



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE
DIVERSAS GLUTATIÓN TRANSFERASAS DE LAS
FORMAS LARVALES DE *Taenia crassiceps*
IDENTIFICADAS EN SU TRANSCRIPTOMA

TESIS

Que para obtener el título de
Médica Veterinaria Zootecnista

P R E S E N T A

Cinthia Ivette Gómez Castrejón

Asesor

Dr. Agustín Plancarte Crespo



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



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.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 <i>Taenia crassiceps</i>	3
1.1.1 Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	4
1.2 <i>Taenia crassiceps</i> como modelo de investigación	5
1.3 Enzimas	6
1.3.1 Enzimas detoxificantes	6
1.3.2 Glutación transferasas (GSTs)	7
1.4 Glutación (GSH)	8
1.5 Cinética enzimática. Ecuación de Michaelis-Menten	9
1.6 Efecto del pH sobre la actividad enzimática	11
1.7 Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas	11
1.8 Inhibición enzimática, I_{50}	11
1.9 Producción de proteínas recombinantes.....	12
1.10 GST en <i>Taenia crassiceps</i>	13
2. Justificación.....	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivo.....	15
5. Material y métodos.....	15

5.1 Obtención de la secuencia genómica de las enzimas GSTs en el transcriptoma de <i>T. crassiceps</i> y diseño de oligos	15
5.2 Extracción del ácido ribonucleico (RNA) de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	16
5.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA totales.....	17
5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
5.5 Construcción de los plásmidos pJET1.2/TcGSTs.....	18
5.6 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes Top 10 y TG1	18
5.7 Selección de colonias positivas a los genes de TcGST y purificación de los plásmidos.....	19
5.8 Restricción de los genes TcGSTs, ligación al plásmido pET23a(+) de los insertos con restricción y transformación del producto de ligación en células <i>E. coli</i> competentes Top 10.....	20
5.9 Selección de bacterias positivas a los genes TcGSTs, purificación de los plásmidos construidos y transformación en bacterias de expresión <i>E. coli</i>	21
5.10 Inducción de las proteínas TcGSTs con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).....	23
5.11 Cromatografía Sefarosa-IMAC para purificar las r-TcGSTs.....	23
5.12 Ensayos enzimáticos de las enzimas r-TcGSTs.....	24
5.13 Actividad enzimática en función del pH	25
5.14 Actividad enzimática en función de la temperatura.....	26
5.15 Caracterización cinética de las proteínas rTcGST, determinación de la velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), constante de afinidad (K_m), número de recambio (K_{cat}) y constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m)	26
5.16 Inhibición enzimática, determinación de la constante I_{50}	27
6. Resultados	29
6.1 Secuencias de los tres contigs que refieren a GSTs obtenidas del transcriptoma de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	29

6.2 Oligos y selección de las enzimas de restricción	37
6.3 Extracción de RNA y amplificación de los genes de TcGSTcontig02546, TcGSTcontig02741 y TcGSTcontig10408	38
6.4 Ligación de los genes de las TcGSTs en el plásmido pJET1.2, transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes Top 10 y TG1 y purificación de los plásmidos	40
6.5 Restricción de los genes TcGSTs y ligación de los insertos con restricción al plásmido pET23a(+)	42
6.6 Transformación de bacterias de expresión <i>E. coli</i> BL21 CodonPlus, pLysS y Origami con plásmidos pET23a(+)/TcGSTs y la purificación de estos plásmidos para su secuenciación	44
6.7 Secuencias obtenidas.....	46
6.8 Inducción de la expresión de las proteínas TcGSTcontig02546 y TcGSTcontig02741 por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y su purificación por medio de cromatografías de Sefarosa-IMAC	50
6.9 Cromatografía (Sefarosa-IMAC) para purificar las proteínas rTcGSTcontig02546 y rTcGSTcontig02741	53
6.10 Actividad enzimática en función del pH	54
6.11 Actividad enzimática en función de la temperatura.....	55
6.12 Caracterización cinética de las proteínas rTcGSTs, determinación de la Velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), Constante de afinidad (K_m), Número de recambio (K_{cat}) y Constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m).....	56
6.13 Cuadro comparativo de las GSTs en diferentes especies	60
6.14 Inhibición enzimática, determinación de la constante I_{50}	61
7. Discusión.....	64
8. Bibliografía	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de <i>Taenia crassiceps</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	5
Figura 3. Reacción catalizada por GST de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) con glutatión (GSH).	9
Figura 4. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente	10
Figura 5. Representación de gráfica Lineweaver-Burk, doble recíproca.....	11
Figura 6. Diagrama sobre la producción de proteínas recombinantes	13
Figura 1. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig02546 (Query) con la TsM_000741700 (Sbjct) de <i>T. solium</i>	33
Figura 2. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig02741 (Query) con la TsM_000610300 (Sbjct) de <i>T. solium</i>	34
Figura 3. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig10408 (Query) con la TsM_000610300 (Sbjct) de <i>T. solium</i>	35
Figura 4. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig02741 y TcGSTcontig10408 con una glutatión transferasa de <i>Echinococcus granulosus</i> (EGR_09218)	36
Figura 5. Mapa de restricción de los plásmidos pJET1.2/blunt y pET-23a(+).	37
Figura 12. RNAs totales de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed	38
Figura 13. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed mostrando productos de PCR de TcGSTcontig02741.....	39
Figura 14. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed mostrando productos de PCR de TcGSTcontig10408.....	40

Figura 15. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed para visualizar los resultados de PCR mostrando amplificadores de TcGSTcontig02546	40
Figura 16. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Amplificación del gen TcGSTcontig02546 mediante la técnica de PCR	41
Figura 17. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Amplificación del gen TcGSTcontig02741, mediante la técnica de PCR.	41
Figura 18. Gel de agarosa al 1.5% teñida con GelRed. Amplificación del gen TcGSTcontig10408, mediante la técnica de PCR.	42
Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Plásmido pJET1.2/TcGSTcontig02546 digerido con las enzimas de restricción NdeI y XhoI	43
Figura 20. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Plásmido pJET1.2/TcGSTcontig02741 digerido con las enzimas de restricción NdeI y NotI..	43
Figura 21. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Plásmido pJET1.2/TcGSTcontig10408 digerido con las enzimas de restricción NdeI y NotI	44
Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% teñida con GelRed. Amplificación del gen TcGSTcontig02546 mediante la técnica de PCR, a partir de colonias BL21 CodonPlus con el plásmido pET23a(+).	45
Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% teñida con GelRed. Amplificación del gen TcGSTcontig02741, mediante la técnica de PCR, a partir de colonias BL21 pLysS y BL21 CodonPlus con el plásmido pET23a(+).	45
Figura 24. Gel de agarosa al 1.5% teñida con GelRed. Amplificación del gen TcGSTcontig10408, mediante la técnica de PCR, a partir de colonias BL21 CodonPlus y BL21 pLysS con el plásmido pET23a(+).	46
Figura 25. Alineamiento comparativo de la secuencia de TcGSTcontig02546, la proteína rTcGSTcontig02546 (pET23a(+)/TcGSTcontig02546) y pJET/TcGSTcontig02546	47

Figura 26. Alineamiento comparativo de la secuencia de TcGSTcontig02741 y la proteína rTcGSTcontig02741 (pET23a+)/TcGSTcontig02741	48
Figura 27. Alineamiento comparativo de la secuencia de TcGSTcontig02741, TcGSTcontig10408 y la proteína rTcGSTcontig02741 (pET23a+)/TcGSTcontig02741 y rTcGSTcontig10408 (pET23a+)/TcGSTcontig10408).....	49
Figura 28. Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión de la TcGSTcontig02546 en bacterias BL21 CodonPlus.....	51
Figura 29. Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión de la TcGSTcontig02546 en bacterias Origami	52
Figura 30. Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión de la TcGSTcontig02741 en bacterias BL21 pLysS.....	52
Figura 31. Gráfica correspondiente a la purificación de rTcGSTcontig02546 por medio de un pulso de amortiguador de elución (Imidazol 500 mM)	53
Figura 32. Gráfica correspondiente a la purificación de rTcGSTcontig02741 por medio de un pulso de amortiguador de elución (Imidazol 500 mM).....	54
Figura 33. Efecto del pH sobre la velocidad de conjugación entre GSH y CDNB para rTcGSTcontig02741	55
Figura 34. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de conjugación entre GSH y CDNB para rTcGSTcontig02741	56
Figura 35. Comportamiento Michaeliano de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de GSH.	57
Figura 36. Diagrama de Lineweaver-Burk, obtenida de los valores recíprocos de la gráfica de Michaelis-Menten de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de GSH.....	58
Figura 37. Comportamiento Michaeliano de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de CDNB.....	58
Figura 38. Diagrama de Lineweaver-Burk, obtenida de los valores recíprocos de la gráfica de Michaelis-Menten de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de CDNB.	59

Figura 39. Porcentaje de actividad residual de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de bromosulfaleína y la I ₅₀ obtenida.....	62
Figura 40. Porcentaje de actividad residual de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de rosa de bengala y la I ₅₀ obtenida.....	62
Figura 41. Porcentaje de actividad residual de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de indometacina y la I ₅₀ obtenida.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Constantes catalíticas de las enzimas TcGST1 y TcGST2 purificadas por procedimientos bioquímicos de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	14
Cuadro 2. Condiciones de PCR	18
Cuadro 3. Amortiguadores con diferentes valores de pH.....	25
Cuadro 4. Concentraciones de sustratos utilizados para las determinaciones de las constantes catalíticas.....	27
Cuadro 5. Concentraciones de los inhibidores utilizados para las determinaciones de la I_{50}	28
Cuadro 6. Resultados de las constantes catalíticas de rTcGSTcontig02741	59
Cuadro 7. Constantes catalíticas de GSTs de distintas especies	60
Cuadro 8. pH y temperatura óptimos de GSTs de distintas especies.....	60

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BST	Bromosulfaleína
bp	Pares de bases
cDNA	DNA complementario
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
DCNB	1,2-Dichloro-4-nitrobenceno
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EC	Enzyme commission numbers
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GSH	Glutati3n
GST	Glutati3n transferasa
HCl	Ácido Clorhídrico
I ₅₀	Inhibici3n al 50%
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
K _{cat}	Constante catalítica o número de recambio
K _{cat} /K _m	Constante de especificidad
KDa	Kilodalton
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria Bertani

MAPEG	Proteínas <i>del</i> metabolismo de eicosanoides y glutatión <i>asociadas a membrana</i>
MCS	Sitio de clonación múltiple
μM	Micromol
mRNA	RNA mensajero
NCBI	National center for biotechnology information
nm	Nanómetro
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
PBS	Disolución amortiguadora de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	<i>Potencial de hidrógeno</i>
RNA	Ácido ribonucleico
S	<i>Sustrato</i>
TAE	Tris, acetato y EDTA
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
Tm	Temperatura de fusión
v_0	Velocidad inicial
$V_{\text{máx}}$	Velocidad máxima

GÓMEZ CASTREJÓN CINTHIA IVETTE. Expresión y caracterización cinética de diversas Glutación transferasas de las formas larvales de *Taenia crassiceps* identificadas en su transcriptoma (bajo la dirección de Agustín Plancarte Crespo).

Resumen

Se obtuvieron dos enzimas recombinantes (rTcGSTcontig02546, rTcGSTcontig02741) a partir del transcriptoma de *Taenia crassiceps* que corresponden a dos isoformas de glutación transferasas (GST) (EC 2.5.1.18), enzimas involucradas en la detoxificación celular de un amplio grupo de compuestos xenobióticos y endobióticos.

Las formas recombinantes se obtuvieron a partir del RNAm de los cisticercos, sus expresiones se realizaron en *Escherichia coli* cepas Codon Plus y Origami y sus purificaciones se llevaron a cabo empleando cromatografías de afinidad (IMAC-Sepharose 6 Fast Flow).

La enzima rTcGSTcontig02546 mostró actividad con los sustratos Glutación (GSH) y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), sin embargo es extremadamente inestable por lo que su caracterización cinética fue imposible.

Por su parte la caracterización cinética de la enzima rTcGSTcontig02741 mostró una: $V_{\text{máx}}_{(\text{CDNB})} = 1397 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, $K_{\text{m}}_{(\text{CDNB})} = 5.8 \times 10^{-4} \text{ M}$, $K_{\text{cat}}_{(\text{CDNB})} = 623 \text{ S}^{-1}$ y $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}_{(\text{CDNB})} = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.

Adicionalmente los valores catalíticos obtenidos con el co-sustrato GSH fueron: $V_{\text{máx}}_{(\text{GSH})} = 999 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, $K_{\text{m}}_{(\text{GSH})} = 2.4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $K_{\text{cat}}_{(\text{GSH})} = 446 \text{ S}^{-1}$ y $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}_{(\text{GSH})} = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$.

La temperatura óptima para el funcionamiento de la rTcGSTcontig02741 fue a 45°C y su pH óptimo de reacción de 8.5-9 a temperatura ambiente. Los valores de

inhibición de la actividad catalítica al 50% (I_{50}) para distintos inhibidores fueron: 2.1 μ M con rosa de bengala, 7.8 μ M con bromosulfaleína y 154 μ M con indometacina.

También se utilizó el TcGSTcontig10408 con la misma finalidad de obtener una proteína recombinante. Sin embargo, su secuencia de amino ácidos resultó ser idéntica a la obtenida con el rTcGSTcontig02741 y solamente lo amplificamos.

Estos datos confirman que en el transcriptoma de *T. crassiceps* los contig02741 y contig02546 corresponden a dos transferasas funcionales. La primera mostró variables catalíticas superiores a las correspondientes de sus pares nativos. La segunda expresó una proteína altamente inestable. Esto podría deberse a que 15 aminoácidos de su amino terminal no se expresaron. El utilizar el RNA de una cepa de *T. crassiceps* que no es el mismo que se utilizó para obtener el contig02546 podría explicar la inestabilidad proteica mencionada.

1. Introducción

1.1 *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps es un cestodo cuyas características morfológicas no se diferencian significativamente de las de otras taenias. (Willms y Zurabian, 2010)

La forma adulta es un gusano aplanado, segmentado de varias decenas de centímetros de longitud. El escólex presenta cuatro ventosas y un róstelo con corona de ganchos (Figura 1).

El cisticerco, la fase larvaria, presenta una estructura ovalada de varios milímetros de diámetro.

Los huevos de las Taenias son indistinguibles morfológicamente entre especies, éstos son redondos con un diámetro entre 31 y 43 μm y una membrana gruesa estriada de color café, dentro de cada huevo se encuentra una oncósfera embrionada con seis ganchos.

