* umwandelt. *Wiener medizinische Wochen-schrift*, 5:1-4. Translated in: Kean B H, Mot J E, Rusell A J. *Trop Med Parasitol. Classic Invest.* Cornell Univ. Press. Ithaca 1978: 677.
- Laclette J P, Ornelas Y, Merchant M T, Willms K. 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In: A Flisser, K Willms, J P Laclette, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives.* New York: Academic Press. 375-387.
- Lakowicz J R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Springer. pp-954.
- Larralde C, Padilla A, Hemández M, Govezensky T, Scitutto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública Mex.* 31: 197-210.
- Li S, Armstrong C M, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain P O, Han J D, Chesneau A, Hao T, Goldberg D S, Li N, Martinez M, Rual J F, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong S L, Zhang L, Berriz G F, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel H W, Elewa A, Baumgartner B, Rose D J, Yu H, Bosaki S, Squerra R, Fraser A, Mango S E, Saxton W M, Strome

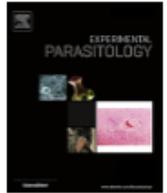
- S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhoute J, Sarder C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus K C, Harper J W, Cusick M E, Roth F P, Hill D E, Vidal M. 2004. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303: 540–543.
- Lighthowers M W. 2002. Vaccines for Control of Cysticercosis and Hydatidosis. editado por Philip Craig, Zbigniew Pawłowski. *Cestode Zoonoses: Echinococcosis and Cysticercosis: An Emergent and Global Problem*. IOS Press. Pp-399.
 - Loos-Frank B. 2000. An up-date of Verster's (1969) "Taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus" (Cestoda) in table format. *Systematic Parasitology* 45: 155–183.
 - López-Cepeda L, Proaño J, Ambrosio J, Ávila-Ramírez G, Flisser A. 2001. Estudio de individuos con teniosis y su asociación con enfermos con neurocisticercosis. *Rev Fac Med UNAM*. 44 (4): 164-167.
 - Loureiro A P, Di Mascio P, Gomez O F, Medeiros M H. 2000. Trans, trans-2-4- decadienal induced 1, N(2)-etheno-20-deoxyguanosine adduct formation. *Chem Res Toxicol*. 13. 601–609.
 - Mafojane N A, Appleton C C, Krecek R C, Michaelis L M, Willingham A L. 2003. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop* 87: 25–33.
 - Mannervik B. 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Advan. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 57: 357-417.
 - Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir M K, Warholm M, Jörnvall H. 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(21): 7202–7206.
 - Mannervik B, Danielson U H. 1988. Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23(2): 283-337.
 - Meliá J. 1991. Fundamentos físicos de la teledetección: leyes y principios básicos. En: S Gandía, J Meliá (coords). *La teledetección en el seguimiento de los fenómenos naturales. Recursos renovables: agricultura*. Universitat de València. España. pp-410.
 - Meyer D J, Coles B, Pemble S E, Gilmore K S, Fraser GM, Ketterer B. 1991. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem J*. 274: 409–414.
 - Morris M J, Craig S J, Sutherland T M, Board Ph G, Casarotto M G. 2009. Transport of glutathione transferase-fold structured proteins into living cells. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1788: 676-685.
 - Namiki S, Tomida T, Tanabe M, Iino M, Hirose K. 2003. Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 305: 592-597.

- National Toxicology Program, P. H. S., National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services (1993). 2,4-Decadienal CAS No. 25152–84–5.
- National Toxicology Program, P. H. S., National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. 2003. Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2,4-hexadienal CAS No. 142-83-6. Testing Status of Agents at NTP.
- Nguyen HA, Bae YA, Lee EG, Kim SH, Diaz-Camacho SP, Nawa Y, Kang I, Kong Y. 2010. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode. Int J Parasitol. 40(9):1097-106.
- Paumi Ch M, Smitherman P K, Townsend A J, Morrow Ch S. 2004. Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). Biochemistry. 43(8): 2345–2352.
- Peña A, Arroyo B, Gómez A, Tapia R. 2004. Bioquímica. Limusa. México. pp-425.
- Plancarte A, Rendón J L, Landa A. 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. Parasitology Research. 93:137-144.
- Prohaska J R. 1980. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. Biochim Biophys Acta. 611(1): 87-98.
- Pearse V, Pearse J, Bochshaum M, Buschsham R. 1987. Living invertebrates. California USA. Blackwell Scientific Publ. The Boxwood Press. 242-246.
- Ramírez–Bon E, Merchant M T, González del Pliego M, Cañedo L. 1982. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. In: A Flisser, K Willms, J P Laclette, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. New York: Academic Press. 261-279.
- Recknagel R O, Ghoshal A K. 1966. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Lab Invest. 15: 132–146.
- Repetto M, Repetto G. 2009. Toxicología fundamental. Díaz de Santos. Madrid. pp-587.
- Reyes M A. 2000. Purificación parcial de Glutathion Peroxidasa (GSH-Px) de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis QFB. FES Zaragoza. UNAM. México. pp-118.
- Rivas A S, Colín-Barenque L, Dorado-Martínez C, Fortoul T. 2001. Estrés oxidativo y neurodegeneración. En: J V Moctezuma (Coordinador). Temas selectos de neurociencias II. UNAM-PUIS.

- Rodriguez U, Rios C, Corona T, Talayero B, Ostrosky P, Herrera L. 2008. Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102: 1025–1031.
- S de Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J P, Larralde C, Madrazo I, Velazquez V, Willms K. 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de cultura económica. México. pp-116.
- Sánchez-Serrano A P, Ambrosio J, Ávila G, Aguilar L, Montiel E, Torres M, Flisser A. 2002. Frecuencia de teniosis y cisticercosis en expendedores de alimentos. *Rev Fac Med UNAM.* 45(2): 60-63
- Sarti E. 1997. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública Mex.* 39(3): 225-231.
- Sarti E, Flisser A, Schantz P M, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P S, Bronfman M, Wijeyaratne P. 1997. Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 127-32.
- Sarti E, Schantz P M, Lara-Aguilera R, Gómez-Dantés H, Flisser A. 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop Med Parasitol.* 39: 194-198.
- Sarti E, Schantz P M, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillán R, Flisser A. 2000. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Transact Royal Soc Trop Med Hyg.* 94: 85-89.
- Schantz P, Moore A, Muñoz J, Hartman B, Shaefer J, Aron A, Persaud D, Sarti E, Gracos A, Flisser A. 1992. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish Community in New York City. *New England J Med.* 327: 692-695.
- Schenone H, Villaroel F, Rojas A, Ramírez R. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: A Flisser, K Willms, J P Laclette, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives.* Academic Press, New York. 25-38.
- Sevanian A, Stein R A, Mead J F. 1981. Metabolism of epoxidized phosphatidylcholine by phospholipase A2 and epoxide hydrolase. *Lipids.* 16(11): 781–789.
- Sheehan D, Meade G, Foley V M, Dowd C A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classifications of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360: 1–16.
- Sies H. 1985. Oxidative stress: Introductory remarks. In: H. Sies (ed) *Oxidative Stress* Academic Press. London.
- Skoog D A, West D. 2002. *Introducción a la química analítica.* Reverté. España.