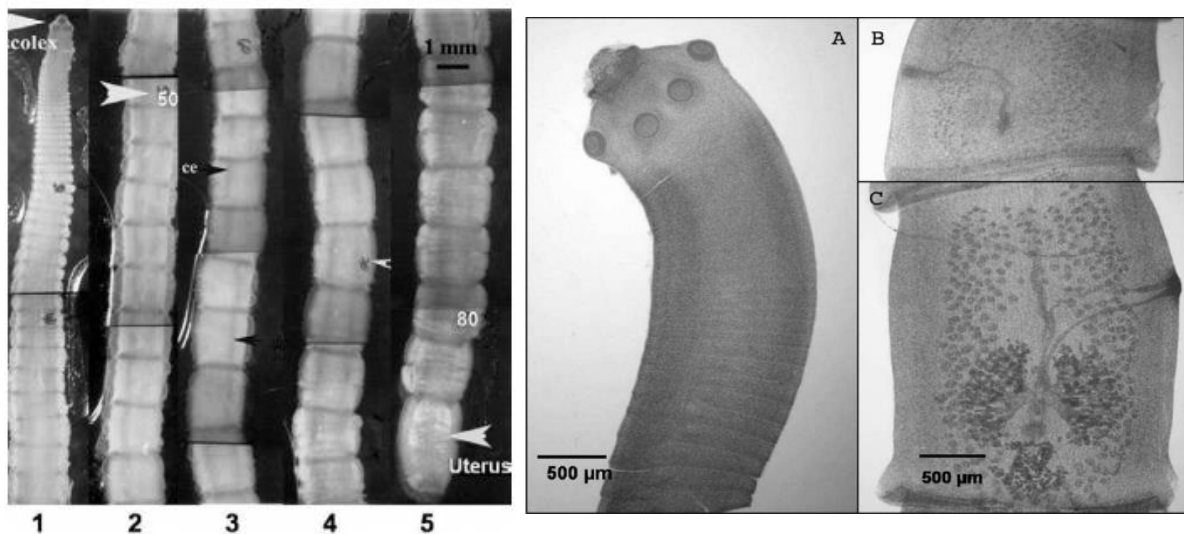


Figura 1. Micrografía de *Taenia crassiceps*. A la izquierda, segmentos de un gusano de *Taenia crassiceps* con 82 proglótidos de 34 días post-infección. A la derecha, gusano de *Taenia crassiceps* obtenido 30 días post-infección, A) Escólex y proglótidos iniciales, B) Proglótidos inmaduros y C) Proglótidos maduros (Willms y Zurabian, 2010)

1.1.1 Ciclo de vida de *T. crassiceps*

Los huéspedes definitivos de este cestodo son los carnívoros domésticos y silvestres del hemisferio norte como lobos, zorros, mapaches, perros y gatos, desarrollándose la forma adulta en su intestino delgado. Estos liberan los huevos del cestodo junto con las heces contaminando el medio ambiente. Los huevos son ingeridos por los huéspedes intermediarios que corresponden a roedores, los huevos atraviesan el epitelio intestinal, llegan al torrente sanguíneo y se establecen principalmente en el tejido subcutáneo, cavidad torácica y peritoneal (Willms y Zurabian, 2010) donde se desarrolla la forma larvaria llamada cisticerco o *Cysticercus longicollis*. El ciclo se cierra cuando los carnívoros ingieren a los roedores infectados. (Figura 2).

Artificialmente en el peritoneo de ratones, el cisticerco de *T. crassiceps* desarrolla también una forma de reproducción asexual porque tiene la habilidad de proliferar indefinidamente por gemación. Esta característica es utilizada por diversos investigadores como un modelo experimental (Mooney et al, 2000; Alić et al, 2017) permitiendo estudios relacionados con la respuesta inmune, endocrinológica, infectividad, farmacológica, enzimológica y la investigación en vacunas anticestodos (Willms y Zurabian, 2010; Sciutto et al, 2011; Almeida et al, 2014).

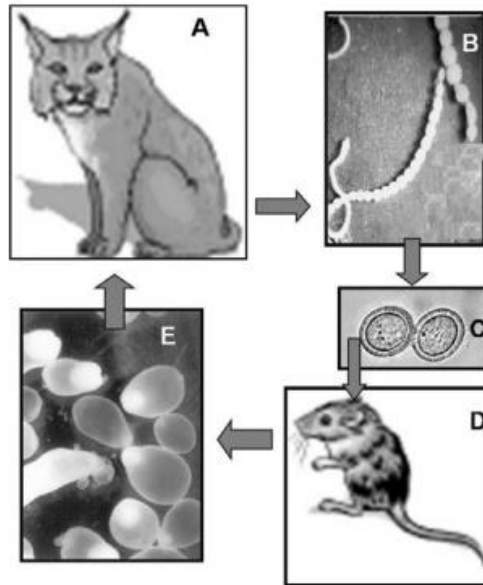


Figura 2. Ciclo de vida de *T. crassiceps*. A) Huésped definitivo. B) Gusano adulto que habita el intestino del huésped definitivo. C) Huevos infectantes que se liberan en las heces. D) El huésped intermediario consume huevos. E) La larva crece en el huésped intermediario y éste es ingerido por un carnívoro, en el que crece el gusano adulto en el duodeno (Willms y Zurabian, 2010).

1.2 *Taenia crassiceps* como modelo de investigación

Taenia crassiceps está ampliamente relacionada con *Taenia solium*, esta última siendo de gran importancia en salud pública debido a que es una zoonosis, siendo su presentación más peligrosa cuando los cisticercos se desarrollan en el cerebro humano, llegando a ser una enfermedad fatal (WHO, 2015). El cisticerco de *T. crassiceps* ha sido utilizado también para estudiar la respuesta inmune del humano, por ser una fuente de antígenos para detectar anticuerpos anticisticerco en pruebas inmunológicas para *T. solium* debido a la alta reacción cruzada que hay entre los dos (Sciutto et al, 2013).

La ventaja del uso de *T. crassiceps*, en comparación con *T. solium*, es la casi nula probabilidad de infección de los humanos, además de la abundancia de materia prima antigénica que se puede obtener de ellos por su capacidad de reproducción asexual.

1.3 Enzimas

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas.

Las enzimas se dividen en seis clases principales, cada una de las cuales se divide a su vez en subclases, de acuerdo con el tipo de reacción catalizada, las clases son: óxido-reductasas (reacciones de óxido-reducción), transferasas (transferencia de grupos funcionales), hidrolasas (reacciones de hidrólisis), liasas (adición a los dobles enlaces), isomerasas (reacciones de isomerización) y ligasas (formación de enlaces de escisión del ATP).

Cada enzima es designada por un nombre recomendado de uso habitual, un nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza y por un número de clasificación para precisar la identificación inequívoca de la enzima, conocido como número EC (enzyme commission numbers).

El número EC clasifica a las enzimas con base en las reacciones químicas que catalizan, cada código de enzimas consiste en las dos letras EC seguidas por 4 números separados por puntos. Estos números representan una clasificación progresivamente más específica. El primer número corresponde a las clases de las enzimas, en el caso de las glutatión transferasas es EC 2.5.1.18, el primer número corresponde al 2 (EC 2.5.1.18), es decir enzimas con actividad de transferasas.

1.3.1 Enzimas detoxificantes

Los organismos están expuestos a una amplia cantidad de xenobióticos, desde toxinas ambientales hasta fármacos y por ello los organismos han desarrollado complejos mecanismos enzimáticos que detoxifican estas sustancias, entre los cuales participan las enzimas glutatión tranferasas.

1.3.2 Glutación transferasas (GSTs)

Las glutación transferasas (EC 2.5.1.18) (GSTs) son una superfamilia de proteínas multifuncionales con papeles fundamentales en la detoxificación celular de un amplio grupo de compuestos xenobióticos y endobióticos.

Su principal función química es catalizar la conjugación del tripéptido glutación (GSH: γ -Glu-Cis-Gli) con compuestos que contienen un centro electrofílico para formar derivados peptídicos no tóxicos y más solubles listos para ser excretados o compartimentalizados por enzimas de la fase III de detoxificación (Coleman et al., 1997). Adicionalmente, las GSTs actúan como peroxidasas, isomerasas, tioltransferasas (Jensson et al., 1986; Bartling et al., 1993; Fernández-Cañón y Peñalva, 1998; Board et al., 2000) y ligandinas, esto último en ausencia de su función catalítica (Smith et al., 2003; Axarli et al., 2004; Plancarte et al., 2014).

Las GSTs están agrupadas en tres familias: citosólicas, mitocondriales y las microsomales también llamadas proteínas del metabolismo de eicosanoides y glutación asociadas a membrana (MAPEG), cada familia está subdividida en clases y dentro de cada clase pueden haber diferentes isoformas.

La familia más estudiada es las de GSTs citosólicas, las cuales se subdividen con base en su secuencia de aminoácidos en al menos 10 clases (Alpha, Beta, Delta, Epsilon, Mu, Pi, Teta, Sigma, Zeta y Omega). Entre clases el grado de homogeneidad de la secuencia de aminoácidos es cerca del 25%, mientras que dentro de cada clase el grado de homogeneidad entre las isoformas ronda entre el 40%.

La mayoría de estas enzimas presentan un plegamiento similar y suelen formar dímeros con subunidades iguales, cada subunidad de aproximadamente 25 kDa tiene un sitio de unión al GSH (sitio G) y un sitio de unión para sustratos hidrofóbicos (sitio H). En general el dominio N terminal comprende al sitio G, esto es común entre las distintas clases, mientras que el dominio C terminal que forma parte del sitio H es más divergente (Wongsantichon et al., 2003).

1.4 Glutación (GSH)

El glutación (γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, es el principal antioxidante de las células (Meister y Anderson, 1983).

El glutación actúa como un nucleófilo celular (reacciona cediendo un par de electrones) a través del grupo tiol de su residuo de cisteína, reduciendo al sustrato electrofílico.

El producto final puede ser excretado como un conjugado con el glutación o un derivado hidrolizado a un S-(sustituyente)-cisteína, estos derivados de cisteína pueden subsecuentemente ser N-acetilados para producir un ácido mercaptúrico, el cual es un producto clásico de excreción de xenobióticos. Alternativamente también puede hacerse un glucurono-conjugado con el grupo tiol o una metilación del grupo tiol y estos derivados ser producto de excreción.

El glutación puede reaccionar espontáneamente o por medio de una reacción catalizada por la enzima glutación-s-transferasa que conjuga al glutación con los xenobióticos electrofílicos (Coleman et al, 1997).

El 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) es un sustrato universal para varias GSTs utilizado en los ensayos enzimáticos, en la Figura 3 se puede ver la reacción catalizada por una GST utilizando el glutación y el CDNB como sustratos (Adedolapo et al, 2014).

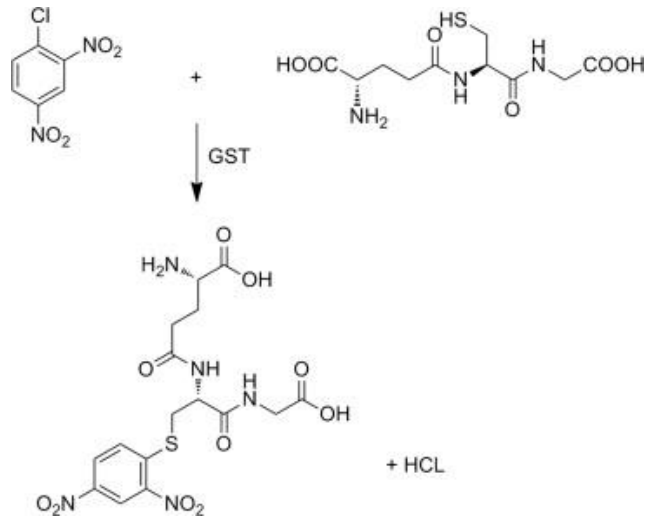


Figura 3. Reacción catalizada por GST de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) con glutati6n (GSH), formando S-2,4-dinitrofenilglutati6n + 6cido clorh6drico (HCl).

1.5 Cin6tica enzim6tica. Ecuaci6n de Michaelis-Menten.

Las enzimas no alost6ricas presentan la caracter6stica de saturaci6n con el sustrato, en la Figura 4 se ve el efecto de la concentraci6n del sustrato sobre la velocidad de la reacci6n catalizada por una enzima. A una baja concentraci6n de sustrato, la velocidad inicial de la reacci6n v_0 es casi proporcional a la concentraci6n del sustrato, a medida que la concentraci6n del sustrato aumenta la velocidad inicial de la reacci6n disminuye y deja de ser aproximadamente proporcional a la concentraci6n de sustrato.

Con un aumento posterior de la concentraci6n de sustrato, la velocidad de la reacci6n llega a ser independiente de la concentraci6n de sustrato y se aproxima asint6ticamente a una velocidad constante, en este punto la reacci6n es esencialmente de orden cero con respecto al sustrato y es donde la enzima se encuentra saturada de sustrato.

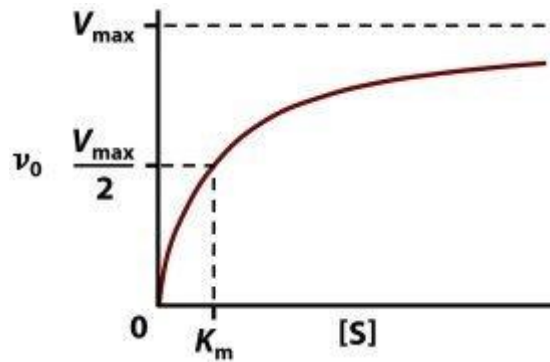


Figura 4. Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.

La ecuación de Michaelis-Menten expresa la relación matemática entre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima y la concentración del sustrato.

La $V_{m\acute{a}x}$ corresponde a la velocidad inicial máxima, cuando la enzima se halla saturada.

La constante de Michaelis-Menten (K_m) es igual a la concentración de sustrato en la que la velocidad inicial de la reacción es la mitad de la velocidad máxima.

Para obtener estos valores se hace una serie de experimentos en los que la velocidad inicial de la reacción se mide a diferentes concentraciones iniciales de sustrato con una concentración de enzima constante.

La ecuación de Michaelis-Menten puede transformarse algebraicamente tomando los recíprocos de los miembros de la ecuación de Michaelis-Menten ($1/v_0$, $1/[S]$) por medio de la ecuación de Lineweaver-Burk, se obtiene una línea recta, Figura 5.

La pendiente de la recta es $K_m/V_{m\acute{a}x}$ y la intersección sobre el eje $1/v_0$ es $V_{m\acute{a}x}$, y la intersección sobre el eje $1/[S]$ es $-1/K_m$.

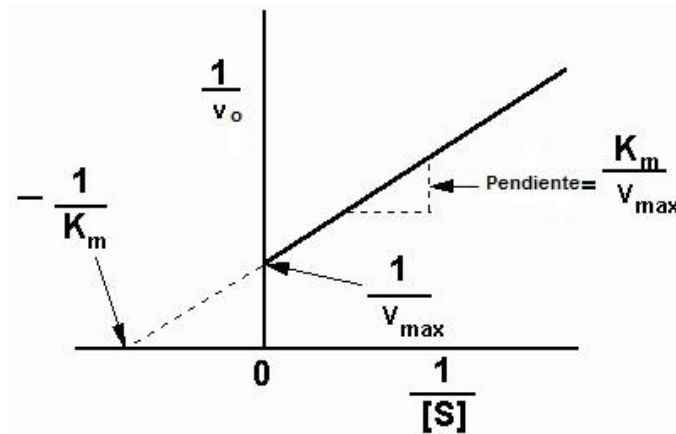


Figura 5. Representación de gráfica Lineweaver-Burk, doble recíproca.

1.6 Efecto del pH sobre la actividad enzimática

La mayoría de las enzimas poseen un pH característico al cual su actividad es máxima, por encima o por debajo de ese pH la actividad disminuye.

El pH óptimo de una enzima no es necesariamente idéntico al de su entorno intracelular normal.

1.7 Efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas

Existe un intervalo de temperatura en el que las enzimas se mantienen estables y activas, generalmente la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas incrementan con la temperatura, al sobrepasar la temperatura a cierto punto las enzimas se desnaturalizan por el calor y se inactivan formándose así un pico en las gráficas del efecto de la temperatura sobre la actividad de una enzima.

1.8 Inhibición enzimática, I_{50}

En la inhibición enzimática se utilizan inhibidores los cuales disminuyen la velocidad de reacción catalítica.

En general existen distintos tipos de inhibición según la interacción que exista entre la enzima y el inhibidor, teniendo entonces la inhibición competitiva, inhibición no competitiva e inhibición acompetitiva.

Una forma de dar resultados de la inhibición es por medio de la I_{50} que se define como la concentración del inhibidor que produce una inhibición de la actividad enzimática del 50%.

1.9 Producción de proteínas recombinantes

La tecnología del DNA recombinante es la técnica que permite producir DNA por métodos artificiales, permitiendo así la producción de una amplia cantidad de péptidos, proteínas y biomoléculas de células que no se producen naturalmente.

La producción de proteínas recombinantes es crucial para el desarrollo de nuevos fármacos, alcanzando aproximadamente el 30% de los productos farmacéuticos disponibles en el mercado.

Para la producción de proteínas recombinantes que no requieren ser glicosadas o que no requieran una alta cantidad de cambios postraduccionales son comúnmente utilizadas las bacterias ya que tienen un crecimiento rápido y de alta calidad.