- Slais J. 1970. The morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms of *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Academia. Praga. pp-144.
- Slater T F. 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 222(1): 1-15.
- Sluis-Cremer N, Naidoo N N, Kaplan W H, Manoharan T H, Fahl W G, Dirr H W. 1996. Determination of a binding site for a non-substrate ligand in mammalian cytosolic glutathione transferase by means of fluorescence-resonance energy transfer. *Eur J Biochem.* 241: 484-488
- Smyth J D. 1969. The Physiology of Cestodes. Oliver and Boyd. Edimburgo. pp-279.
- Sotelo J. 1996. Clínica y diagnóstico de la cisticercosis humana. Organización Panamericana de la Salud. 122-124.
- Strange R, Spiteri M A, Ramachandran S, Fryer A A. 2001. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research* 482: 21–26.
- Stryer L. 1968. Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science.* 162(3853): 526-533.
- Tahir M K, Mannervik B. 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of Glutathione Transferase. *J Biol Chem.* 261: 1048-1051.
- Tay J, Salazar P M, Haro I, Bucio M I. 1976. Frecuencia de las helmintiasis intestinales en México. *Rev Invest Salud Públ* 36: 241-280.
- Teijón J M, Garrido A, Blanco D, Villaverde C, Mendoza C, Ramírez J. 2006. Fundamentos de bioquímica estructural. Tébar. Madrid. pp-444.
- Torres-Rivera A, Landa A. 2008. Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica* 105: 99–112.
- Tyson E. 1683. *Lumbricus latus*, or a discourse read before the Royal Society, of the jointed worm, wherein a great many mistakes of former writers concerning it, are remarked; its natural history from more exact observations is attempted; and the whole urged, as a difficulty against the doctrine of univocal generation. *Philosophy Trans Royal Soc.* 13: 113-144.
- Van Beneden P J. 1854. Note sur de experiences relatives au developement des cysticerques. *Ann Sci Nat.* 1:104.
- van Rossum A J, Jefferies J R, Rijsewijk A M, LaCourse E J, Teesdale-Spittle P, Barret J, Tait A, Brophy P M. 2004. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Infect Immun.* 72: 2780–2790.
- Velasco M, Bravo M A, Quirasco F. 1982. Human cysticercosis: medical-social implications and economic impact. In: A Flisser, K Willms, J P Lacleste, C Larralde, C Ridaura, F Beltrán (eds). *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives.* Academic Press, New York. 47-51.

- Vibanco-Pérez N, Jiménez L, Mendoza-Hernández G, Landa A. 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. Parasitol Res. 88(5):398-404.
- Voet D. 2006. Bioquímica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp-1776.
- Voet D, Voet J G, Pratt C W. 2009. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. pp-1264.
- Wadia N H, Singh G. 2002. *Taenia solium*: A Historical Note. In: G Singh, S Prabhakar (eds). *Taenia Solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. CABI Publishing. 157-168.
- White C A. 1997. Neurocysticercosis. A major cause of neurological disease world wide. Clin Infect Dis. 24: 101-115.
- Wilce M C J, Parker M W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochimica et Biophysica Acta. 1205: 1-18.
- Willms K, Vargas-Parada L, Laclette J P. 2006. Biología del parásito. En C Larralde, A S de Aluja (coords). Cisticercosis guía para los profesionales de la salud. Fondo de cultura económica. México. 19-40.
- Yoshino K. 1933. Studies in post embryonal development of *Taenia solium*. Parte III. J Med Ass Formosa. 32: 166-169.
- Yoshino K. 1934a. On the evacuation of eggs from detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on structure of its eggs. Taiwan Igakkai Zasshi. 33: 47-58.
- Yoshino K. 1934b. On the subjective symptoms caused by the parasitism of *Taenia solium* and its development in man. Taiwan Igakkai Zasshi. 33: 183-194.
- Zbigniew SP. 2002. *Taenia solium*: Basic Biology and Transmission. In: G Singh, S Prabhakar (eds). *Taenia Solium* Cysticercosis: From Basic to Clinical Science. CABI Publishing. 1-13.



Evaluation of the non-catalytic binding function of Ts26GST a glutathione transferase isoform of *Taenia solium*

A. Plancarte^{a,*}, J.R. Romero^a, G. Nava^a, H. Reyes^b, M. Hernández^a

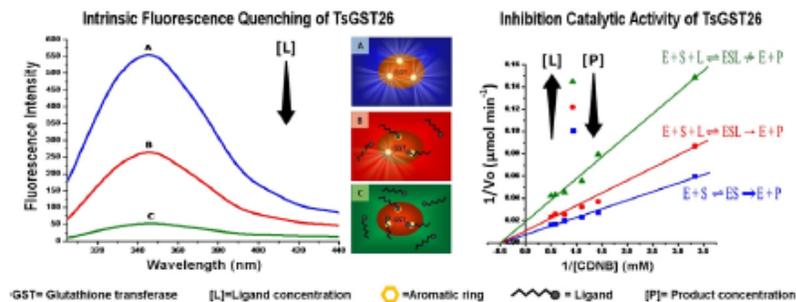
^a Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, México, D.F. 04510, Mexico

^b Laboratorio de Bioquímica-Genética y División de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, D.F., México

HIGHLIGHTS

- Ligandin function was demonstrated for a glutathione transferase of *Taenia solium*.
- A dozen of different ligands could bind TsGST26 with an affinity spectrum.
- Hematin and dienals resulted the tightest ligands for the enzyme.
- A passive detoxification and regulation function from the enzyme is suggested.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2013

Received in revised form 7 February 2014

Accepted 9 February 2014

Available online 19 February 2014

Keywords:

Ligandin
Glutathione S-transferase
Taenia solium
Helminths
Kinetic
Fluorescence

ABSTRACT

Taenia solium glutathione transferase isoform of 26.5 kDa (Ts26GST) was observed to bind non-catalytically to porphyrins, trans-trans-dienals, bile acids and fatty acids, as assessed by inhibition kinetics, fluorescence spectroscopy and competitive fluorescence assays with 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS). The quenching of Ts26GST intrinsic fluorescence allowed for the determination of the dissociation constants (K_D) for all ligands. Obtained data indicate that Ts26GST binds to all ligands but with different affinity. Porphyrins and lipid peroxide products inhibited Ts26GST catalytic activity up to 100% in contrast with only 20–30% inhibition observed for bile acids and two saturated fatty acids. Non-competitive type inhibition was observed for all enzyme inhibitor ligands except for trans-trans-2,4-decadienal, which exhibited uncompetitive type inhibition. The dissociation constant value $K_D = 0.7 \mu\text{M}$ for the hematin ligand, determined by competitive fluorescence assays with ANS, was in good agreement with its inhibition kinetic value $K_i = 0.3 \mu\text{M}$ and its intrinsic fluorescence quenching $K_D = 0.7 \mu\text{M}$. The remaining ligands did not displace ANS from the enzyme suggesting the existence of different binding sites.

In addition to the catalytic activity of Ts26GST the results obtained suggest that the enzyme exhibits a ligandin function with broad specificity towards nonsubstrate ligands.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Ligandin activity exhibited by glutathione transferase (GST) isoforms was first suggested as a result of observed affinity for

bilirubin, an azo dye carcinogen and a metabolite of cortisone (Levi et al., 1969; Ketterer et al., 1967; Morey and Litwack, 1969). Further studies proved the ability of GSTs to catalyze, with overlapping specificity, the nucleophilic attack by glutathione (GSH) on a large number of compounds bearing a variety of functional groups containing an electrophilic center (Ketterer et al., 1971; Pabst et al., 1973; Habig et al., 1974). GST ligandin activity has been poorly

* Corresponding author. Fax: +52 55 56 23 23 84.

E-mail address: apc@servidor.unam.mx (A. Plancarte).

investigated in comparison to its catalytic activity, a trend that appears to be exacerbated in the parasitic field, regardless of passive detoxification activity associated to the ligandin function in GSTs (van Rossum et al., 2004). As opposed to active detoxification which involves catalysis, passive detoxification as mentioned by Brophy et al., 1989; Brophy and Barrett, 1990a; Kostaropoulos et al., 2001, refers to a detoxification mechanism characterized by an absence of catalytic function, such as the binding by GSTs of potentially toxic nonsubstrate ligands such as porphyrins and lipid peroxides.

Taenia solium is a parasitic cestode in humans and pigs. Its tissue form or cysticerci causes neurocysticercosis (NC) when parasites are located in the central nervous system (CNS). In humans, NC is an important parasitic disease with a mortality rate of 50,000 deaths per year (Mafojane et al., 2003) and a worldwide morbidity of 20,000,000 individuals (Bem et al., 1999; Carpio, 2002; Ramírez-Zamora and Alarcón, 2010).