El proceso para producir una proteína recombinante comienza con la obtención del gen que codifica a la proteína en cuestión sin intrones. Éste es insertado en el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector de expresión (plásmidos) bajo el control de un promotor que regula la expresión del gen. El plásmido vector es introducido en una cepa de *E. coli* (transformación bacteriana), capaz de producir proteínas recombinantes. Las bacterias transformadas se cultivan en medio líquido y posteriormente en una etapa específica de crecimiento, la transcripción de proteína recombinante es inducida químicamente al activar al operón lac presente en el vector de expresión.

Por lo tanto, el gen recombinante se expresa y la cadena polipeptídica recombinante se pliega en la proteína recombinante de interés. La proteína recombinante puede luego liberarse de la célula, capturarse y purificarse (Overton, 2014) (Figura 6).

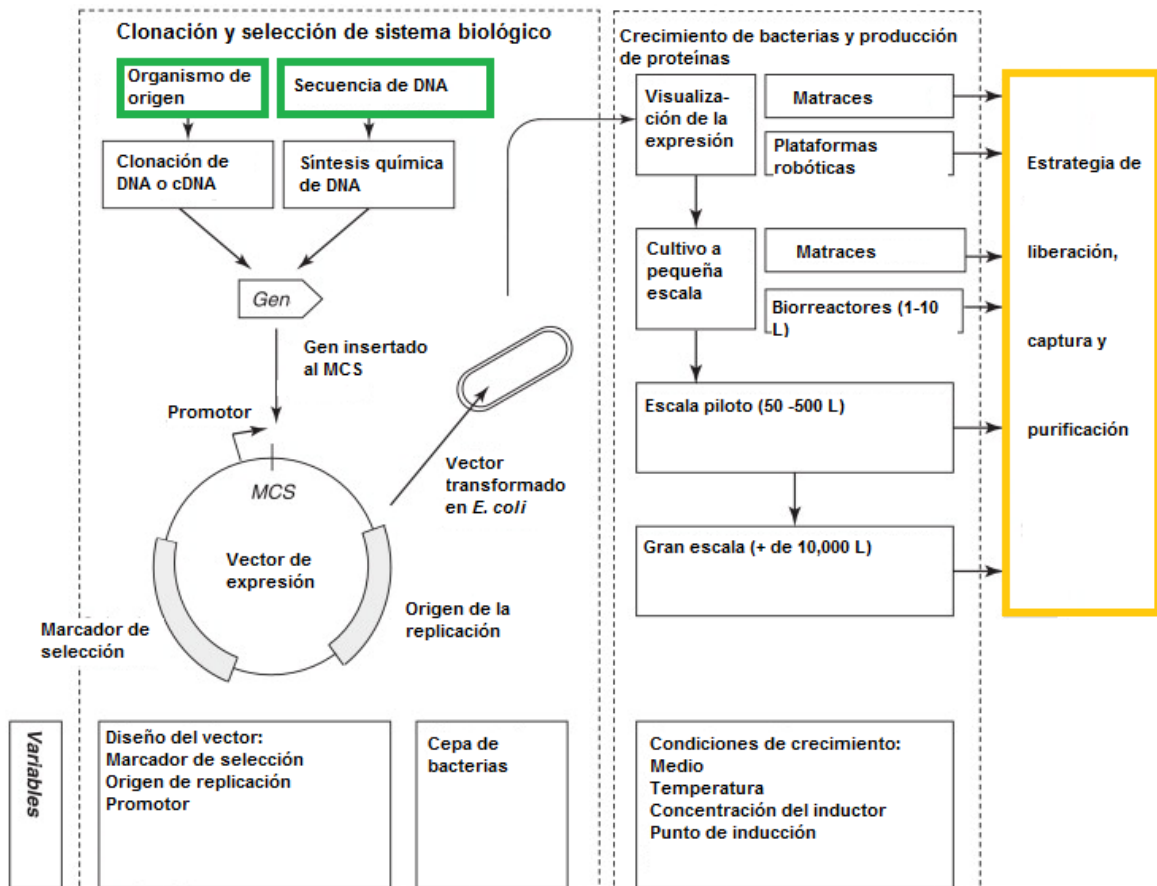


Figura 6. Diagrama sobre la producción de proteínas recombinantes

1.10 GST en *Taenia crassiceps*

Hasta el momento existen solamente dos publicaciones relacionadas con las GSTs en el cestodo de *T. crassiceps* (García-Montoya et al, 2018; Maldonado et al, 2017). En esta última, se informa sobre la purificación por procedimientos bioquímicos y caracterizaron catalítica de dos isoformas de GSTs (TcGST1; TcGST2) (Cuadro 1).

De las secuencias de los péptidos obtenidas correspondientes al 30% de cobertura de una GST de *Taenia solium* (GenBank: AAM64045.1), estas enzimas difieren entre sí por cinco aminoácidos de su secuencia primaria y por la caracterización bioquímica y cinética realizada, se determinó la presencia de dos GSTs citosólicas en los tejidos de los cisticercos de *T. crassiceps*. El estudio de García-Montoya *et al*, informa de la existencia de tres contigs relacionados con GSTs en el transcriptoma de *T. crassiceps*. Cabe mencionar que el transcriptoma se refiere al RNA mensajero (mRNA) del conjunto genes que, por lo general, se expresan en una célula en un momento dado.

Cuadro 1. Constantes catalíticas de las enzimas TcGST1 y TcGST2 purificadas por procedimientos bioquímicos de cisticercos de *T. crassiceps*

	TcGST1	TcGST2
$V_{\text{máx}}$	149 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para CDNB 23 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para GSH	4.7 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para CDNB 7.06 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para GSH
Km	0.86 mM para CDNB 0.55 mM para GSH	1.03 mM para CDNB 0.3 mM para GSH
Kcat	62.46 S^{-1} para CDNB 11.61 S^{-1} para GSH	1.97 S^{-1} para CDNB 32.3 S^{-1} para GSH
Kcat/Km	$7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ para CDNB $1.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ para GSH	$1.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ para CDNB $9.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ para GSH
pH óptimo	8.5	7.5
Temperatura óptima	20–55°C	35–40°C

2. Justificación

Es necesario conocer el número total de GSTs presentes en *T. crassiceps* para establecer la relevancia de este sistema multifuncional de transferasas en este organismo. Por medio de estudios de biología molecular se sabe de la existencia de tres potenciales isoformas y por procedimientos bioquímicos de purificación de proteínas se conocen dos.

3. Hipótesis

En el transcriptoma de *T. crassiceps* existen tres contigs relacionados con genes de GSTs, si se originan tres proteínas recombinantes utilizando sus secuencias se mostrará la existencia de hasta tres isoformas de GSTs en este cestodo.

4. Objetivo

Clonar, expresar y caracterizar catalíticamente a tres isoformas de GSTs de *T. crassiceps* utilizando las secuencias de los tres contigs descritos en su transcriptoma.

5. Material y métodos

5.1 Obtención de la secuencia genómica de las enzimas GSTs en el transcriptoma de *T. crassiceps* y diseño de oligos

Las secuencias de los tres contigs que refieren a GSTs en el transcriptoma de cisticercos de *T. crassiceps* fueron amablemente proporcionadas por el doctor Juan F. Alzate (comunicación personal, 2017) de la Universidad de Antioquia, Colombia y se les asignó como identificación el número correspondiente al contig original: TcGSTcontig02546, TcGSTcontig02741 y TcGSTcontig10408.

Utilizando la herramienta bioinformática: <http://web.expasy.org/translate/> se analizaron las secuencias de tres contigs de las TcGSTs en función de que mostraran un marco de lectura abierto; es decir, que presenten el codón de inicio (ATG) y algún codón de termino (TGA, TAA o TAG) y que éstos codones de termino no se encuentren en posiciones intermedias de la secuencias, sugiriendo la obtención de proteínas recombinantes con un peso molecular característico de las

GSTs (23- 27 KDa) (<https://web.expasy.org/protparam/>) y que presentaran los dominios conservados de la familia de las GSTs con la finalidad de obtener las proteínas funcionales.

Adicionalmente, las secuencias de los contigs se analizaron en el programa BLAST del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con la finalidad de observar la homología e identidad con otras GSTs.

Para llevar a cabo el diseño de los oligos se analizaron las secuencias de los contigs con el programa Webcutter 2.0 para determinar qué enzimas de restricción no reconocieran sitios de corte en las secuencias. El plásmido de expresión utilizado fue el pET-23a (Novagen), el cual en su región de clonación/expresión se encuentran, los sitios de reconocimiento de las enzimas NdeI, NotI y XhoI, las cuales fueran empleadas para el diseño de los oligos. Los oligos diseñados se analizaron con el programa Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) para corroborar que éstos se alineen perfectamente sin formar giros ni apareamientos entre sí mismos y para obtener su temperatura de alineamiento (TM).

5.2 Extracción del ácido ribonucleico (RNA) de cisticercos de *T. crassiceps*

Se maceraron ocho cisticercos frescos de *T. crassiceps* cepa WFU con escólex en 0.5 ml de reactivo TRIzol® en hielo seco empleando material estéril. La mezcla se centrifugó durante 3 minutos a 13,000 g a una temperatura de 4°C. Al sobrenadante se le agregó 220 µL de cloroformo, agitó en vórtex durante 30 segundos e incubó por 5 minutos en hielo y centrifugó por 15 minutos a 10,000 g a 4°C. El RNA se obtuvo de la fase acuosa y se le agregó 0.6 ml de isopropanol. Inmediatamente se agitó manualmente 50 veces e incubó por una hora a -70°C. Ya descongelado el RNA se centrifugó por 15 minutos a 13000 g a 4°C. El sobrenadante se descartó y al precipitado se le añadió 0.3 ml de etanol al 80% en H₂O con dietilpirocarbonato

(DEPC) al 0.1%, se agitó suavemente y se centrifugó por 5 minutos a 13000 g a 4°C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar 5 minutos, finalmente se resuspendió en 40 µL de H₂O DEPC (0.1%).

El RNA purificado se cuantificó en un espectrofotómetro de absorción NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific) y se analizó en un gel de agarosa al 1.5% con GelRed al 0.001%, con la finalidad de observar su integridad.

5.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA totales

En la síntesis de cDNA a partir del previamente obtenido RNA de los cisticercos de *T. crassiceps* se utilizó el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo scientific siguiendo las especificaciones del proveedor. Quinientos ng de RNA ,1 µl de oligo dT y agua libre de nucleasas en un volumen final de 13 µl se incubaron a 65 °C por 5 minutos. Posteriormente la mezcla se pasó a hielo y se homogenizó utilizando un vórtex durante 5 segundos, seguido a eso se añadieron 4µl de amortiguador 5x, 1 µl de inhibidores de RNAsas, 1 µl de 10 mM dNTPs y 1 µl de la enzima retrotranscriptasa obteniendo un volumen total de 20 µl, éste se homogenizó e incubó a 42°C por una hora e inactivó a 70 °C por 5 minutos.

5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)


Se realizaron reacciones de PCR para cada uno de los contigs de las GSTs, usando como templado el cDNA sintetizado a partir de mRNA totales y los oligos diseñados específicamente para cada uno de ellos. Las temperaturas y tiempos empleados en el proceso de amplificación se describen en el cuadro 2.

Los productos amplificados se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5% con Gel Red™ (BIOTIUM). Se cortaron las bandas amplificadas de aproximadamente 600 pb. Los DNAs se purificaron utilizando un kit de extracción

(GeneJET gel extraction kit de Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor y se cuantificaron y analizaron su pureza espectrofotométricamente en NanoDrop™ 2000.

Cuadro 2. Condiciones de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	3 minutos
2	94 °C	30 segundos
3	TM	30 segundos
4	72 °C	1 minuto
5	72 °C	5 minutos
6	12°C	

 X 34 ciclos

5.5 Construcción de los plásmidos pJET1.2/TcGSTs

El DNA purificado de cada uno de los productos obtenidos por PCR se ligó en el plásmido de clonación pJET1.2 /blunt empleando el kit CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific).

5.6 Transformación de bacterias *E. coli* competentes Top 10 y TG1

Para cada ligación de pJET1.2 con cada uno de los genes de TcGST se utilizó una alícuota de bacterias *E. coli* competentes Top 10 (One Shot™ Top10, ThermoFisher) y otra de TG1 (Mix & GoCompetentCells – Strain TG1, Ecogen Biología Molecular), cada una con 100 µl de bacterias. Las bacterias se descongelaron en hielo, se les añadió 10 µl de la ligación pJET1.2/TcGST y se incubaron por 30 minutos en hielo. Después se prosiguió a darles un choque térmico por 40 segundos a 42°C en un thermoblock (digital block heater, select bioproducts), se pasaron a hielo por dos minutos, y posteriormente el contenido se pasó a un tubo eppendorf estéril con 1 ml de medio de cultivo estéril LB y 0.2 mg de ampicilina. Inmediatamente se agitaron a 300 rpm en un agitador orbital (Talboys,

Professional incubating orbital mini shaker) a una temperatura de 37°C por 1 hora, en seguida se centrifugaron a 2500 g por 5 minutos, se resuspendieron en 200 µl de LB y las bacterias se sembraron en una caja de cultivo conteniendo LB al 1% de agar en presencia de ampicilina [0.2 mg/ml] dejando crecer las bacterias por 16 horas a 37°C.

5.7 Selección de colonias positivas a los genes de TcGST y purificación de los plásmidos

De las colonias crecidas se seleccionaron cuatro de cada caja, las cuales se escogieron por ser las más aisladas y definidas. Éstas se crecieron en un tubo de vidrio conteniendo 1 ml de medio de cultivo estéril LB con 0.2 mg de ampicilina. Los tubos se colocaron en un agitador orbital a 300 rpm a 37°C hasta alcanzar el cultivo un valor de absorbancia de ~ 0.4 – 0.6 a 600 nm. Se tomaron 2µl de este cultivo para analizar si éstas colonias insertaron a cada uno de los genes de las diferentes TcGSTs mediante la técnica de PCR más los oligos diseñados específicamente. Los productos del PCR se visualizaron por medio de una separación electroforética en geles de agarosa al 1.5% teñido con GelRed en amortiguador TAE e incidiendo luz UV en ellos.

Dos de los tubos con las colonias que amplificaron a cada uno de los genes de las TcGSTs se les agregó más medio de cultivo LB con ampicilina (0.2 mg/ ml) hasta un volumen final de 10 ml y se incubaron durante 16 horas a 37°C agitándose a 300 rpm.

Transcurrido ese tiempo se recuperaron las bacterias por centrifugación a 2500 g por 10 minutos y se extrajeron los plásmidos correspondientes con los insertos TcGSTs mediante un kit de extracción (GeneJET plasmid miniprep Thermo scientific) siguiendo los pasos recomendados por el fabricante hasta la elución, la cual se realizó en dos ocasiones utilizando 30 µl de amortiguador de elución. El material genético obtenido se cuantificó y analizó su pureza espectrofotométricamente utilizando el equipo NanoDrop™ 2000.

Los plásmidos purificados se mandaron a secuenciar al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, los resultados obtenidos se analizaron empleando el programa BLAST del NCBI para confirmar que los genes correspondiesen a las TcGSTs correspondientes.

5.8 Restricción de los genes TcGSTs, ligación al plásmido pET23a(+) de los insertos con restricción y transformación del producto de ligación en células *E. coli* competentes Top 10.

Los plásmidos contruidos pJET1.2/TcGSTs se incubaron durante 18 horas a 37°C en presencia de las enzimas de restricción, con la finalidad de liberar los genes de TcGSTs del plásmido de clonación y poder ligarlos al plásmido de expresión pET23a(+), Novagen. Las enzimas empleadas para la TcGSTcontig02546 fueron NdeI y XhoI, las NdeI y NotI para las TcGSTcontig02741 y TcGSTcontig10408; así mismo se realizaron las mismas combinaciones de restricciones al plásmido pET23a(+). El resultado de la restricción se analizó por medio de un corrimiento electroforético de las muestras en gel de agarosa al 1.5% teñido con Gel Red™ en amortiguador TAE e incidiendo luz UV en el gel.

Los genes TcGSTs liberados y el pET23a(+) linealizado por el proceso de restricción se purificaron con el kit GeneJET Extraction (Thermo scientific) utilizando las indicaciones del proveedor. El ADN purificado se cuantifico en NanoDrop™ 2000.

Se realizaron ligaciones de cada uno de los genes TcGST utilizando 200 ng de ellos provenientes de la restricción, más 66 ng de plásmido pET23a(+) el cual previamente se sometió a restricción. Se utilizó el amortiguador del kit de ligación en presencia de T4 DNA ligasa (New England Biolabs), en un volumen final de 20 µl durante 16 horas a 16 °C y un periodo de inactivación de 10 minutos a 65 °C.

Se descongelaron bacterias *E. coli* competentes Top 10 durante 10 minutos en hielo, se les añadió 10 µl del producto de la ligación de cada una de las TcGST con

el plásmido pET23a(+). Posteriormente se homogenizaron suavemente e incubaron en hielo durante 30 minutos, inmediatamente las células se sometieron a un choque térmico por 40 segundos a 42°C, después se pusieron en hielo durante 2 minutos y se les agregó 1 ml de medio de cultivo LB estéril. Se agitaron a 300 rpm durante 1 hora a 37 °C, al término de la incubación se centrifugaron las células a 2500 g por 5 minutos, se resuspendieron en 200 µl de LB y éstas se sembraron en una caja de cultivo con medio LB y agar al 1.5% en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml dejando crecer las bacterias por 16 horas a 37°C.

5.9 Selección de bacterias positivas a los genes TcGSTs, purificación de los plásmidos construidos y transformación en bacterias de expresión *E. coli*

De cada una de las cajas sembradas, se seleccionaron 4 colonias al azar. Cada una de ellas crecieron en 1 ml de LB/ampicilina [0.2 mg/ml] hasta que alcanzaron una absorbancia ~ 0.4 – 0.6 a 600 nm, momento en el que se tomaron 2 µl de cada cultivo para llevar a cabo reacciones de PCR a cada una de las GSTs con sus oligos específicos. Los productos obtenidos se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5% con GelRed™. Las colonias que se determinaron positivas a TcGSTs mediante PCR, se cultivaron en 10 ml de LB/ampicilina y se dejaron incubar durante 16 horas a 37°C y 300 rpm.

Transcurrido ese tiempo, se recuperaron las bacterias por centrifugación a 2500 g por 10 minutos y se les extrajeron los plásmidos correspondientes con los insertos TcGSTs mediante un kit de extracción (GeneJET plasmid miniprep Thermo scientific) bajo las recomendaciones del fabricante hasta el paso de elución, el cual se realizó en dos ocasiones utilizando 30 µl de amortiguador de elución. El material genético obtenido se cuantificó y analizó su pureza espectrofotométricamente con un NanoDrop™ 2000.

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 CodonPlus (Agilent Technologies), BL21(DE3) pLysS (Promega) y Origami™ B(DE3) (Novagen) (100 µl) con los diferentes plásmidos purificados (pET23a+)/TcGST), mediante choque térmico a 42°C por 40 segundos, inmediatamente después se pusieron en hielo durante 2 minutos y se les agregó 1 ml de medio de cultivo estéril de LB y se agitaron a 300 rpm durante 1 hora a 37 °C, al término de la incubación se centrifugaron las células a 2500 g por 5 minutos, se resuspendieron en 200 µl de LB y se sembraron las células en cajas de cultivo LB al 1.5% de agar en presencia de ampicilina 0.2 mg/ml y cloranfenicol 0.034 mg/ml para las bacterias BL21 CodonPlus y BL21 pLysS y 0.2 mg/ml de ampicilina, 0.034 mg/ml de cloranfenicol, 0.015 mg/ml de kanamicina y 0.0125 mg/ml de tetraciclina para las bacterias Origami, se incubaron a 37°C 16 horas.

Se seleccionaron cuatro de las colonias que crecieron de cada uno de los cultivos con las diferentes TcGST, se incubaron en medio de cultivo estéril LB en presencia de sus correspondientes antibióticos a 300 rpm a 37°C hasta alcanzar un valor de absorbancia de ~ 0.4 – 0.6 a 600 nm. Posteriormente se realizó un PCR con las condiciones descritas anteriormente con la finalidad de observar si las células tenían el inserto. Para este fin, se tomaron 2 µl del cultivo para este paso, el producto de PCR se analizó al separarlo electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% embebido en GelRed y amortiguador TAE e incidiendo luz UV.

Para la purificación del plásmido, las colonias positivas de los genes TcGST se incubaron en tubos conteniendo 10 ml de medio de cultivo estéril LB en presencia de sus respectivos antibióticos, los tubos se colocaron en el agitador a 300 rpm a 37 °C por 16 horas.

Transcurrido ese tiempo se recuperaron las bacterias por centrifugación a 2500 g por 10 minutos y se les extrajeron los plásmidos correspondientes con los insertos TcGSTs mediante un kit de extracción (GeneJET plasmid miniprep Thermo scientific) se siguieron los pasos recomendados por el fabricante hasta la elución, la cual se realizó en dos ocasiones utilizando 30 µl de amortiguador de elución. El material genético obtenido se cuantificó y analizó su pureza

espectrofotométricamente con un nanoDrop 2000 de Thermo scientific y se envió a secuenciar al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

5.10 Inducción de las proteínas TcGSTs con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)

De las colonias positivas se eligió una de cada gen y se incubaron a 37°C en tubos con 5 ml de medio de cultivo LB estéril, más antibióticos respectivos al tipo de bacterias. Las bacterias se mantuvieron en agitación a 300 rpm hasta alcanzar un valor de absorbancia de ~ 0.4 – 0.6 a 600 nm. Posteriormente se tomaron 2 ml como tiempo 0 (bacterias sin inducir) y al resto se les añadió IPTG 1mM para inducir la expresión de proteínas por 16 horas.

Las bacterias inducidas se recuperaron por centrifugación a 2500 g por 20 minutos a 4 °C, la pastilla formada se resuspendió en 0.1 ml de PBS. Posteriormente se rompieron las bacterias por el método físico de sonicación, se centrifugaron a 13000 g para obtener una fracción soluble y una fracción insoluble. Se evaluó la expresión de la proteína por métodos electroforéticos en geles de acrilamida al 15% PAGE-SDS.

5.11 Cromatografía Sefarosa-IMAC para purificar las r-TcGSTs

Para el proceso de purificación de las recombinantes se realizó un cultivo de 200-500 ml de LB y antibióticos específicos para cada recombinante. Este cultivo bacteriano se mantuvo en agitación constante a 300 rpm a 37°C hasta alcanzar un valor de absorbancia de ~ 0.4 – 0.6 a 600 nm. Inmediatamente después cada cultivo se indujo con IPTG a concentración de 1 mM durante 16 horas. Las bacterias inducidas se recuperaron por centrifugación a 2500 g por 20 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 4 ml de amortiguador de equilibrio, compuesto por Imidazol 20 mM, NaCl 0.5 M y NaH₂PO₄ 20 mM a pH de 7.4. Las bacterias se

fraccionaron por medio de sonicación y centrifugaron a 13000 g por 10 minutos obteniendo un sobrenadante y precipitado.

El sobrenadante se cromatografió en una columna (1cm x 5 cm) que contenía 3 ml de IMAC Sepharose 6 Fast Flow, a un flujo de 0.5 ml/min. Después de ingresar toda la muestra en la columna, ésta se lavó con 20 ml de amortiguador de equilibrio hasta obtener valores de absorbancia de cero a 280 nm. Posteriormente, las proteínas recombinantes se eluyeron usando un amortiguador de elución de NaH₂PO₄ 20 mM, imidazol 500 mM y NaCl 0.5 M a pH 7.4. Las proteínas eluidas se obtuvieron en fracciones de 1 ml las cuales fueron evaluadas espectrofotométricamente para determinar la cantidad de proteína a una absorbancia de 280 nm.

Adicionalmente, se evaluó el proceso de purificación por métodos electroforéticos en geles de acrilamida 15% (PAGE-SDS).

5.12 Ensayos enzimáticos de las enzimas r-TcGSTs

Para evaluar de la actividad enzimática de las r-TcGSTs se utilizó el método de Habig y col (1974). Para este fin se empleó el co-sustrato glutatión reducido (GSH) a 3 mM para la proteína r-TcGSTcontig02546 y 1 mM para la proteína rTcGSTcontig02741 y el sustrato artificial 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 1mM en amortiguador de ensayo, compuesto por K₂HPO₄ a 100 mM, EDTA 1 mM a pH de 6.5.

Cada reacción utilizó 2.4 µg de la proteína rTcGSTcontig02741, sustrato GSH, amortiguador de ensayo en un volumen final de 1 ml. Para iniciar la catálisis enzimática se agregó el CDNB a la mezcla de reacción y se determinó el cambio de absorbancia a 340 nm durante 3 minutos utilizando un espectrofotómetro Amersham Biosciences Ultrospec 3100 pro.

Se llevaron a cabo ensayos enzimáticos empleando los compuestos 1,2-Dichloro-4-nitrobenzeno (DCNB) y bromosulfaleína (BST) en presencia de GSH 1 mM con

la finalidad de observar si dichos compuestos son sustratos de la r-TcGSTcontig02546.

Por cada reacción catalítica experimental se realizó un control negativo el cual incluyó todos los reactivos excepto la enzima, los valores de absorbancia de éstos se restaron a los valores obtenidos con la enzima.

5.13 Actividad enzimática en función del pH

Para obtener el valor del pH óptimo de reacción de las enzimas r-TcGSTs se prosiguió a realizar ensayos enzimáticos como los previamente descritos utilizando amortiguadores de ensayo con diferentes pHs (Cuadro 3).

Cuadro 3. Amortiguadores con diferentes valores de pH.

Amortiguadores de ensayo	Ajuste de pH
Citrato de sodio 50 mM Ácido cítrico 50 mM	4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0
Fosfato de sodio monobásico 50 mM Fosfato de sodio dibásico 50 mM	6.5, 7.0, 7.5 y 8.0
Tris 50 mM HCl	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5 y 12.0

5.14 Actividad enzimática en función de la temperatura

Para evaluar la estabilidad de las enzimas r-TcGSTs en función de la temperatura se prosigió a realizar ensayos enzimáticos como los descritos en el apartado “Ensayos enzimáticos de las enzimas rTcGST” con la diferencia de que previo a la adición del CDNB la mezcla se incubó por cinco minutos a temperaturas específicas (5 a 70 °C).

5.15 Caracterización cinética de las proteínas rTcGST, determinación de la velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), constante de afinidad (K_m), número de recambio (K_{cat}) y constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m)

Para determinar las constantes cinéticas de las r-TcGSTs, tanto para el GSH como para el CDNB, se realizaron diversos ensayos de velocidad inicial catalizados por las enzimas y evaluados espectrofotométricamente a 340 nm (Habig, 1974). En relación a la determinación de estas constantes empleando el GSH, se mantuvo fija la concentración de la enzima (0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y a saturación la del CDNB (1 mM), mientras que la concentración del GSH se varió en un intervalo de 100 a 3000 μM (Cuadro 4). Para determinar las constantes utilizando el CDNB, se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración de este último reactivo en un intervalo de 100 a 1500 μM , manteniendo a saturación la del GSH (1 mM) y las enzimas a 0.24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de sustratos utilizados para las determinaciones de las constantes catalíticas

Variación de las concentraciones de sustratos (μM)	
rTcGSTcontig02741	
GSH	CDNB
100	
150	
200	100
250	150
300	200
350	250
400	300
450	350
500	400
1000	450
1500	500
2000	1000
2500	1500
3000	

Para determinar los valores de las constantes cinéticas se utilizó la ecuación de Michaelis - Menten y se construyeron gráficas de Lineweaver – Burk con los inversos de las velocidades iniciales frente a los inversos de las concentraciones de los sustratos. De esta gráfica la pendiente de la recta es la K_m/V_{max} el intercepto de la recta en la ordenada es $1/V_{max}$ y el intercepto de la recta en la abscisa es $-1/K_m$.

5.16 Inhibición enzimática, determinación de la constante I_{50}

Los estudios de inhibición se desarrollaron para determinar los valores de I_{50} de diversos compuestos por el procedimiento descrito por Tahir, M. K., y Mannervik, B. (Tahir y Mannervik, 1986) La I_{50} se define como la concentración del inhibidor necesaria para producir el 50% de inhibición catalítica en el ensayo enzimático

estándar; en el caso de las r-TcGSTs, se empleó al CDNB como sustrato en presencia de GSH (co-sustrato).

Los inhibidores utilizados fueron: Rosa de bengala, bromosulfaleína e indometacina.

Para determinar este valor de I_{50} de los inhibidores mencionados sobre las r-TcGSTs, se realizaron ensayos enzimáticos como los descritos en la sección “Ensayos enzimáticos de las enzimas r-TcGST” pero en presencia del inhibidor correspondiente para cada ensayo. Para establecer con certeza el efecto inhibitorio sobre las r-TcGSTs, se utilizaron concentraciones crecientes de cada inhibidor hasta lograr una total inhibición de las enzimas (Cuadro 5).

Los datos obtenidos fueron graficados como el porcentaje de la actividad residual ante el logaritmo de la concentración del inhibidor.

Cuadro 5. Concentraciones de los inhibidores utilizados para las determinaciones de la I_{50}

Concentraciones de inhibidores		
rTcGSTcontig02741		
Rosa de bengala	Bromosulfaleína	Indometacina
μM	μM	μM
0	0	0
0.01	1	1
0.025	2.5	2.5
0.05	5	5
1	10	10
2.5	25	25
5	50	50
10	75	75
25	100	100
50	500	250
75	1000	500
100		1000

6. Resultados

6.1 Secuencias de los tres contigs que refieren a GSTs obtenidas del transcriptoma de cisticercos de *T. crassiceps*

A continuación se muestran las secuencias génicas (renglón superior) así como su traducción en aminoácidos (renglón inferior) correspondientes a los tres contigs que refieren a GSTs del transcriptoma de cisticercos de *Taenia crassiceps*:

- 1) TcGSTcontig02546. Esta secuencia consta de 669 pares de bases (pb), su análisis bioinformático mostró un marco de lectura abierto de 222 aminoácidos y un codón de término TAG, con un peso molecular teórico de 25,491 Da (<https://web.expasy.org/translate/>) datos que están de acuerdo con una glutatión transferasa citosólica. Esta secuencia también fue analizada con el programa BLAST y (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se observó que tiene un 80% de identidad con la secuencia TsM_000741700 reportada para *T. solium* (Figura 7).

```
atggctccggttctcgggtattggaatccttaaaggggtacactcgccaccggtttttacgg
M A P V L G Y W N L K G V H S P P F L R
caagatttacatgaactattgtttgtcaaatcgaggttcctgctcggcgaacaaattcgt
Q D L H E L L F V K S R F L L G E Q I R
cttctgctgaaatacctaggagtggagttcgtcgcataagcaatacaagcttgggtgcaccc
L L L K Y L G V E F V D K Q Y K L G A P
cctaccttcgacaagagtgcgtggctgccagacaagctctcgttgggcttcgatattccc
P T F D K S A W L P D K L S L G F D I P
aatttgccgtactacatcgatgggtgacttcaagttgactcagtcaggagctattatggag
N L P Y Y I D G D F K L T Q S G A I M E
tacattgctgatgtacatggcatggttcccgaatgcaagaagcaacgggctgtgttgcac
Y I A D V H G M V P E C K K Q R A V L H
atgcttcaatatgagatcctggatttgcgcatggcctttgcccgcacttattacagtcct
M L Q Y E I L D L R M A F A R T Y Y S P
gactgtgaaaagttaaagccacccttcttggagacgttggagcagaagttgtcacgattt
D C E K L K P P F L E T L E Q K L S R F
gaggccttcttgaatgaaaagcaatggcttattggggatgagataaactatcccgacttt
E A F L N E K Q W L I G D E I N Y P D F
gctctgtgcgatctgctgatgcaagtgatggaatttgagccatgtctgaggaagcattcc
A L C D L L M Q V M E F E P C L R K H S
atattgcaggcttatttgtcgcgcttcaagaacctgaactgaaagattacctagct
I L Q A Y L S R F K N L P E L K D Y L A
ttgaagtag
L K -
```