We have previously shown GST activity associated to a *T. solium* microsomal fraction (Nava et al., 2007) and purified and characterized a 26.5 kDa cytoplasmic GST (Ts26GST) from the same parasite (Plancarte et al., 2004). In fact, the recombinant enzyme form that corresponds to the native Ts26GST has been obtained (Vibanco et al., 2002). These results have shown that both the microsomal and cytoplasmic GSTs conjugate GSH, which in turn catalyzes several toxic substrates; results that are in good agreement with the range of values reported for this catalytic function. Other authors have also reported the enzymatic ability to conjugate GSH with xenobiotics observed for *T. solium* GST isoforms (Neguyen et al., 2010; Vibanco et al., 1999; Torres-Rivera and Landa, 2008a,b). There is, however, scarce information regarding the ligandin function of *T. solium* GST isoforms. It is thus that we have performed the current investigation. The results obtained may be useful from a physiological perspective in that Ts26GST may potentially bind toxic non-substrate ligands, thus functioning as an intracellular transporter with passive detoxification abilities, as has been mentioned by Brophy et al. (1989) and Caccuri et al. (1990).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All chemical reagents were analytical grade and used without further purification. Glutathione (GSH, γ -Glu-Cys-Gly), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), porphyrins, fatty acids, bile acids and trans, trans-2,4-dienals (dienaldehydes) were obtained from Sigma-Aldrich Chemicals Co (St. Louis, MO, USA). The 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) concentration was measured spectrophotometrically at 350 nm using an extinction coefficient of $4950 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Other chemicals were at least biology reagent grade. All solutions were prepared with distilled and deionized (Milli Q) water.

2.2. Parasites

T. solium cysticerci were dissected from skeletal muscle obtained from naturally infected cysticercotic pigs from the states of Morelos and Guerrero in Mexico.

2.3. Enzyme purification

Purification of the *T. solium* glutathione transferase isoform of 26.5 kDa (Ts26GST) was performed as previously described (Plancarte et al., 2004). We were careful to perform extensive dialysis on Ts26GST in order to avoid the presence of endogenous ligands which could alter the results obtained.

2.4. Protein determination

Protein content was measured by the method of Lowry using bovine serum albumin (BSA) as standard (Lowry et al., 1975). The precise concentration of BSA in the stock solution was determined by absorbance measurements at 280 nm. Concentration of the stock solution of the purified enzyme was likewise determined using $36,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ as molar extinction coefficient (web.expasy.org/protparam/).

2.5. Electrophoresis

Enzyme samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) at room temperature in 15% acrylamide slab gels (Laemmli, 1970).

2.6. Ts26GST dissociation constant (Kd)

In order to work with the dimeric structure of Ts26GST, protein concentration assays that ensured that at the concentrations utilized the enzyme existed as a dimer were carried out. Dilutions from an 830 $\mu\text{g/ml}$ enzyme stock were performed in an assay buffer, and transferase activity was evaluated immediately as described in the following section. Percent residual activity was plotted against protein concentration allowing for the determination of Kd values as obtained from the protein concentration reading at 50% residual activity.

2.7. Assay of GST activity

Glutathione transferase activity was determined as described by Habig et al. (1974) using CDNB as a substrate. Initial rates were obtained by monitoring changes in absorbance at 340 nm ($\epsilon = 9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in an Ultrospec 3100 Pro (Pharmacia-Biochem, Uppsala, Sweden) for two minutes after initiation of the enzyme assay. Assay mixture in the absence of enzyme was used as control. Each enzyme assay was performed with 0.5 μg of Ts26GST in PBS.

2.8. Preparation of ligand solutions

Twelve different nonsubstrate ligands were employed, which may be grouped into four different categories: bile acids, porphyrins, fatty acids and trans, trans-2,4-dienals or secondary products of lipid peroxidation (Table 1). Stock solutions of all ligands were prepared with absolute ethanol except for porphyrins, which required 0.1 M aqueous NH_4OH . All solutions were freshly prepared and free of aggregates.

Table 1
Conditions for inhibition Ts26GST catalytic activity and spectrofluorometric assays.

| Ligand | I_{50} (mM) | Ki (mM) | %F (mM) |
|----------------------------|---------------|----------------|---------------|
| Mesoporphyrin | 0.0012–0.1 | 15, 30, 45 | 0.0003–0.014 |
| Protoporphyrin | 0.002–0.064 | 12, 24, 36 | 0.0012–0.027 |
| Coproporphyrin | 0.0005–0.005 | 0.0015, 0.0045 | 0.0002–0.014 |
| Hematin | 0.0007–0.012 | 0.002, 0.004 | 0.00012–0.003 |
| trans,trans-2,4-hexadienal | 0.0001–10 | 1.5, 3 | 0.003–1.9 |
| trans,trans-2,4-nonadienal | 0.0001–10 | 0.45, 0.9 | 0.0016–0.35 |
| trans,trans-2,4-decadienal | 0.0001–10 | 0.01, 0.1 | 0.0016–2.6 |
| Arachidic acid | 0.001–0.25 | ND | 0.0016–0.2 |
| Palmitic acid | 0.0001–1 | ND | 0.0016–0.27 |
| Cholic acid | 0.0001–1 | ND | 0.003–0.045 |
| Chenodeoxycholic acid | 0.0001–0.2 | ND | 0.001–0.011 |
| Lithocholic acid | 0.0001–1 | ND | 0.025–0.2 |

I_{50} is a parameter giving the inhibitory concentration causing 50% inhibition; Ki, is the inhibition catalytic constant value; %F, is the % of Ts26GST intrinsic fluorescence quenching; ND, not determined.

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

In order to gain insight into the Ts26GST ligand binding capacity, studies of inhibition exerted by the twelve different ligands on the enzyme were performed (Tahir and Mannervik, 1986). Inhibitory I_{50} constant value for each ligand, used as inhibitor on Ts26GST, was determined allowing for the calculation of its inhibitory concentration rate. In experiments with hematin, variable concentrations of this ligand (0.7–12 μ M) were preincubated in the assay buffer at constant concentrations of Ts26GST (0.5 μ g), GSH (1 mM) and CDNB (1 mM), in a 1.0 ml total volume. Identical conditions were used in the evaluation of the remaining ligands, but a different range of concentrations was used (Table 1). All measurements were performed at least thrice, and the concentration of ligand yielding 50% inhibition (IC_{50}) was obtained by plotting the percent of residual activity against log of ligand concentration. Initial-velocity enzyme reactions in the presence of the ligands were performed in order to ascertain which type of reversible enzyme inhibition occurs for each of the twelve ligands employed. Ts26GST was preincubated for a few seconds in the assay buffer with 1 mM GSH and ligand at the corresponding concentration (Table 1). The reaction was initiated by addition of one of a range (0.1–5 mM) of different concentrations of CDNB. A set of reactions under identical conditions but in the absence of inhibitor was also performed. Results were measured spectrophotometrically at 340 nm and data were analyzed by Lineweaver-Burk plots. K_i value for each ligand was determined by replotting the slopes for the non-competitive type inhibition, and by the ordinate-axis intercepts of the slopes, obtained from the double reciprocal plots as a function of ligand concentration for uncompetitive type inhibition (Segel, 1975).

2.10. Ligand binding assays

Ligand binding to Ts26GST was determined by measuring changes in intrinsic protein fluorescence. Removal of dust from the solutions was attained by passage through a GS 0.22 μ m Millipore filter. Solutions were prepared in small cuvettes (5 mm cross-section) containing 100 μ l of (0.1 mg/ml) protein, 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) and 100 mM sodium chloride, to which were added increasing concentrations of each ligand (aliquot range 1–50 μ l) making a 600 μ l final volume. The solution was stirred with a Teflon rod after each addition. Because all ligands had limited solubility in water, the final ethanol or NH_4OH concentration in the assay was always less than 10%. Changes in fluorescence were recorded with a Perkin Elmer spectrofluorometer (LS 45) with excitation and emission wavelengths respectively at 280 nm and 340 nm, for intrinsic protein fluorescence (tryptophan, phenylalanine and tyrosine)

$$Y = 1 - (F/F_i) \quad (1)$$

Graphs of Eq. (1) against ligand concentration were plotted with these data; F is the overall fluorescence intensity after each addition of the inhibitor and F_i is the fluorescence of free Ts26GST at the corresponding concentration. The ligand dissociation constant (K_D) was calculated by fitting the data obtained from plots to non-linear regression calculations utilizing the equation:

$$Y = \left(\frac{a}{2E_t} \right) \left[(E_t + x + K_i) - \sqrt{(E_t + x + K_i)^2 - 4xE_t} \right] \quad (2)$$

where x is the total concentration of inhibitor in the cell and E_t represents the concentration of binding sites; a (the asymptotic value to which Y tends to at high x values) and K_i are the fitting parameters.