2) TcGSTcontig02741. Esta secuencia consta de 654 pares de bases (pb), su análisis bioinformático mostró un marco de lectura abierto de 217 aminoácidos y un codón de término TAG, con un peso molecular teórico de 25,484 Da (<https://web.expasy.org/translate/>). Esta secuencia también fue analizada con el programa BLAST y (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se observó que tiene un 80% de identidad con la secuencia EGR_09218 reportada para *Echinococcus granulosus* (Figura 10) y un 79% de identidad con la secuencia TsM_000610300 reportada para *T. solium* (Figura 8).

```
atggctccgactccttgcttactggaatatcagaggacttgcggaacagattcgtcttctg
M A P T L A Y W N I R G L A E Q I R L L
ttgaaatacctgggaattgagtacaatgacaagcgggtacaactttggcccagacttggat
L K Y L G I E Y N D K R Y N F G P D L D
cgtagccaatggctgtcgggagaagttttctctgggtctcgactttcccaacttacctac
R S Q W L S E K F S L G L D F P N L P Y
tacatcgacggcgacttcaagatgactcagtcgggggcccattttggagtacattgctgat
Y I D G D F K M T Q S G A I L E Y I A D
aggaatggcatgattccggattgcaaaaagcgcgactgcagttctgcacatgctgcaatgc
R N G M I P D C K K R R A V L H M L Q C
gaggttttggatttgcgtcaggcatttgcaagaatttgttacagttctgatttcgagaag
E V L D L R Q A F A R I C Y S S D F E K
ttgaagccaagcttcctcgagaccttgacacagaagctgccgaactttgagaagtatttg
L K P S F L E T L T Q K L P N F E K Y L
ggtgacaaagaatggcttactggcgaaaagataaaactaccctgactttgctctgtgtgaa
G D K E W L T G E K I N Y P D F A L C E
ctgctgaaccagctgacaaagtttgagccaatgtgtctgaagcagtatcccaaactgcag
L L N Q L T K F E P M C L K Q Y P K L Q
gtctacttggagcgtttcgagaacctgcctcaattgctgaatacatggcatcgaaggag
V Y L E R F E N L P Q L R E Y M A S K E
ttcaagacgtgtgcatgcaatggagcagctgcgaaatggcgtggtgactgctag
F K T C A C N G A A A K W R G D C -
```

3) TcGSTcontig10408. Esta secuencia consta de 570 pares de bases (pb), su análisis bioinformático mostró un marco de lectura abierto de 189 aminoácidos y un codón de término TAG, con un peso molecular teórico de 22,035 Da (<https://web.expasy.org/translate/>). Esta secuencia también fue analizada con el programa BLAST y (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se observó que tiene un 82% de identidad con la secuencia EGR_09218 reportada para *Echinococcus granulosus* (Figura 10) y un 80% de identidad con la secuencia TsM_000610300 reportada para *T. solium* (Figura 9).

```
atgacaagcgggtacaactttggccctagacttggatcgtagccaatggctgtcggagaag
M T S G T T L A L D L D R S Q W L S E K
ttttctctgggtctcgactttcccaacttaccctactacatcgacggcgacttcaagatg
F S L G L D F P N L P Y Y I D G D F K M
actcagtcggggggccattttggagtacattgctgataggaatggcatgattccggattgc
T Q S G A I L E Y I A D R N G M I P D C
aaaaagcgcgactgcagttctgcacatgctgcaatgcgagggttttggatttgcgctcaggca
K K R R A V L H M L Q C E V L D L R Q A
tttgcaagaatttggttacagttctgatttcgagaagttgaagccaagcttcctcgagacc
F A R I C Y S S D F E K L K P S F L E T
Ttgacacagaagctgcggaactttgagaagtatttgggtgacaaagaatggcttaccggc
L T Q K L R N F E K Y L G D K E W L T G
Gaaaagataaaactaccctgactttgctctgtgtgaaactgctgaaccagctgacaaagttt
E K I N Y P D F A L C E L L N Q L T K F
gagccaatgtgtctgaagcagtatcccaaactgcaggtctacttggagcgtttcgagaac
E P M C L K Q Y P K L Q V Y L E R F E N
ctgcctcaattgcgtgaatacatggcatcgaaggagttcaagacgtgtgcatgcaatgga
L P Q L R E Y M A S K E F K T C A C N G
gcagctgcgaaatggcgtggtgactgctag
A A A K W R G D C -
```

Sequence ID: Query_2499 Length: 282 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 282 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
213 bits(115)	1e-59	227/282(80%)	3/282(1%)	Plus/Plus
Query 391	ATGGCCTTTGCCCGCACTTATTACAGTCCTGACTGTGAAAAGTTAAAGCCACCCTTCTTG	450		
Sbjct 1	ATGGCTTTTGGGCGCACCTATTACAGTCCCAGATAGTGAGAAGGTGAAGGCAGAATTTTTT	60		
Query 451	GAGACGTTGGAGCAGAAGTTGTCACGATTTGAGGCCTTCTTGAATGAAAAGCAATGGCTT	510		
Sbjct 61	GAGACGTTGGCCCAGAAACTGCCACAATTCGAGGCCTATTTGGGTGAAAAGCAGTGGCTT	120		
Query 511	ATTGGGGATGAGATAAACTATCCCGACTTTGCTCTGTGCGATCTGCTGATGCAAGTGATG	570		
Sbjct 121	ACTGGGGAGAAGATCAACTATCCCGACTTTGCTCTGTGCGATCTTTTGATGCAAATGGTG	180		
Query 571	GAATTTGAGCCA---TGTCTGAGGAAGCATTCCATATTGCAGGCTTATTTGTCGCGCTTC	627		
Sbjct 181	GGAGTTGAGCCAACATGTCTGGAGAAGCATCCCGTATTGCAGGCTTACGTGTCGCGTTTC	240		
Query 628	AAGAACCTACCTGAACTGAAAGATTACCTAGCTTTGAAGTAG	669		
Sbjct 241	AAGAGCTGCCTGAACTGGAGGATTACTTAGCTTCGAAGTAG	282		

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
213	213	41%	1e-59	80%	Query_2499

Figura 7. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig02546 (Query) con la TsM_000741700 (Sbjct) de *T. solium*.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
435 bits(235)	4e-126	509/642(79%)	16/642(2%)	Plus/Plus
Query 18	TTACTGGAATATCAGAGGACTTGC	GGAAACAGATTCGTCCTTCTGTTGAAATACCTGGGAAT		77
Sbjct 18	TTACTGGGATATTAGAGGGCTTGT	GGAACAGTGTGTCCTTCTGTTGAAATACCTGGGAGT		77
Query 78	TGAGTACAATGACAAGCG-GTACAA-CT--TT-GGC-CCAGACTTGGATCGTAGCCAATG			131
Sbjct 78	TCAGTACACTGACAAGCGACTAAAGGTTGGTTCAGCTCCAAACTACGATCAGAGTGAATG			137
Query 132	GCTGTCCGGAGAAGTTTTCTCTGGGTCTCGACTTTCCCAACTTACCCTACTACATCGACGG			191
Sbjct 138	GCTGGCGGAGAAGTTTTCGCTGGGTCTCGACTTTCCCAATTTGCCCTACTACATCGACGG			197
Query 192	CGACTTCAAGATGACTCAGTCGGGGGCCATTTTGGAGTACATTGCTGATAGGAATGGCAT			251
Sbjct 198	CGACTTCAAGATGACCCAGTCAGGTGCCATTTTGGAGTACATTGCTGACAGACACGGCAT			257
Query 252	GATTCCGGATTGCAAAAAGCGACGTGCAGTTCTGCACATGCTGCAATGCGAGGTTTTGGA			311
Sbjct 258	GCTGCCAGATTGCAAGAAGCGACGTGCAGTGTGCACATGCTTCAGTGCAGATAATGGA			317
Query 312	TTTGCCTCAGG-CATTTGCAAGAATTTGTTACAGTTCTGATTTGAGAAAGTTGAAGCC-A			369
Sbjct 318	CCTGCG-CATTTCTTCGCACACACCTGTTACAGCCCCGACTTCGCGAAGCTGAGCCCGA			376
Query 370	AGCTTCCCTCGAGAC-CTTGACACAGAAGCTGCCGAACCTTTGAGAAGTATTTGGGTGACAA			428
Sbjct 377	AGTTTA-TGGAGACTCTTT-CGGAGAAGCTGCAGAACCTTTGAGAAGTATTTGGGCAGTAA			434
Query 429	AGAATGGCTTACTGGCGAAAAGATAAACTACCCTGACTTTGCTCTGTGTGAACTGCTGAA			488
Sbjct 435	GGAGTGGCTTACTGGTGACAAGATCAACTATCCCAGACTTTGGTCTGTGCGAGCTGTTGAA			494
Query 489	CCAGCTGACAAAGTTTGAGCCAATGTGTCTGAAGCAG-TATCCCAAAGCTGACAGGTCTACT			547
Sbjct 495	CCAAGTACGAAAGTTTGACCCAACATGCCTGAAG-AGCTACCCCAAGCTACAAGCCTACC			553
Query 548	TGGAGCGTTTCGAGAACCTGCCTCAATTGCGTGAATACATGGCATCGAAGGAGTTCAAGA			607
Sbjct 554	TGACGCGTTTCGAGAACTTGCCTGCACTGAAAGACTACATGGCGTTCGAAGGAGTTCAATA			613
Query 608	CGTGTGCATGCAATGGAGC-AGCTGCGAAATGGCGTGGTGAC		648	
Sbjct 614	CAATTGCTTGCCATGGAGCGAG-TGCATACTGGCGCGGTGAC		654	

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
435	435	96%	4e-126	79%	Query_59177

Figura 8. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig02741 (Query) con la TsM_000610300 (Sbjct) de *T. solium*.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	1e-106	419/526(80%)	10/526(1%)	Plus/Plus
Query 44	AATGGCTGTCGGAGAAGTTTTCTCTGGGTCTCGACTTTCCTCAACTTACCCTACTACATCG			103
Sbjct 134	AATGGCTGGCGGAGAAGTTTTCGCTGGGTCTCGACTTTCCTCAATTTGCCCTACTACATCG			193
Query 104	ACGGCGACTTCAAGATGACTCAGTCGGGGGCCATTTTGGAGTACATTGCTGATAGGAATG			163
Sbjct 194	ACGGCGACTTCAAGATGACCCAGTCAGGTGCCATTTTGGAGTACATTGCTGACAGACACG			253
Query 164	GCATGATTCGGATTGCAAAAAGCGACGTGCAGTTCTGCACATGCTGCAATGCGAGGTTT			223
Sbjct 254	GCATGCTGCCAGATTGCAAGAAGCGACGTGCAGTCTGCACATGCTTCAGTGCGAGATAA			313
Query 224	TGGATTTGCGTCAGG-CATTTGCAAGAATTTGTTACAGTTCTGATTTTCGAGAAGTTGAAG			282
Sbjct 314	TGGACCTGCG-CATTTCTTCGCACACACCTGTTACAGCCCGACTTCGCGAAGCTGAGC			372
Query 283	CC-AAGCTTCCTCGAGAC-CTTGACACAGAAGCTGCGGAACCTTTGAGAAGTATTTGGGTG			340
Sbjct 373	CCGAAGTTTA-TGGAGACTCTTT-CGGAGAAGCTGCAGAACTTTGAGAAGTATTTGGGCA			430
Query 341	ACAAAGAATGGCTTACCGGCGAAAAGATAAACTACCCTGACTTTGCTCTGTGTGAACTGC			400
Sbjct 431	GTAAGGAGTGGCTTACTGGTGACAAGATCAACTATCCCAGCTTTGGTCTGTGCGAGCTGT			490
Query 401	TGAACCAGCTGACAAAGTTTGAGCCAATGTGTCTGAAGCAG-TATCCCAAAGCTGCAGGTC			459
Sbjct 491	TGAACCAACTGACGAAGTTTGACCCAACATGCCTGAAG-AGCTACCCCAAGCTACAAGCC			549
Query 460	TACTTGGAGCGTTTCGAGAACCTGCCTCAATTGCGTGAATACATGGCATCGAAGGAGTTC			519
Sbjct 550	TACCTGACGCGTTTCGAGAACTTGCTGCACTGAAAGACTACATGGCGTCGAAGGAGTTC			609
Query 520	AAGACGTGTGCATGCAATGGAGC-AGCTGCGAAATGGCGTGGTGAC		564	
Sbjct 610	AATACAATTGCTTGCCATGGAGCGAG-TGCATACTGGCGCGGTGAC		654	

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
370	370	91%	1e-106	80%	Query_168937

Figura 9. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig10408 (Query) con la TsM_000610300 (Sbjct) de *T. solium*.

1	11	21	31	41	51
atggtcccca	ttttcgcata	ctggaatgtc	aaagggctcg	gggagcagat	tcgtcttctg
atggctccga	ctcttgctta	ctggaatata	agaggacttg	cggaacagat	tcgtcttctg
61	71	81	91	101	111
ttgagatacc	tgggggtgga	gttcaactgac	aaacaatata	agattggtcc	agctccgacc
ttgaaatacc	tgggaattga	gtacaatgac	aagcgggtaca	actttgg--c	--c-caga-c
			atgacaagcg	gtacaacttt	ggccctagac
121	131	141	151	161	171
tacgaccgta	gtgcatggct	gccggagaag	ttctcgttgg	gtctggactt	tcccaattta
ttggatcgta	gccaatggct	gtcggagaag	ttttctctgg	gtctcgactt	tcccaactta
ttggatcgta	gccaatggct	gtcggagaag	ttttctctgg	gtctcgactt	tcccaactta
181	191	201	211	221	231
ccctactaca	tcgacgacga	cttcaagtgg	actcagtctg	gggccatfff	ggagtacatt
ccctactaca	tcgacggcga	cttcaagatg	actcagtcgg	gggccatfff	ggagtacatt
ccctactaca	tcgacggcga	cttcaagatg	actcagtcgg	gggccatfff	ggagtacatt
241	251	261	271	281	291
gctgataaac	acggcatgat	tcctgattgc	aaaaagcaac	gtgcggtgct	gcatatgctt
gctgatagga	atggcatgat	tccggattgc	aaaaagcgac	gtgcagttct	gcacatgctg
gctgatagga	atggcatgat	tccggattgc	aaaaagcgac	gtgcagttct	gcacatgctg
301	311	321	331	341	351
caatgcgagg	ttgtagactt	gcgcatcgcg	tttgcaaga	ctggttatta	tcccgattgc
caatgcgagg	ttttggattt	gcgtcaggca	tttgcaagaa	tttgttacag	ttctgatttc
caatgcgagg	ttttggattt	gcgtcaggca	tttgcaagaa	tttgttacag	ttctgatttc
361	371	381	391	401	411
aagaaggtga	agcaggactt	tttggaggca	ctggcacaaa	aactgccgaa	ctttgaggcc
gagaagttga	agccaagctt	cctcgagacc	ttgacacaga	agctgccgaa	ctttgagaag
gagaagttga	agccaagctt	cctcgagacc	ttgacacaga	agctgccgaa	ctttgagaag
421	431	441	451	461	471
tatttgggtg	aaaaggaatg	gcttactggt	gataagatca	actatcccga	ctttggtctg
tatttgggtg	aaaaggaatg	gcttactggc	gaaaagataa	actaccctga	ctttgctctg
tatttgggtg	aaaaggaatg	gcttaccggc	gaaaagataa	actaccctga	ctttgctctg
481	491	501	511	521	531
tgcatctgt	tgatgcagat	gtcgaggttt	gagccaacgt	gtctgcagaa	gtaccccaaa
tgtgaactgc	tgaaccagct	gacaaagttt	gagccaatgt	gtctgaagca	gtatcccaaa
tgtgaactgc	tgaaccagct	gacaaagttt	gagccaatgt	gtctgaagca	gtatcccaaa
541	551	561	571	581	591
ctgcaggcct	acttgtcgcg	tttcgagaat	ttgcctgcat	tgaaggatta	ctagcttctg
ctgcaggctt	acttggagcg	tttcgagaac	ctgcctcaat	tgcgtgaata	catggcatcg
ctgcaggctt	acttggagcg	tttcgagaac	ctgcctcaat	tgcgtgaata	catggcatcg
601	611	621	631	641	651
aagtaa					
aaggagtcca	agacgtgtgc	atgcaatgga	gcagctgcga	aatggcgtgg	tgactgctag
aaggagtcca	agacgtgtgc	atgcaatgga	gcagctgcga	aatggcgtgg	tgactgctag

Figura 10. Alineamiento de la secuencia TcGSTcontig02741 (color negro) y TcGSTcontig10408 (color naranja) con una glutatión transferasa de *Echinococcus granulosus* (EGR_09218) (color azul).