2.11. Fluorescence ANS–Ts26GST ligands competition assays

An alternative method to characterize the affinity of non-substrate ligands for Ts26GST consists in performing competition assays between ANS and ligands.

In order to determine the binding properties of Ts26GST on ANS, spectrofluorometric titrations with the naphthalene dye were performed by quenching of the intrinsic aromatic amino acids of Ts26GST. The excitation wavelength was 280 nm, and fluorescence was monitored at 340 nm. The excitation and emission band passes were 10 nm in both cases.

A 65 μ g/ml solution of Ts26GST in a 1 ml quartz fluorescence cell was stirred after each addition of ANS (1–45 μ M). A similar buffer to that employed in ligand binding assays was used. Competition assays between ANS and ligands for the binding site of Ts26GST were carried out as follows. Fluorometric titrations of a mixture of solutions, 30 μ g Ts26GST and 11 μ g ANS with hematin (0–2 μ g), were performed. Excitation and emission wavelengths for ANS were measured at 400 and 490 nm, respectively. A set of fluorometric titration reactions under identical conditions was performed in the presence of each of the twelve different ligands.

The dissociation constant values, K_D , as determined by competition with ANS, were calculated by double-reciprocal plots of the change in absorbance versus ligand concentration. Each instance yielded a straight line, the slope of which is equal to $-K_D / (1 + [ANS]/K_{ANS})$ (Webb, 1963).

3. Results

3.1. Enzyme purification

Ts26GST was purified through a simple purification procedure which involved a GSH-Sepharose affinity column followed by a chromatofocusing PBE 94 system (Habig et al., 1974; Plancarte et al., 2004). The final enzyme preparation yielded a single band with molecular weight of 26.5 kDa upon SDS-PAGE (data not shown).

Ts26GST stocks obtained for this work had purity, specific activity and purification yield of the enzyme similar to that described by Plancarte et al., (2004).

3.2. Ts26GST dissociation constant (K_d)

A dimeric quaternary structure is required for the formation of a fully functional active site and serves as quality control in ligand binding studies in all glutathione transferases (Wilce and Parker, 1994; Ricci et al., 1995). A concentration value of Ts26GST equal to or greater than the dissociation constant (K_d) ensures that the enzyme is in its dimeric form. K_d can be estimated from residual specific activity measurements following incubation of the enzyme at different concentrations. A plot of residual specific activity versus enzyme concentration resulted in a sigmoid curve (not shown) which shows that below 50% residual specific activity the dimer undergoes dissociation. However, dimeric conformation is observed at concentrations greater than 0.44 μ g/ml. All assays were thus carried out at Ts26GST concentration of 0.5 μ g/ml or higher.

3.3. Inhibition of enzymatic activity by ligands, IC_{50} , K_i

Only eight of the twelve ligands tested inhibited Ts26GST catalytic activity; IC_{50} and K_i results were observed to depend on the ligand used (Table 2). All the porphyrin ligands inhibited the enzyme with a very high specificity and significant differences were observed between hematin and mesoporphyrin, with IC_{50} and K_i values for the latter some fifteen times those of the former. A non-competitive inhibition pattern was observed for the four

Table 2
Summary of catalytic inhibition studies and binding parameters for ligands bound to Ts26GST.

| Ligand | I_{50} (mM) | K_i (mM) | Inhibition type | K_D (μ M) | %F (mM) |
|------------------------------------|---------------|------------|-----------------|------------------|---------|
| Coproporphyrin | 0.003 | 0.001 | NC | 2.58 | 69 |
| Protoporphyrin | 0.026 | 0.004 | NC | 2.74 | 42 |
| Mesoporphyrin | 0.03 | 0.0005 | NC | 1.11 | 40 |
| Hematin | 0.02 | 0.0003 | NC | 0.7 | 43 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-Hexadienal | 2200 | 1.82 | NC | 19.6 | 99 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-Nonadienal | 660 | 0.37 | NC | 15.6 | 99 |
| <i>trans,trans</i> -2,4-Decadienal | 52 | 0.43 | UN | 11.6 | 99 |
| Lithocholic acid | ND | ND | ND | 45.58 | 10 |
| Chenodeoxycholic acid | ND | ND | ND | 3.86 | 11 |
| Cholic acid | ND | ND | ND | 9.3 | 8.4 |
| Arachidic acid | ND | ND | ND | 15.8 | 24 |
| Palmitic acid | ND | ND | ND | 4.15 | 10 |

I_{50} , is a parameter giving the inhibitory concentration causing 50% inhibition; K_i , is the inhibition catalytic constant value; K_D , is the dissociation constant value; %F, is the % of Ts26GST intrinsic fluorescence quenching; ND, no-activity detected.

porphyrins used as inhibitors with CDNB as the variable substrate. Fig. 1A shows a typical plot of the $1/v$ ($\mu\text{M min}^{-1}$) axis intercept against inhibitor concentration (inset of Fig. 1A) which yielded a K_i value of $0.3 \mu\text{M}$ (Table 2). Ligands other than porphyrins were examined for Ts26GST transferase activity. Both aldehydic lipid peroxidation products showed a moderate inhibition effect on enzyme catalysis; their values were in the millimolar units range. *Trans, trans*-2,4-decadienal (tt-DDE) and *Trans, trans*-2,4-nonadienal were stronger inhibitors than the lipids employed (Table 2). An uncompetitive inhibition pattern for tt-DDE (Fig. 1B) and non-competitive patterns for the other three lipids were observed by the analytical procedure previously described (Fig. 1A). K_i values for the lipid ligands were obtained as described for porphyrins (Table 2).

3.4. Ligands binding to Ts26GST

Measurements of ligand binding affinity to Ts26GST were also determined by intrinsic fluorescence quenching of Ts26GST following titrations with the corresponding ligand as indicated in Section 2.

3.4.1. Bile acids group

A typical result (Fig. 2A) shows quenching of intrinsic Ts26GST fluorescence upon addition of lithocholic acid (LC) to 25–200 μM solutions of the enzyme. As the LC concentration increased, a decrease in quantum yield and non-shift of the wavelength of maximal emission of Ts26GST was observed. Similar intrinsic fluorescence spectra of Ts26GST were obtained with chenodeoxycholic acid and cholic acid as quenching ligands (data not shown). The concentration range used of bile acids was in agreement with those reported by other authors (Sugiyama et al., 1984). An approximate 10% inhibition of intrinsic fluorescence of the enzyme was obtained, with no significant effect observed at higher concentrations (Table 2). Fluorescence quenching of Ts26GST data were analyzed in order to obtain the bile acids dissociation constant (K_D) values. K_D values were calculated by fitting the data to nonlinear regression calculations with the equation previously described in Materials and methods. Fig. 3 shows a typical plot of the maximal intrinsic fluorescence intensity value of Ts26GST against concentration of lithocholic acid, where a curve shift toward higher concentrations of the ligand is perceived. A high bile acid range affinity was observed for Ts26GST. Whereas binding was tight for primary bile acids, the opposite trend occurred with secondary bile acids (Table 2).

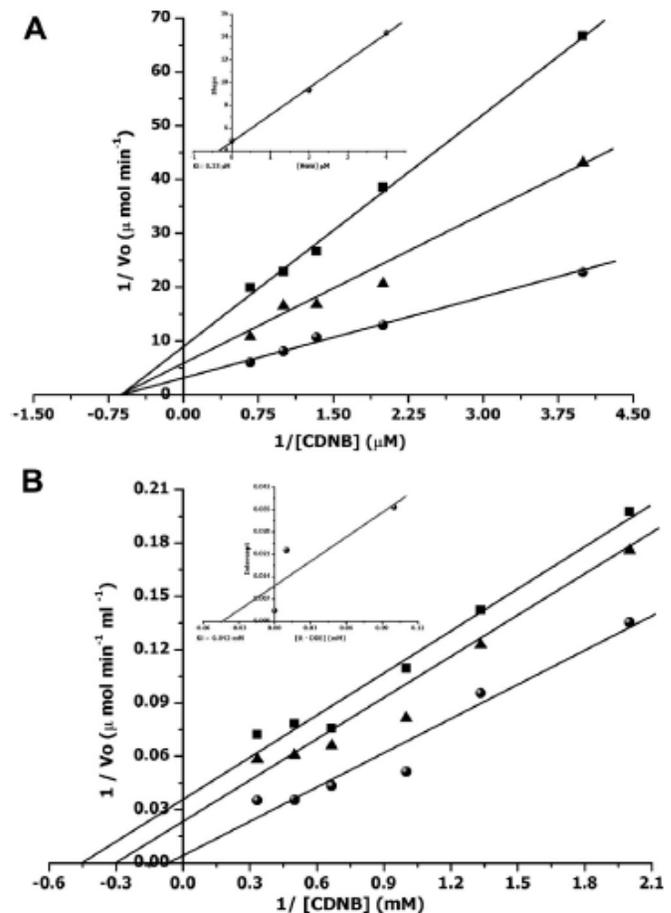


Fig. 1. Representative of the porphyrins group. (A) Shows a non-competitive type inhibition where the $1/v$ versus $1/[CDNB]$ plot of initial velocities Ts26GST activity in the absence (black circles) and presence of $2 \mu\text{M}$ (triangles) and $4 \mu\text{M}$ (squares) of hematin with various concentrations of CDNB (0.1–5 mM). Inset shows secondary plot of the $1/v_{max}$ values derived from the primary $1/v$ versus $1/[CDNB]$ plot versus hematin concentration for the determination of K_i . (B) Representative of the dienals group where it describes the $1/v$ versus $1/[CDNB]$ plot of typical uncompetitive inhibition of initial velocities Ts26GST activity in the absence (black circles) and presence of 0.01 mM (triangles) and 0.1 mM (squares) of 2,4-*trans-trans* decadienal (tt-DDE) with variable concentrations of CDNB (0.1–5 mM). Inset shows secondary plot of the $1/v_{max}$ values derived from the primary $1/v$ versus $1/[CDNB]$ plot versus tt-DDE concentration for the determination of K_i . The hexa and nona dienals developed a non-competitive inhibition type.

3.4.2. Porphyrin ligands group

Hematin, protoporphyrin, mesoporphyrin and coproporphyrin could bind Ts26GST as observed for bile acids. Ts26GST intrinsic

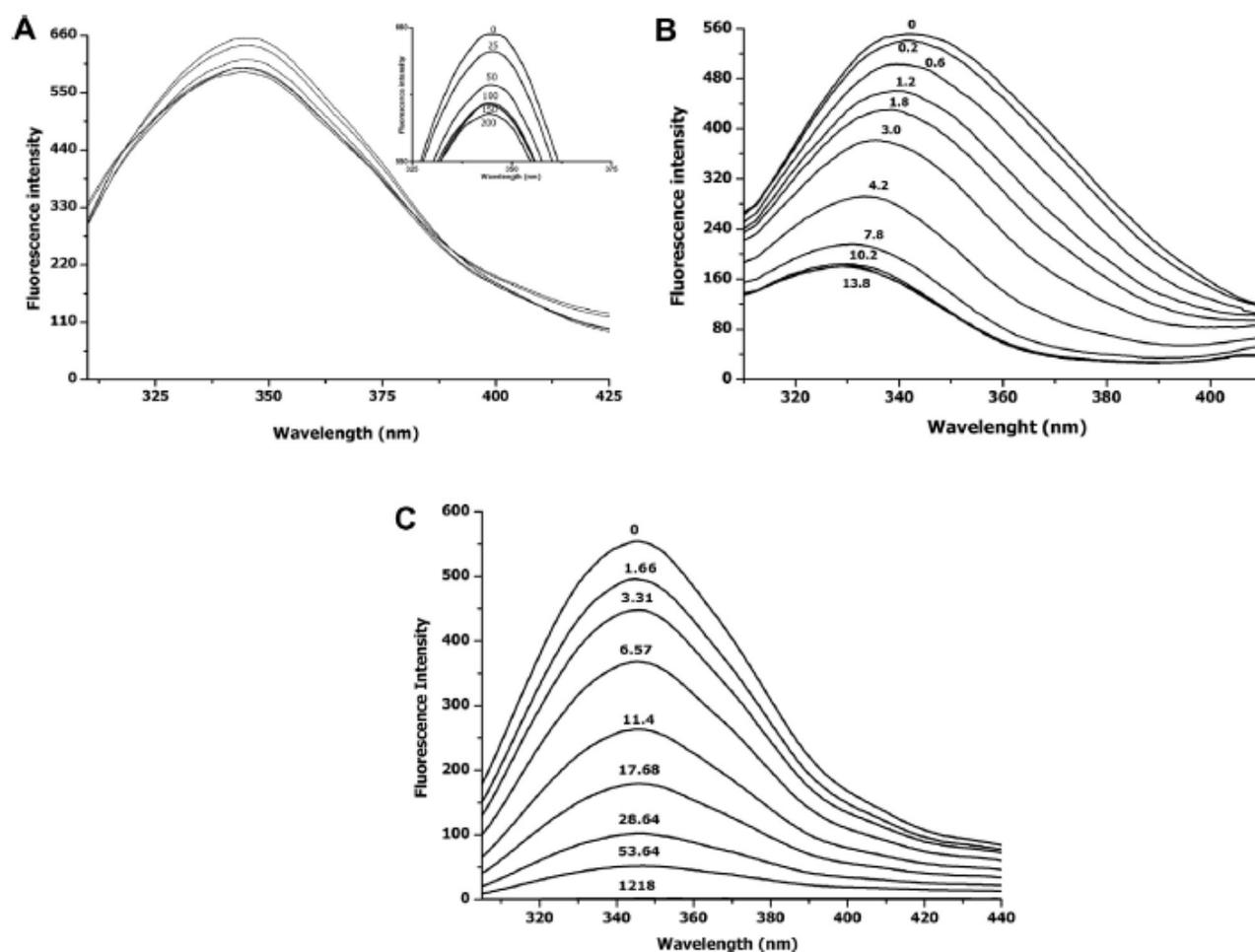


Fig. 2. Representative of the bile acids group. (A) Fluorescence emission spectra of Ts26GST by titration with lithocholic acid. Ts26GST was titrated with increasing amounts of lithocholic acid until no further decrease of the peak was observed. The inset represents a zoom of the spectra high part. (B) Representative of the porphyrins group where it describes the fluorescence emission spectra of Ts26GST by titration with coproporphyrin. Emission maximum of coproporphyrin shifted from 342 to 323 nm with a decreased of fluorescence intensity after addition of this ligand. (C) Representative of the trans, trans-2,4-dienals group where it describes the fluorescence spectra of Ts26GST, by titration with increasing amounts of *tt*-DDE (1.66–1218 μ M) until a complete protein fluorescence quenching was developed.

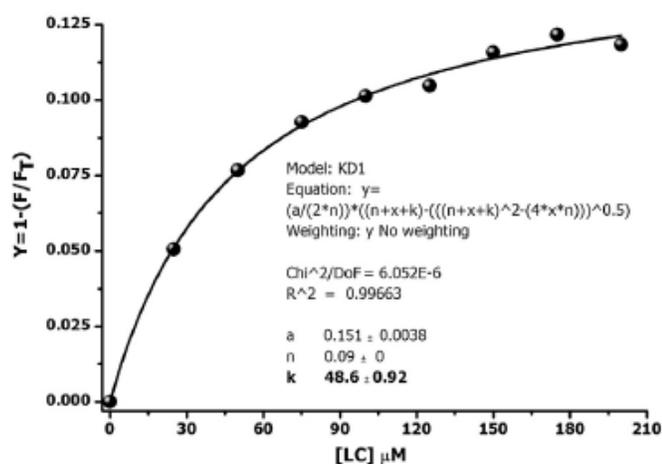


Fig. 3. Representative for all groups showing the fluorometric titration of 1.17 μ M of Ts26GST with 9 different additions of lithocholic acid (LC). Symbols represent the fraction of total Ts26GST fluorescence (F_i) that is quenched by the added LC; data point was fitted to Eq. (2) (see text) by a nonlinear regression (solid line).

fluorescence inhibition percent was similar for all porphyrins except for coproporphyrin which exhibited a higher value; porphyrins proved to be better inhibitors than bile acids (Table 2).