6.2 Oligos y selección de las enzimas de restricción

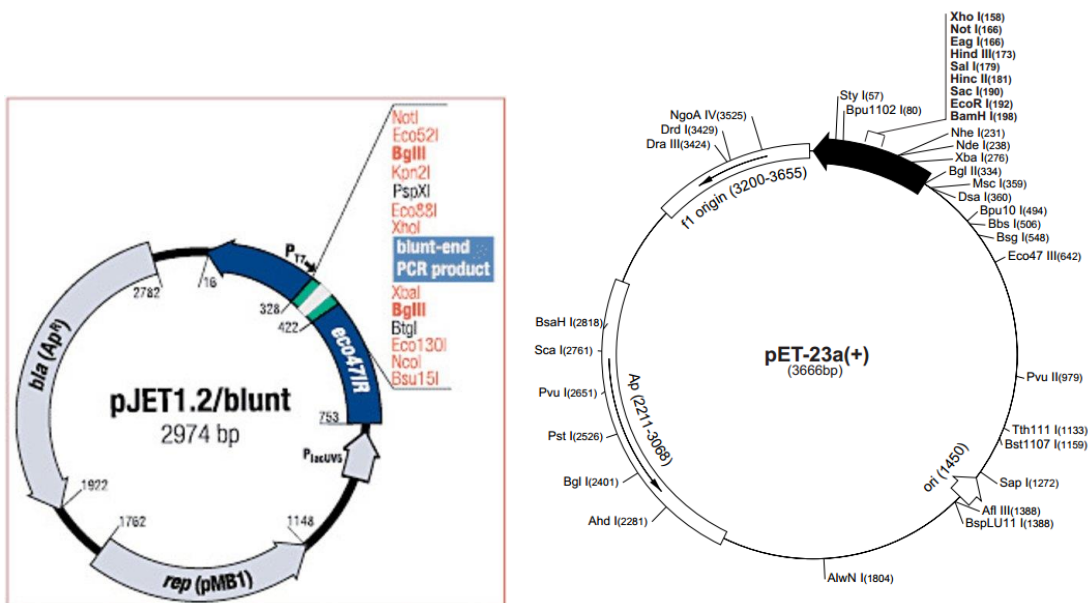


Figura 11. Mapa de restricción de los plásmidos pJET1.2/blunt y pET-23a(+)

Las enzimas de restricción designadas para TcGSTcontig02546, fueron NdeI y XhoI, por no cortar la secuencia del gen y tener zonas de corte en los plásmidos a utilizar (pJET1.2/blunt y pET23a(+)) (Figura 11). Las secuencias de los oligos utilizados fueron:

Forward 5'3'

GCG CAT ATG GGG TAT TGG AAT CTT AAA GGG

Reverse 3'5'

GGG CTC GAG CTT CAA AGC TAG GTA ATC

La temperatura de fusión (T_m) utilizada para unir los oligos al templado fue de 61°C.

Las enzimas de restricción designadas para TcGSTcontig02741 también fueron NdeI y NotI y las secuencias de los oligos utilizados fueron:

Forward 5'3'

TGG CAT ATG GCT CCG GTT CTC GGG TAT TG

Reverse 3'5'

TAA GC GGC CGC GCA GTC ACC ACG

La Tm fue de 66°C.

Las enzimas de restricción empleadas para TcGSTcontig10408 fueron NdeI y NotI, las secuencias de los oligos realizados corresponden a:

Forward 5'3'

CCC CAT ATG ACA AGC GGT ACA ACT TTG GC

Reverse 3'5'

TAA GC GGC CGC GCA GTC ACC AC

La Tm fue de 61°C

6.3 Extracción de RNA y amplificación de los genes de TcGSTcontig02546, TcGSTcontig02741 y TcGSTcontig10408

Utilizando el método tiocianato de guanidina (TRIzol)-fenol-cloroformo y ocho cisticercos de *T. crassiceps* se obtuvieron sus RNA totales (Figura 12).

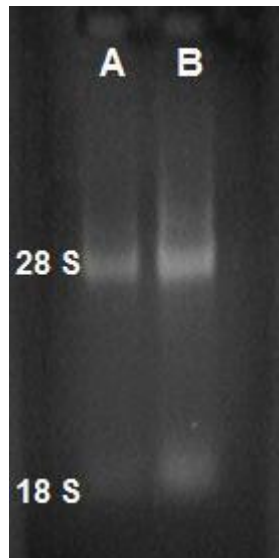


Figura 12. A y B RNAs totales de cisticercos de *T. crassiceps* en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed, (B doble concentración que A).

En las figuras 13, 14 y 15 se observan los productos de PCR amplificados a partir de cDNA, el cual fue sintetizado mediante la técnica de RT (transcriptasa reversa) a partir de RNAs totales de cisticercos de *T. crassiceps*. Las bandas mostradas presentan un peso molecular alrededor de 600 pb que sugieren la amplificación de los genes correspondientes con las secuencias de los contigs proporcionados.

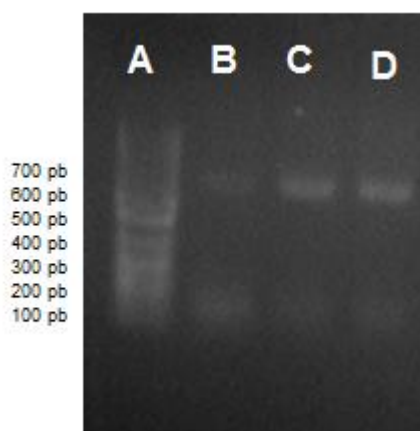


Figura 13. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed mostrando: (A) marcador de peso molecular, (B, C y D) productos de PCR de TcGSTcontig02741 a una T_m de 65°C, 66°C y 67°C respectivamente con un peso aproximado de 600 pb. Las bandas de 100 pb corresponden a oligos sin digerir.

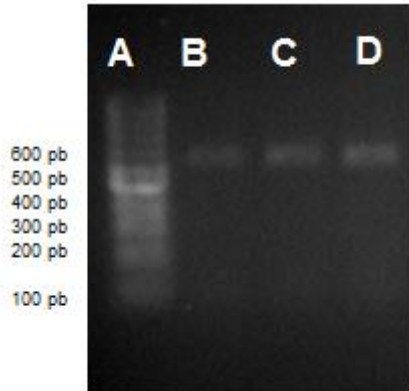


Figura 14. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed mostrando: (A) marcador de peso molecular, (B, C y D) productos de PCR de TcGSTcontig10408 con un peso aproximado de 600 bp a una Tm de 59°C, 60°C y 61°C respectivamente.

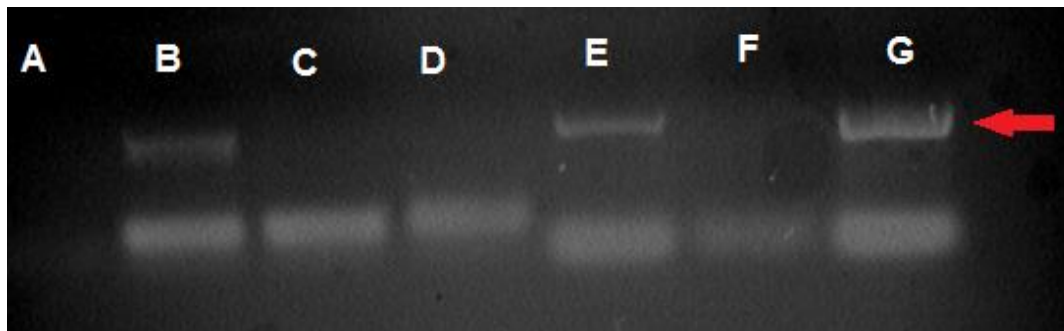


Figura 15. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed para visualizar los resultados de PCR mostrando: (A) control negativo, (B) control positivo de TcGSTcontig10408. La flecha (que indica la posición del gen) marca la altura en la que se muestran las bandas positivas. (C, D) ausencia de amplificadas de TcGSTcontig10408. (E, F, G) amplificadas de TcGSTcontig02546 de tres cDNAs sintetizados en distintas ocasiones, sólo E y G fueron positivos.

6.4 Ligación de los genes de las TcGSTs en el plásmido pJET1.2, transformación de bacterias *E. coli* competentes Top 10 y TG1 y purificación de los plásmidos

Los resultados de las ligaciones de los genes de TcGSTs con el plásmido de clonación pJET1.2 en bacterias transformadas *E. coli* competentes Top10 y TG1 se

muestran en las Figuras 16, 17 y 18. A los genes de las TcGSTs obtenidos de las unidades formadoras de colonias se les realizó un PCR para comprobar su especificidad. Posteriormente se procedió a purificar los plásmidos con los insertos de las colonias positivas como se mencionó en la metodología.



Figura 16. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra la amplificación del gen TcGSTcontig02546 mediante la técnica de PCR, a partir de colonias Top con el plásmido pJET1.2. (A) control positivo, (Ñ) control negativo, (B – L) colonias sin amplificar, (M, N) colonias con amplificación del gen de TcGSTcontig02546. La flecha indica la posición del gen.

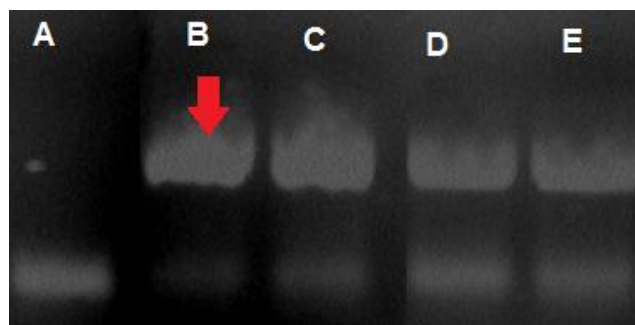


Figura 17. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra la amplificación del gen TcGSTcontig02741, mediante la técnica de PCR, a partir de colonias Top con el plásmido pJET1.2. (A) Control negativo, (B) control positivo, (C-E) colonias con amplificación del gen de TcGSTcontig02741. La flecha indica la posición del gen.

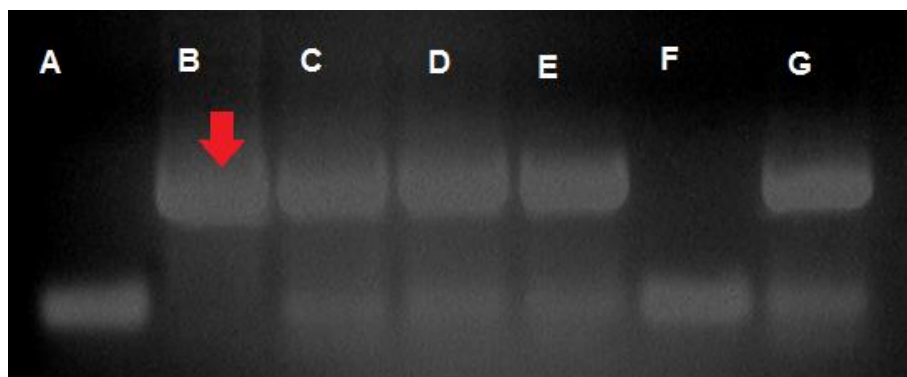


Figura 18. Gel de agarosa al 1.5% teñida con GelRed. Se muestra la amplificación del gen TcGSTcontig10408, mediante la técnica de PCR, a partir de colonias Top con el plásmido pJET1.2. (A) Control negativo, (B) control positivo, (C– G) colonias con amplificación del gen de TcGSTcontig10408, excepto (F). La flecha indica la posición del gen.

6.5 Restricción de los genes TcGSTs y ligación de los insertos con restricción al plásmido pET23a(+)

En las figuras 19, 20 y 21 se muestran, en geles de agarosa al 1.5% teñidos con GelRed, los resultados de las restricciones a las que se sometieron los plásmidos pJET1.2 purificados. En ellas se muestran a cada uno de los genes de TcGST. Los insertos liberados se purificaron como fue mencionado en la metodología y se utilizaron para realizar la ligación con el plásmido de expresión pET23a(+).

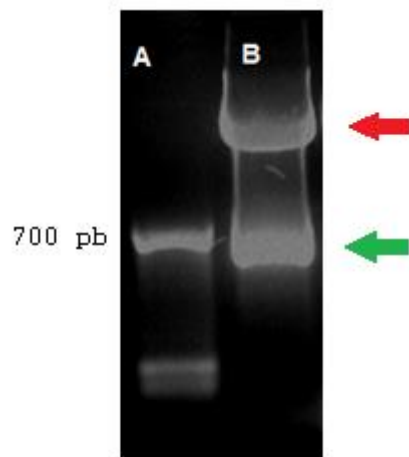


Figura 19. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestran el plásmido pJET1.2/TcGSTcontig02546 digerido con las enzimas de restricción NdeI y XhoI. (A) peso molecular de 700 pb, (B) la flecha verde indica al gen de la TcGSTcontig02546 liberado del plásmido. La flecha roja indica el plásmido de donde se liberó el gen.

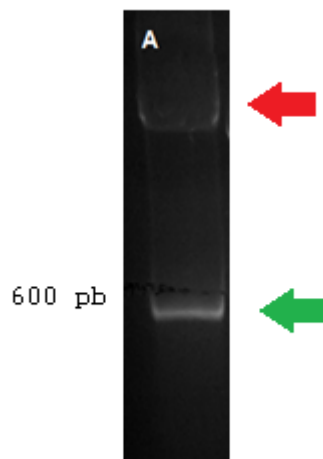


Figura 20. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra el plásmido pJET1.2/TcGSTcontig02741 digerido con las enzimas de restricción NdeI y NotI. (A) la flecha verde indica al gen de la TcGSTcontig02741 liberado del plásmido. La flecha roja indica el plásmido de donde se liberó el gen.

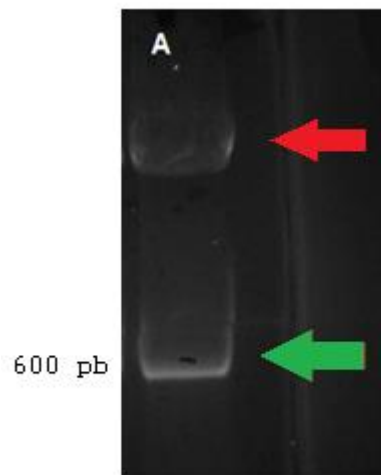


Figura 21. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra el plásmido pJET1.2/TcGSTcontig10408 digerido con las enzimas de restricción NdeI y NotI (A) gen de la TcGSTcontig10408 liberado del plásmido a la altura de la flecha verde. La flecha roja indica el plásmido de donde se liberó el gen.

6.6 Transformación de bacterias de expresión *E. coli* BL21 CodonPlus, pLysS y Origami con plásmidos pET23a(+)/TcGSTs y la purificación de estos plásmidos para su secuenciación

Las bacterias *E. coli* BL21 CodonPlus, pLysS y Origami transformadas fueron evaluadas por PCR para comprobar la presencia de los genes correspondientes a las TcGSTs (Figura 22, 23 y 24). De las colonias positivas se purificaron los plásmidos para posteriormente mandar a secuenciar.