Additionally, coproporphyrin showed an 18 nm blue-shift in the maximum emission wavelength (Fig. 2B). Porphyrin K_D values obtained fell in the range established by the lowest K_D value and four times this value (Table 2); hemein and mesoporphyrin showed more affinity for the enzyme than protoporphyrin and coproporphyrin but all showed K_D values similar to those observed for cestodes (Ketley et al., 1975) and nematodes (van Rossum et al., 2004).

3.4.3. Trans, trans-2,4-dienals group

Hexa, nona and decadienal were the only three ligands for which 100% inhibition of intrinsic fluorescence of the enzyme was observed (Fig. 2C). Enzyme intrinsic quenching showed an indirect relation with dienal chain-length, with an increase in chain-length resulting in a decrease in K_D value (Table 2). A possible explanation is that the binding properties for these ligands are more related to chain-length than to the aldehyde functional group.

3.4.4. Fatty acid ligands group

Palmitic and arachidonic acids (Table 2) poorly quenched Ts26GST intrinsic fluorescence in comparison to the above mentioned ligands. These results are in agreement with those obtained for inhibition fluorescence percent and K_D (Table 2). Palmitic acid was a more effective quenching agent than arachidonic acid.

3.5. Binding of ANS to Ts26GST

The fluorescence spectra of ANS–Ts26GST complexes at an excitation wavelength of 280 nm (at which both Ts26GST and ANS absorb) are shown in Fig. 4A. In this experiment all Ts26GST concentrations were 65 $\mu\text{g/ml}$ so that practically all ANS added was bound to the protein. Results show that as the number of moles of ligand bound/mole of protein (n) increases, ANS fluorescence (λ_{max} 490 nm) increases and consequently protein fluorescence (λ_{max} 343 nm) decreases. It should be noted that no change in emission maximum or band width (± 1 nm) was observed in ANS spectra over the range of n values recorded ($n = 0.3$ – 2). The invariance of the emission spectra of adsorbed ANS extended up to values of n as large as 5 (within the same limits of error). The spectra shown in Fig. 4A exhibit an isoemissive point at 418 nm. As described by Anderson and Weber (1965), this is proof that the fluorescence quantum yield of the adsorbed molecules is invariant over the range of values of n explored.

3.6. Fluorescence ANS–Ts26GST ligands competition assays

Hematin was the only ligand out of the twelve ligands explored which could successfully be displaced from the enzyme by ANS

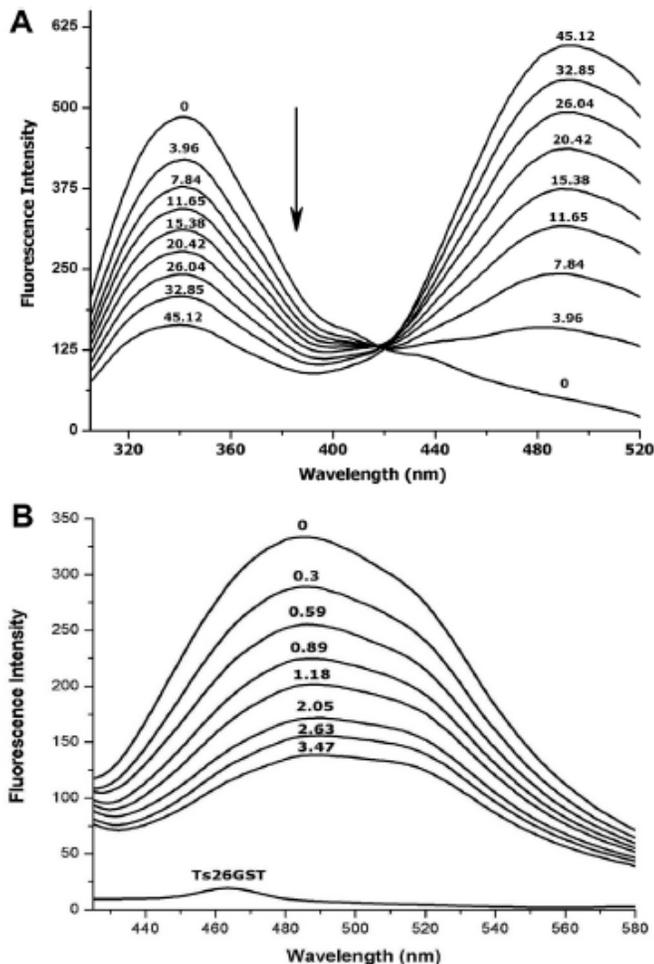


Fig. 4. (A) Fluorescence spectra of ANS–Ts26GST at various values of n (see experimental conditions in the text under Section 2). The line in the direction of the arrow corresponds with different addition of ANS. An isoemissive point is observed at 418 nm. The Ts26GST K_D value for ANS was 29 μM . (B) Competitive fluorescence of Ts26GST with the fluorescence ligand ANS and hematin. Lines 0 and Ts26GST indicated the fluorescence of the enzyme with and without ANS respectively. The rest of the lines indicate the μM amount of hematin added to the ANS–Ts26GST complex. The Ts26GST K_D value for hematin was 0.5 μM .

(Fig. 4B). The dissociation constant (K_i) value for hematin, determined by double-reciprocal plots, was in good agreement for both methods employed, with an intrinsic fluorescence K_D value of 0.7 μM and an ANS competitive fluorescence value of 0.7 μM .

4. Discussion

Ligandin function in glutathione transferases has been recognized recently not only as a passive detoxification mechanism, different to that which involves catalytic activity performed by the same protein, (Arias et al., 1980) but also as one with a strong influence in the physiology and metabolism of certain organisms (Bates et al., 2009; Li et al., 2004; Paumi et al., 2004; Boyer and Olsen, 1991). Nonetheless, this aspect has been poorly analyzed in helminthes. We have recently shown that *Taenia crassiceps* exhibits ligandin functions towards certain hydrophobic ligands (Hernandez et al., 2009). In order further to increase our knowledge regarding cestodes, inhibition kinetics, fluorescence spectroscopy and competitive fluorescence assays with the hydrophobic binding site probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) were carried out to evaluate the binding of non-substrate ligands by a GST isoform of *T. solium* (Ts26GST). These techniques were chosen over long equilibration times due to instability of aqueous solutions of the ligands (Falk, 1964). The ligandin function of the Ts26GST was investigated by using a set of ligands that bind to GSTs which have in common that they may be either physiologically required or toxic depending on their concentration. The ligands are also non-catalytic GST substrates, as may be concluded from their reaction with mercaptans in the absence of enzyme. Quenching of enzyme intrinsic fluorescence showed that all members of the four groups of ligands studied were able to bind to Ts26GST. Binding ability was similar within each ligand group but different between groups. Ts26GST appears to have a high affinity site for hematin. Its quenching of intrinsic fluorescence dissociation constant (K_D) value of 0.7 μM is lower for hematin interaction with a number of mammalian liver tissue alpha class GSTs. Hence, different roles in heme detoxification and/or transport have been proposed (Mannervik et al., 1985). The results are more in agreement with the affinity values of thirteen human liver glutathione transferases analyzed for unique heme-binding sites (Vander Jagt et al., 1985) as well as analyses performed on nematodes (Perally et al., 2008; van Rossum et al., 2004; 36). Enzyme inhibition assays using CDNB as substrate confirmed that Ts26GST is strongly inhibited by the iron tetrapyrrole with $\text{IC}_{50} = 0.002$ μM , as has also been observed for parasitic Nu-class GST. Inhibition was also 90 times lower than that obtained for *Haemoncus contortus* (Van Rossum et al., 2004). Analysis of Ts26GST inhibition data by Lineweaver–Burk plots suggests that the binding of hematin is noncompetitive. Inhibition data fitted by linear regression analysis yield the following estimates: K_i (hematin/CDNB) = 0.3 μM , where K_i is the inhibition constant at a fixed concentration of the second substrate.

In addition, hematin competed with the hydrophobic fluorescent probe ANS for the Ts26GST hydrophobic sites with a K_D value of 0.7 μM . However, taking these results into consideration together with parasite enzyme noncompetitive inhibition for hematin, it may also be reasonable to assume that hematin was able to conceal the enzyme's hydrophobic site thus lowering ANS fluorescence. This may be possible because the enzyme–substrate–inhibitor complex (ESI [Ts26GST–GSH–hematin]) formed in this type of inhibition is capable of modifying Ts26GST structure conformation (Segel, 1975), consequently avoiding enzyme–ANS interaction. Further investigation is currently underway aiming at gaining more insight into this particular aspect.

The presence of several porphyrins in the cyst fluid of *T. solium* has been shown (Larralde et al., 1986, 1987) although there is no

explanation from their source yet. Addition to this, a catalytically active isoform of GST, has been demonstrated in the same parasite location (Plancarte, 2004). The results obtained in this work support the idea that Ts26GST has a ligandin function. Thus, if cestodes are unable to synthesize porphyrins as their mammalian hosts do, Ts26GST could bind and carry these tetrapyrrolic compounds through the parasite syncytium, delivering them into the parasite cyst fluid. This idea is further supported by recent reports that GSTs may function as a protein transduction domain (PTD) delivering exogenous molecules such as peptides, proteins, and synthesized chemical compounds into living cells (Namiki et al., 2003), and that this cellular uptake is developed by the "GST-fold" structural motif (Morris et al., 2009).

Unlike other GSTs of helminthes (Brophy and Barret, 1990b), Ts26GST exhibits no catalytic activity toward the different dienaldehyde products of lipid peroxidation used in this work. However, these were the only ligands displaying 100% capability to quench Ts26GST intrinsic fluorescence. A similar ability of the enzyme towards dienaldehydes was observed, as suggested by the K_D values. However, differences were observed upon examination of other binding variables. The trans, trans-2,4-decadienal (tt-DDE), the longest chain dienaldehyde analyzed, was the only ligand to develop Ts26GST a competitive type inhibition, the type of inhibition with the greatest affinity for inhibitors in comparison with noncompetitive and competitive types (Segel, 1975). This result is in agreement with the parasite enzyme IC_{50} and K_i values and with the longest alkyl chain of S-alkylglutathione, indicating the important role played by hydrophobic interactions in binding (Askelöf et al., 1975).

Peroxidative decomposition of membrane lipids and the associated changes in bulk membrane properties have frequently been considered the basis of cell injury (Recknagel and Ghoshal, 1966). Dienaldehydes are by-products of peroxidation of polyunsaturated lipids, and tt-DDE exhibits high toxicity (Carvalho et al., 2001; Loureiro et al., 2000). Neurocysticercosis (NC) is associated with the induction of lipid peroxidation by inflammatory cells. In particular, those NC patients with vesicular and colloidal cysticerci and severe inflammatory responses show high amounts of lipid peroxides in their cerebrospinal fluid (CSF) (Rodríguez et al., 2008). Up to now, no characterization of the lipid peroxides found in CSF of NC patients has been carried out. It is highly likely that tt-DDE may be found present. Through its binding affinity for dienaldehydes, Ts26GST may contribute as a detoxifying agent by reducing the presence of the aforementioned secondary products of lipid peroxidation which may potentially damage the parasite, thus functioning as an alternative detoxification mechanism which does not involve catalysis.

This idea is further supported by asymptomatic patients who exhibit either a low or a minimal immune response despite lodging viable cysticerci in both tissue and central nervous system (Dixon and Lipscomb, 1961; Flisser et al., 1993). As occurs with the bile acids' ligandin function observed in mammalian hepatic GSTs, Ts26GST could also bind lithocholic acid, chenodeoxycholic acid and cholic acid with eleven-fold differences observed for their enzyme dissociation constants, K_D . Chenodeoxycholic and cholic acid were the ligands that showed strongest inhibition of Ts26GST, exhibiting higher values than the Y_4Y_4 and Y_4Y_6 GSTs from rat liver, although an opposite trend was observed for lithocholic acid (Takikawa et al., 1986). Binding affinities for bile acids have been shown to occur at μM concentrations, as evidenced by several rat liver GSTs (Hayes and Mantle, 1986). Non-catalytic activity and non-enzyme inhibition of Ts26GST observed for the bile acids analyzed suggest a low interaction between these ligands and the parasite protein. A possible explanation would be that the parasite-bile acids interaction is location-dependent, with poor interaction observed in brain and muscle as opposed to liver,

where bile acid transport is a major aspect of its function. It is also known that the size of the liver bile acids pool can exert and influence on GST binding capacity (Vessey and Zakim, 1981).

Ts26GST ligandin function was also evaluated with several fatty acids. Palmitic acid, one of the most common fatty acids in *T. solium* tissue (Kim et al., 2013), had a low protein intrinsic quenching indicating few selective binding regions on the protein surface. Palmitic and arachidic acids showed moderate K_D values as compared to other ligands utilized, suggesting diverse affinities of Ts26GST, as has been observed for many mammalian GSTs.

Because of its non-covalent binding properties, it has been postulated that mammalian GST ligandin function is a major factor involved in the net flux of its ligands from plasma to liver (Arias, 1972) and from liver to bile. For Ts26GST, this parasite enzyme may also be important in the regulation of the amounts of its ligands which are available for intracellular metabolism or physiological action.

Quantitative data related to the binding of small molecules has been carried out in this work in order to assess the nature of the ligandin function.

Acknowledgments

The present study was funded by grant from the Universidad Nacional Autónoma de México, DGPA (PAPIIT IN211313). José R. Romero expresses his gratitude for the training received in the Postgraduate Program in Biological Science. All experiments complied with the current laws of the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors wish to thank to Dr. Gerardo Medina for valuable English corrections.

References

- Anderson, S.R., Weber, G., 1965. Multiplicity of binding by lactate dehydrogenase. *Biochemistry* 4, 1948–1957.
- Arias, I.M., 1972. Transfer of bilirubin to from blood bile. *Semin. Hematol.* 9, 55–70.
- Arias, I.M., Ohmi, N., Bhargava, M., Listowsky, I., 1980. Ligandin: an adventure in liverland. *Mol. Cell Biochem.* 29, 71–80.
- Askelöf, P., Guthenberg, C., Jakobson, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of two glutathione S-aryltransferase activities from rat liver. *Biochem. J.* 147, 513–522.
- Bates, D.J.P., Lively, M.O., Gorezynski, M.J., King, S.B., Townsend, A.J., Morrow, Ch.S., 2009. Noncatalytic interactions between glutathione S-transferases and nitroalkene fatty acids modulated nitroalkene-mediated activation of peroxisomal proliferator-activated receptor γ . *Biochemistry* 48, 4159–4169.
- Bem, C., García, H.H., Evans, C., Gonzalez, A.E., Verastegui, M., Tsang, V.C., Gilman, R.H., 1999. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1203–1209.
- Boyer, T.D., Olsen, E., 1991. Role of glutathione S-transferases in heme transport. *Biochem. Pharmacol.* 42, 188–190.
- Brophy, P.M., Barrett, J., 1990a. Blocking factors and the isolation of glutathione transferases from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae). *Parasitology* 100, 137–141.
- Brophy, P.M., Southan, Ch., Barrett, J., 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem. J.* 262, 939–946.
- Brophy, P.M., Barret, J., 1990b. Strategies for detoxification of aldehydic products of lipid peroxidation in helminthes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 205–212.
- Caccuri, A.M., Aceto, A., Piemonte, F., Di Ilio, C., Rosato, N., Federici, G., 1990. Interaction of heme with placental glutathione transferase. *Eur. J. Biochem.* 189, 493–497.
- Capio, A., 2002. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect. Dis.* 2, 751–762.
- Carvalho, V.M., Asahara, F., Di Mascio, P., Campos, L.P., Cadet, J., Medeiros, M.H., 2001. N6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from trans, trans-2-4-decadienal and trans-2-octenal. *Adv. Exp. Med. Biol.* 500, 229–232.
- Dixon, H.B.F., Lipscomb, F.M., 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up 450 cases. Privy council for medical research. *Spec. Rep. Serv.* 229, 1–58.
- Falk, J.E., 1964. Porphyrins and Metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam, 46.
- Flisser, A., Madrazo, I., Plancarte, A., Schantz, P., Allan, J., Craig, P., Sarti, E., 1993. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniacidal dose of praziquantel. *Lancet* 342, 748.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hayes, J.D., Mantle, T.J., 1986. Inhibition of hepatic and extrahepatic glutathione S-transferases by primary and secondary bile acids. *Biochem. J.* 233, 407–415.