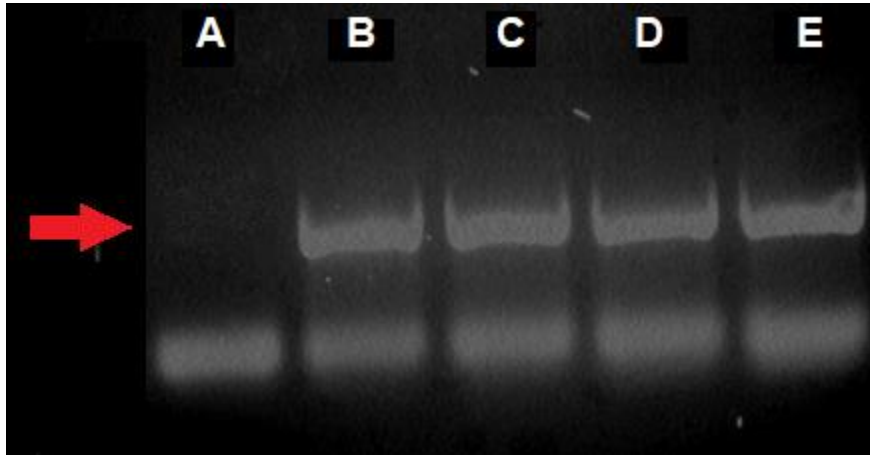


Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra la amplificación del gen TcGSTcontig02546 mediante la técnica de PCR, a partir de colonias BL21 CodonPlus con la construcción del plásmido pET23a(+)/TcGSTcontig02546. (A) Control negativo, (B) control positivo, (C-E) colonias con amplificación del gen de TcGSTcontig02546. La flecha indica la posición del gen.

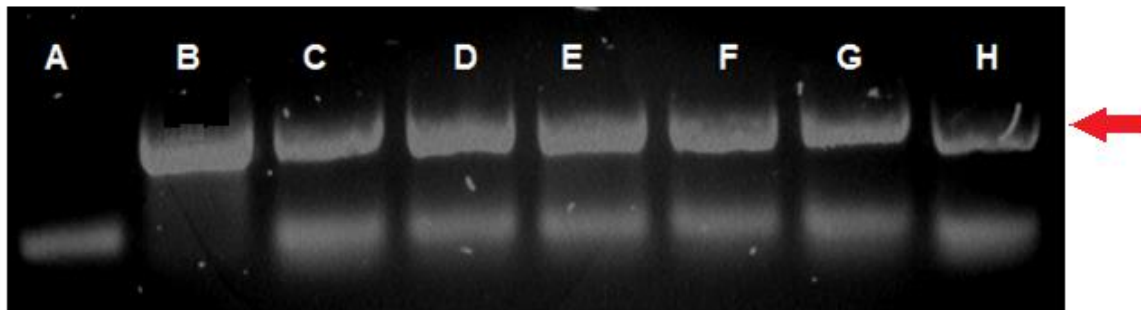


Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra la amplificación del gen TcGSTcontig02741, mediante la técnica de PCR, a partir de colonias BL21 pLysS y BL21 CodonPlus con el plásmido pET23a(+)/TcGSTcontig02741. (A) control negativo, (B) control positivo, (C-E) colonias BL21 pLysS con amplificación del gen de TcGSTcontig02741, (F-H) colonias BL21 CodonPlus con amplificación del gen de TcGSTcontig02741. La flecha indica la posición del gen.

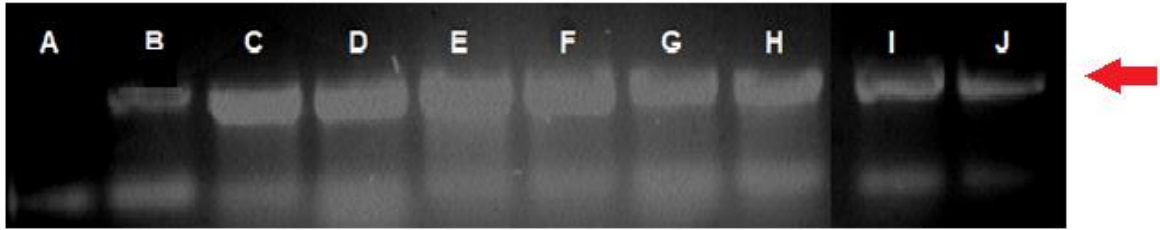


Figura 24. Gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed. Se muestra la amplificación del gen TcGSTcontig10408, mediante la técnica de PCR, a partir de colonias BL21 CodonPlus y BL21 pLysS con el plásmido pET23a(+)/TcGSTcontig10408. (A) Control negativo, (B) control positivo, (C-F) colonias BL21 CodonPlus con amplificación del gen TcGSTcontig10408, (G-J) colonias BL21 pLysS con amplificación del gen TcGSTcontig10408. La flecha indica la posición del gen.

6.7 Secuencias obtenidas

A continuación se muestra el alineamiento y su comparación entre las secuencias obtenidas de los transcriptomas y los plásmidos con los genes de las TcGSTs insertados.

TcGSTcontig02546

Forward

Reverse pET23a/TcGSTcontig02546

Forward

Reverse pJET/TcGST contig02546

		10	20	30	40	50
Contig 02546		MAPVLGYWNL	KGVHSPFFLR	QDLHELLFVK	SRFLLGEQIR	LLLKYLGVF
<u>Forward</u>	M	GYWNL	KG		LGEQIR	LLLKYLGVF
<u>Reverse</u>	M	GYWNL	KG		LGEQIR	LLLKYLGVF
<u>Forward</u>	M	GYWNL	KG		LGEQIR	LLLKYLGVF
<u>Reverse</u>	M	GYWNL	KG		LGEQIR	LLLKYLGVF
		60	70	80	90	100
Contig 02546		VDKQYKLGAP	PTFDKSAWLP	DKLSLGF	NLPYYIDGDF	KLTQSGAIME
<u>Forward</u>		VDKQYKLGAP	PTFDKSAWLP	DKLSLGF	NLPYYIDGDF	KLTQSGAIME
<u>Reverse</u>		VDKQYKLGAP	PTFDKSAWLP	DKLSLGF	NLPYYIDGDF	KLTQSGAIME
<u>Forward</u>		VDKQYKLGAP	PTFDKSAWLP	DKLSLGF	NLPYYIDGDF	KLTQSGAIME
<u>Reverse</u>		VDKQYKLGAP	PTFDKSAWLP	DKLSLGF	NLPYYIDGDF	KLTQSGAIME
		110	120	130	140	150
Contig 02546		YIADVHGMVP	ECKKQRAVLH	MLQYEILDLR	MAFARTYYSP	DCEKLRKPPFL
<u>Forward</u>		YIADVHGMVP	ECKKQRAVLH	MLQYEILDLR	MAFARTYYSP	DCEKLRKPPFL
<u>Reverse</u>		YIADVHGMVP	ECKKQRAVLH	MLQYEILDLR	MAFARTYYSP	DCEKLRKPPFL
<u>Forward</u>		YIADVHGMVP	ECKKQRAVLH	MLQYEILDLR	MAFARTYYSP	DCEKLRKPPFL
<u>Reverse</u>		YIADVHGMVP	ECKKQRAVLH	MLQYEILDLR	MAFARTYYSP	DCEKLRKPPFL
		160	170	180	190	200
Contig 02546		ETLEQKLSRF	EAFLNEKQW	IGDEINYPDF	ALCDLLMQVM	EFEPCLRKHS
<u>Forward</u>		ETLEQKLSRF	EAFLNEKQW	IGDEINYPDF	ALCDLLMQVM	EFEPCLRKHS
<u>Reverse</u>		ETLEQKLSRF	EAFLNEKQW	IGDEINYPDF	ALCDLLMQVM	EFEPCLRKHS
<u>Forward</u>		ETLEQKLSRF	EAFLNEKQW	IGDEINYPDF	ALCDLLMQVM	EFEPCLRKHS
<u>Reverse</u>		ETLEQKLSRF	EAFLNEKQW	IGDEINYPDF	ALCDLLMQVM	EFEPCLRKHS
		210	220	230		
Contig 02546		ILQAYLSRFK	NLPELKDYLE	LK		
<u>Forward</u>		ILQAYLSRFK	NLPELKDYLE	LKLEHHHHHH		
<u>Reverse</u>		ILQAYLSRFK	NLPELKDYLE	LKLEHHHHHH		
<u>Forward</u>		ILQAYLSRFK	NLPELKDYLE	LK		
<u>Reverse</u>		ILQAYLSRFK	NLPELKDYLE	LK		

Figura 25. Alineamiento comparativo de la secuencia de TcGSTcontig02546, la proteína rTcGSTcontig02546 (pET23a+)/TcGSTcontig02546) y pJET/TcGSTcontig02546, al final se observa una secuencia de histidinas necesarias para la purificación por medio de una cromatografía de afinidad. La marca azul representa la diferencia de un aminoácido entre la secuencia del contig y las que corresponden a los plásmidos.

TcGSTcontig02741

	10	20	30	40	50
Contig 02741	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGIEYND	KRYNFGPDL	RSQWLSEKFS
Forward	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGIEYND	KRYNFGPDL	RSQWLSEKFS
Reverse	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGIEYND	KRYNFGPDL	RSQWLSEKFS
	60	70	80	90	100
Contig 02741	LGLDFPNLPY	YIDGDFKMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
Forward	LGLDFPNLPY	YIDGDFRMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
Reverse	LGLDFPNLPY	YIDGDFRMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
	110	120	130	140	150
Contig 02741	EVLDLRQAF	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
Forward	EVLDLRQAF	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
Reverse	EVLDLRQAF	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
	160	170	180	190	200
Contig 02741	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
Forward	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
Reverse	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
	210	220	228		
Contig 02741	FKTCACNGAA	AKWRGDC-			
Forward	FKTCACNGAA	AKWRGDCAA	LEHHHHHH-		
Reverse	FKTCACNGAA	AKWRGDCAA	LEHHHHHH-		

Figura 26. Alineamiento comparativo de la secuencia de TcGSTcontig02741 y la proteína rTcGSTcontig02741 (pET23a+)/TcGSTcontig02741), al final se observa una secuencia de histidinas necesarias para la purificación por medio de una cromatografía de afinidad.

TcGSTcontig10408

Contig 02741	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGI EYND	KRYNFGPDL D	RSQWLSEKFS
Contig 10408	M			T SGTTLALDLD	RSQWLSEKFS
pET23a-02741	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGI EYND	KRYNFGPDL D	RSQWLSEKFS
pET23a-10408F	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGI EYND	KRYNFGPDL D	RSQWLSEKFS
pET23a-10408R	MAPTLAYWNI	RGLAEQIRLL	LKYLGI EYND	KRYNFGPDL D	RSQWLSEKFS
Contig 02741	LGLDFPNLPY	YIDGDFKMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
Contig 10408	LGLDFPNLPY	YIDGDFKMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
pET23a-02741	LGLDFPNLPY	YIDGDFRMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
pET23a-10408F	LGLDFPNLPY	YIDGDFRMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
pET23a-10408R	LGLDFPNLPY	YIDGDFRMTQ	SGAILEYIAD	RNGMIPDCKK	RRAVLHMLQC
Contig 02741	EVLDLRQAF A	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
Contig 10408	EVLDLRQAF A	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLRNFEKYL	GDKEWLTGEK
pET23a-02741	EVLDLRQAF A	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
pET23a-10408F	EVLDLRQAF A	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
pET23a-10408R	EVLDLRQAF A	RICYSSDFEK	LKPSFLETLT	QKLPNFEKYL	GDKEWLTGEK
Contig 02741	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
Contig 10408	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
pET23a-02741	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
pET23a-10408F	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
pET23a-10408R	INYPDFALCE	LLNQLTKFEP	MCLKQYPKLQ	VYLERFENLP	QLREYMASKE
Contig 02741	FKTCACNGAA	AKWRGDC			
Contig 10408	FKTCACNGAA	AKWRGDC			
pET23a-02741	FKTCACNGAA	AKWRGDCAA A	LEHHHHHH		
pET23a-10408F	FKTCACNGAA	AKWRGDCAA A	LEHHHHHH		
pET23a-10408R	FKTCACNGAA	AKWRGDCAA A	LEHHHHHH		

Figura 27. Alineamiento comparativo de la secuencia de TcGSTcontig02741, TcGSTcontig10408 y la proteína rTcGSTcontig02741 (pET23a(+)/TcGSTcontig02741) y rTcGSTcontig10408 (pET23a(+)/TcGSTcontig10408), estas dos últimas presentan secuencias iguales. La F significa Forward y R Reverse. La región amarilla indica los aminoácidos que son diferentes comparado a las demás secuencias.

6.8 Inducción de la expresión de las proteínas TcGSTcontig02546 y TcGSTcontig02741 por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y su purificación por medio de cromatografías de Sefarosa-IMAC

La Figura 28, es un gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión proteica de la TcGSTcontig02546 en bacterias BL21 CodonPlus a 16 horas de inducción. E-J: expresión proteica de la TcGSTcontig02546 con un peso aproximado de 25 kDa.

La Figura 29 corresponde a un gel de poliacrilamida-SDS donde se comprobó la expresión de la TcGSTcontig02546 en bacterias Origami a 4 horas de inducción, en el gel se introdujeron los eluidos producto de dos cromatografías. En las columnas E, G y H se observa la TcGSTcontig02546 con un peso aproximado de 25 kDa.

La Figura 30, corresponde a un gel de poliacrilamida-SDS, en donde se evaluó la expresión proteica de la TcGSTcontig02741 en bacterias BL21 pLysS a 16 horas de inducción. En la columna E se ve la TcGSTcontig02741 purificada con un peso aproximado de 25kDa.

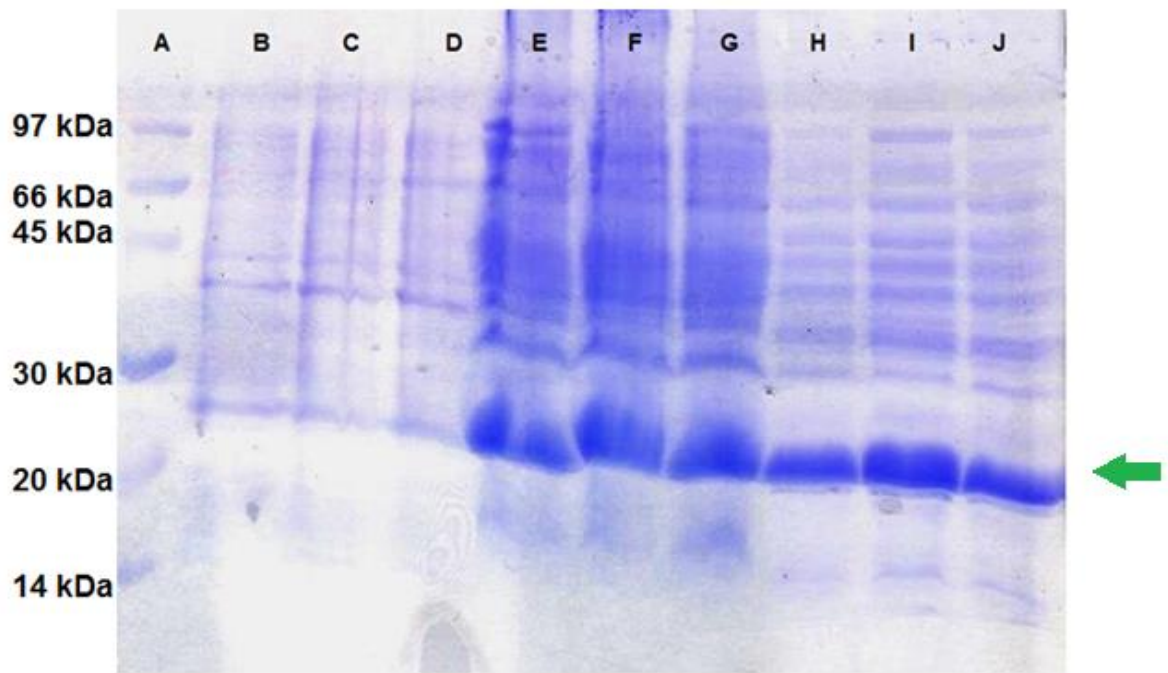


Figura 28. Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión de la TcGSTcontig02546 en bacterias BL21 CodonPlus (A) marcador de peso, (B-D) bacterias sin inducir (sin IPTG) (E-G) precipitados de bacterias inducidas (IPTG por 16 horas) (H-J) sobrenadantes de las bacterias inducidas.