- Hernandez, M., Nava, G., Plancarte, A., 2009. Purification, characterization and carrier function demonstration of *Taenia cracciceps* glutathione S-transferase. *Rev. Ibero Latinoam. Parasitol.* 68, 150–158.
- Ketley, J.N., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1975. Binding nonsubstrate ligands to the glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 250, 8670–8673.
- Ketterer, B., Ross-Mansell, P., Whitehead, J.K., 1967. The isolation of carcinogen-binding protein from livers of rats given 4-dimethylaminoazobenzene. *Biochem. J.* 103, 316–324.
- Ketterer, B., Litwack, L., Arias, A., 1971. Ligand: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234, 466–467.
- Kim, S.H., Bae, Y.A., Nam, J.S., Yang, Y., Nawa, Y., Kong, Y., 2013. Fatty acid compositions of *Taenia solium* metacestode and its surrounding tissues. *Parasitol. Int.* 62, 75–78.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulos-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 313–319.
- Laemmli, V., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Larralde, C., Martínez, G., Lagunoff, D., Ludowyke, R., Montoya, R.M., Goodsaid, F., Dreyfus, G., Sciuotto, E., Govezensky, T., Diaz, M.L., 1986. Porphyrin content of the cysticercus of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 72, 569–577.
- Larralde, C., Sassa, S., Vanderkooi, J.M., Koloczek, H., Lalette, J.P., Goodsaid, F., Sciuotto, E., Owen, Ch.S., 1987. Analysis of porphyrins and enzymes in porphyrin synthesis in *Taenia solium* cysticercus from man and pig. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22, 203–213.
- Levi, A.J., Gatmaitan, Z., Arias, I.M., 1969. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J. Clin. Invest.* 48, 2156–2167.
- Li, S., Armstrong, C.M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.O., Han, J.D., Chesneau, A., Hao, T., Goldberg, D.S., Li, N., Martinez, M., Rual, J.F., Lamesch, P., Xu, L., Tewari, M., Wong, S.L., Zhang, L., Berriz, G.F., Jacotot, L., Vaglio, P., Reboul, J., Hirozane-Kishikawa, T., Li, Q., Gabel, H.W., Elewa, A., Baumgartner, B., Rose, D.J., Yu, H., Bosaki, S., Squerra, R., Fraser, A., Mango, S.E., Saxton, W.M., Strome, S., Van Den Heuvel, S., Piano, F., Vandenhaute, J., Sarder, C., Gerstein, M., Doucette-Stamm, L., Gunsalus, K.C., Harper, J.W., Cusick, M.E., Roth, F.P., Hill, D.E., Vidal, M., 2004. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science* 303, 540–543.
- Loureiro, A.P., Di Mascio, P., Gomez, O.F., Medeiros, M.H., 2000. Trans, trans-2-4-decadienal induced 1, N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 601–609.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Lewis-Farr, A., Randall, R., 1975. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mafojane, N.A., Appleton, C.C., Kreczek, R.C., Michaelis, L.M., Willingham, A.L., 2003. The current status of neurocysticercosis in Eastern and South Africa. *Acta Trop.* 87, 25–33.
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M.K., Warholm, M., Jörnvall, H., 1985. Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7202–7206.
- Morey, K.S., Litwack, G., 1969. Isolation and properties of cortisol metabolite binding proteins of rat liver cytosol. *Biochemistry* 8, 4813–4821.
- Morris, M.J., Craig, S.J., Sutherland, T.M., Board, Ph.G., Casarotto, M.G., 2009. Transport of glutathione transferase-fold structured proteins into living cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1788, 676–685.
- Namiki, S., Tomida, T., Tanabe, M., Iino, M., Hirose, K., 2003. Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 592–597.
- Nava, G., Robert, L., Plancarte, A., 2007. Characterization of *Taenia solium* cysticercus microsomal glutathione S-transferase activity. *Parasitol. Res.* 101, 1373–1381.
- Nguyen, H.A., Bae, Y.A., Lee, E.G., Kim, S.H., Diaz, S.P., Nawa, Y., Kang, I., Kong, Y., 2010. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode. *Int. J. Parasitol.* 26, 1438–1445.
- Pabst, M.J., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1973. Mercapturic acid formation: the several glutathione transferases of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 1123–1128.
- Paumi, Ch.M., Smitherman, P.K., Townsend, A.J., Morrow, Ch.S., 2004. Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J_2 (15-d-PG J_2). *Biochemistry* 43, 2345–2352.
- Perally, S., LaCourse, E.J., Campbell, A.M., Brophy, P.M., 2008. Heme transport and detoxification in nematodes: subproteomics evidence of differential role of glutathione transferases. *J. Proteome Res.* 7, 4557–4565.
- Plancarte, A., 2004. Purification and Biochemical Characterization of glutathione S-transferase 26.5 kDa from *Taenia solium*. (Ph. D Thesis), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.
- Plancarte, A., Rendón, J.L., Landa, A., 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol. Res.* 93, 137–144.
- Ramírez-Zamora, A., Alarcón, T., 2010. Management of neurocysticercosis. *Neurol. Res.* 32, 229–237.
- Recknagel, R.O., Ghoshal, A.K., 1966. Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Lab. Invest.* 15, 132–146.
- Ricci, G., LoBello, M., Caccuri, A.M., Pastore, A., Nuccetelli, M., Parker, M.W., Federici, G., 1995. Site-directed mutagenesis of human glutathione transferase P-1-1. *J. Biol. Res.* 270, 1249–1253.
- Rodríguez, U., Rios, C., Corona, T., Talayero, B., Ostrosky, P., Herrera, L., 2008. Lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 1025–1031.
- Segel, I., 1975. Simple inhibition systems. In: *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley and Sons Inc, New York, pp. 100–160.
- Sugiyama, Y., Slotz, A., Sugimoto, M., Kaplowitz, N., 1984. Evidence for a common high affinity binding site on glutathione S-transferase B for lithocholic acid and bilirubin. *J. Lipids Res.* 25, 1177–1183.
- Tahir, M.K., Mannervik, B., 1986. Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* 261, 1048–1051.
- Takikawa, H., Sugiyama, Y., Kaplowitz, N., 1986. Binding of bile acids by glutathione S-transferases from rat liver. *J. Lipids Res.* 27, 955–966.
- Torres-Rivera, A., Landa, A., 2008a. Glutathione transferases from parasites: a biochemical view. *Acta Trop.* 105, 99–112.
- Torres-Rivera, A., Landa, A., 2008b. A cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 477, 372–378.
- van Rossum, A.J., Jefferies, J.R., Rijsewijk, A.M., LaCourse, E.J., Teesdale-Spittle, P., Barret, J., Tait, A., Brophy, P.M., 2004. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Infect. Immun.* 72, 2780–2790.
- Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Garcia, K.B., Royer, R.E., 1985. Isolation and characterization of the multiple glutathione S-transferases from human liver. *J. Biol. Chem.* 260, 11603–11610.
- Vessey, D.A., Zakim, D., 1981. Inhibition of glutathione S-transferases by bile acids. *Biochem. J.* 197, 321–325.
- Vibanco, N., Jimenez, L., Merchant, M.T., Landa, A., 1999. Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 85, 448–453.
- Vibanco, N., Jiménez, L., Mendoza-Hernández, G., Landa, A., 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* 88, 398–404.
- Webb, J.L., 1963. *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. 1. Academic Press, New York, p. 151.
- Wilce, M.C.J., Parker, M.W., 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochem. Biophys. Acta* 1205, 1–18.