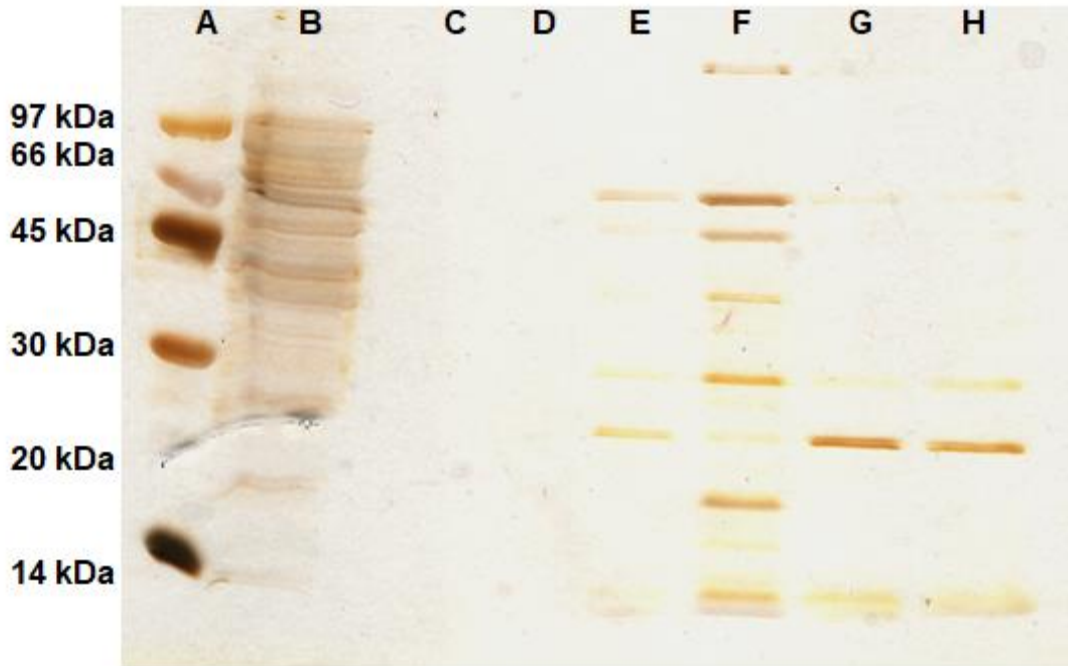


Figura 29. Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión de la TcGSTcontig02546 en bacterias Origami (A) marcador de peso, (B) sobrenadante de las bacterias sin inducir, (C-E) eluído de primer cromatografía (F-H) eluído de segunda cromatografía.

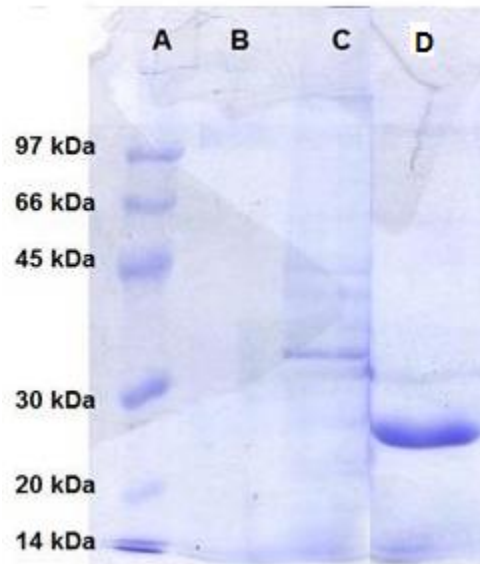


Figura 30 Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la expresión de la TcGSTcontig02741 en bacterias BL21 pLysS, (A) marcador de peso molecular, (B) precipitado de bacterias sin inducir, (C) sobrenadante de las bacterias sin inducir, (D) eluído con la proteína purificada.

6.9 Cromatografía (Sefarosa-IMAC) para purificar las proteínas r-TcGSTcontig02546 y rTcGSTcontig02741

Las figuras 31 y 32 reflejan los valores de absorbancia a 280 nm de las fracciones producto de las cromatografías de afinidad realizadas para la purificación de las enzimas recombinantes: rTcGSTcontig02546 y rTcGSTcontig02741.

El primer pico que se observa en las gráficas corresponde a las proteínas que no tienen afinidad por el ligando, es decir las proteínas que no corresponden a la recombinante de interés.

Cuando los valores de absorbancia llegan a cero en seguida se puede ver un aumento en los valores de absorbancia formándose un segundo pico que corresponde a la proteína recombinante de interés.

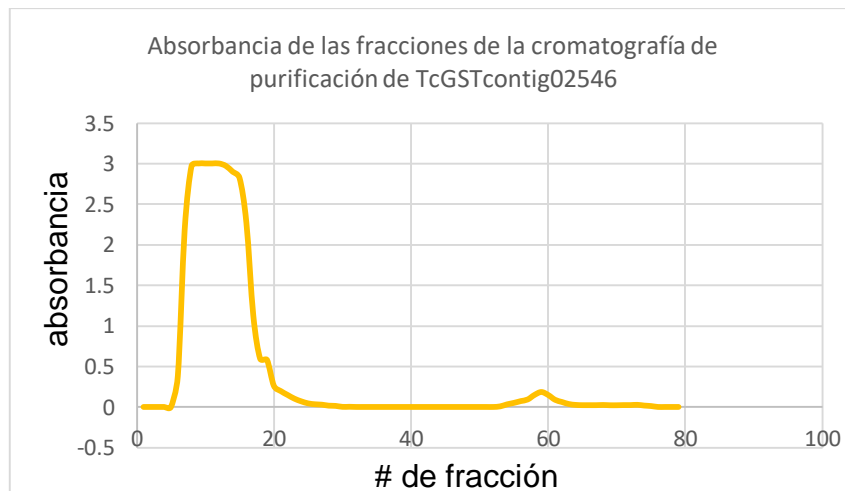


Figura 31. Gráfica correspondiente a la purificación de rTcGSTcontig02546 por medio de un pulso de amortiguador de elución (Imidazol 500 mM).

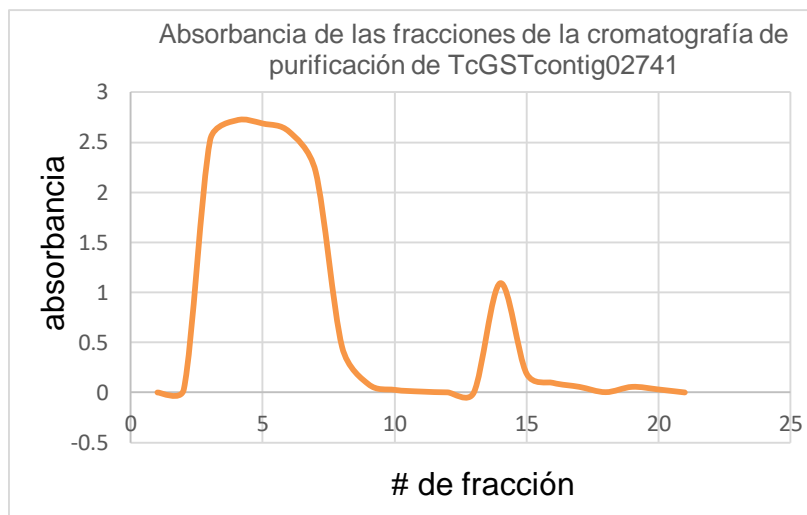


Figura 32. Gráfica correspondiente a la purificación de rTcGSTcontig02741 por medio de un pulso de amortiguador de elución (Imidazol 500 mM).

6.10 Actividad enzimática en función del pH

La Figura 33, muestra el comportamiento de la actividad enzimática de la rTcGSTcontig02741 en función del pH utilizado en el ensayo enzimático. La actividad óptima se obtuvo en el intervalo de 8.5 - 9.0 y decrece rápidamente en ambos lados del máximo. Estos resultados son parecidos a los reportados para otras GSTs.

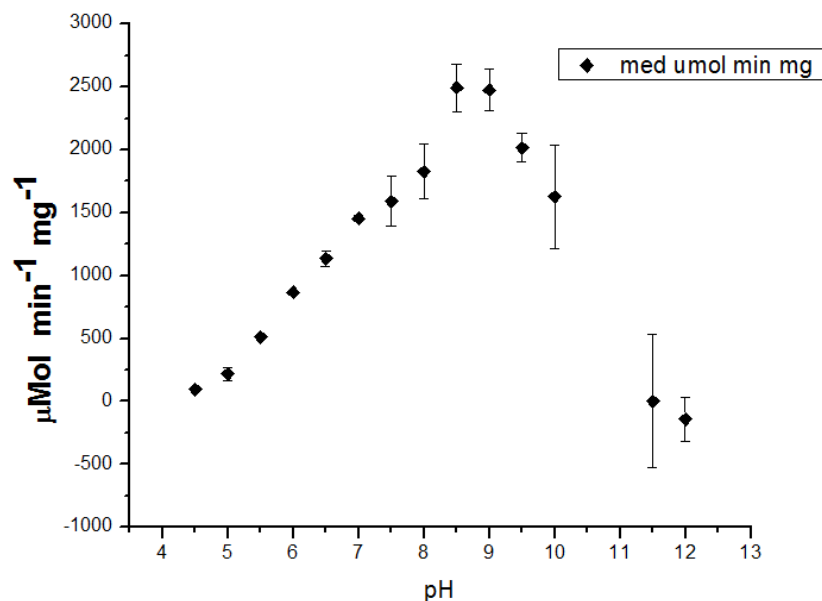


Figura 33. Efecto del pH sobre la velocidad de conjugación entre GSH y CDNB para rTcGSTcontig02741.

6.11 Actividad enzimática en función de la temperatura

La Figura 34 muestra el porcentaje de la actividad enzimática de la rTcGSTcontig02741 en función de la temperatura a la cual se realizó el ensayo enzimático. Se puede observar que la enzima se mantuvo estable en el intervalo de 5 - 50°C. Temperaturas más elevadas produjeron la inactivación gradual de la enzima hasta su completa inactivación.

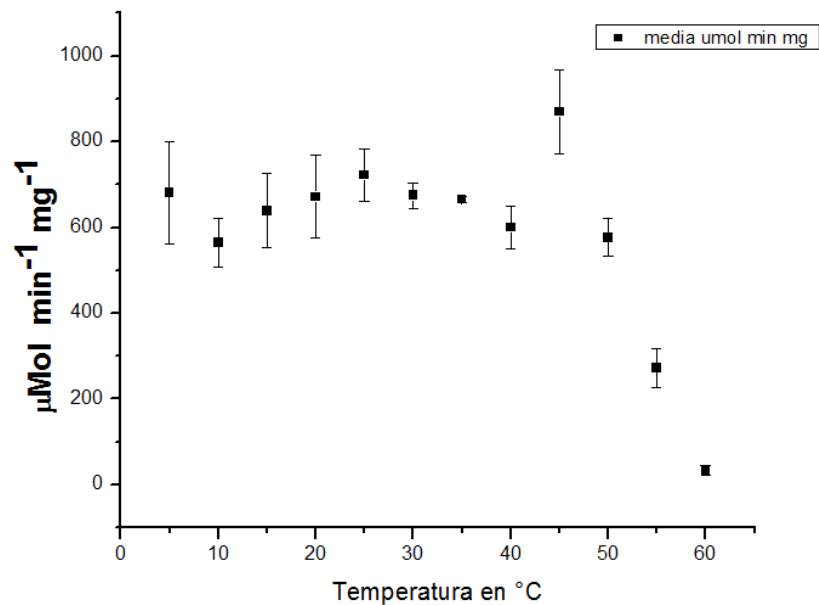


Figura 34. Efecto de la temperatura sobre la velocidad de conjugación entre GSH y CDNB para rTcGSTcontig02741.

6.12 Caracterización cinética de las proteínas rTcGSTs, determinación de la velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), constante de afinidad (K_m), número de recambio (K_{cat}) y constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m)

Las Figuras 35 y 37 muestran los resultados de los ensayos enzimáticos de la Vo frente a la concentración del sustrato, hechos con la rTcGSTcontig02741. Ambas gráficas describieron una hipérbola rectangular con límites de V_{max} y K_m características de enzimas que se ajustan a la cinética de Michaelis-Menten. Para tener valores más precisos de las constantes catalíticas se construyeron gráficas de Lineweaver-Burk con los datos de las Figuras 35 y 37. Las Figuras 36 y 38 muestran gráficas de doble recíproca para la rTcGSTcontig02741 frente a diversas concentraciones de GSH y CDNB respectivamente.

El Cuadro 6 contiene los resultados de las constantes catalíticas de la rTcGSTcontig02741.

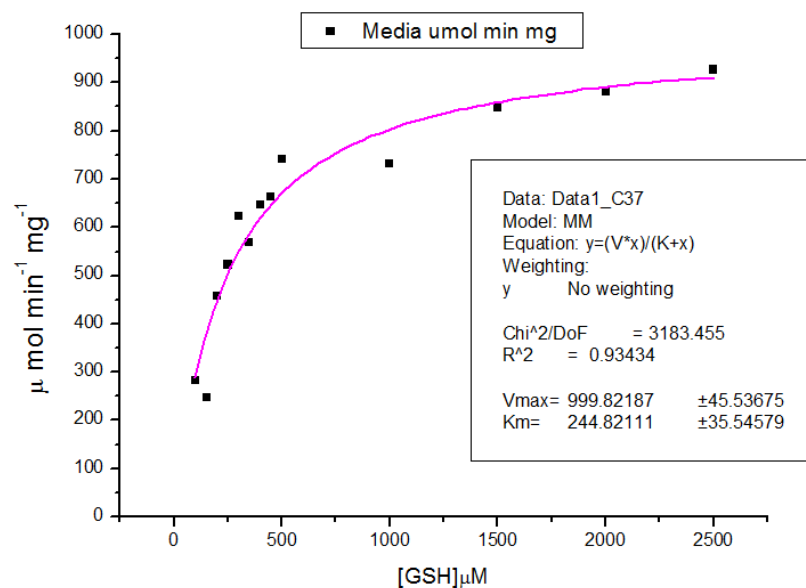


Figura 35. Comportamiento Michaeliano de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de GSH. Los recuadros incluyen los valores de los parámetros cinéticos aparentes V_{máx} y K_m.

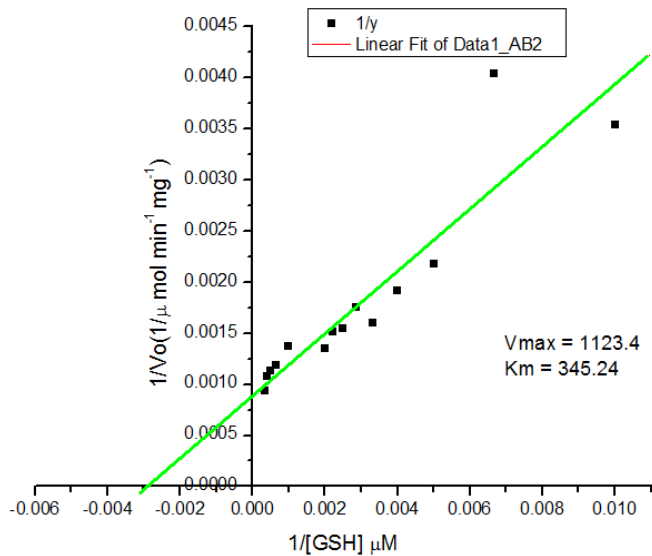


Figura 36. Diagrama de Lineweaver-Burk, obtenida de los valores recíprocos de la gráfica de Michaelis-Menten de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de GSH.

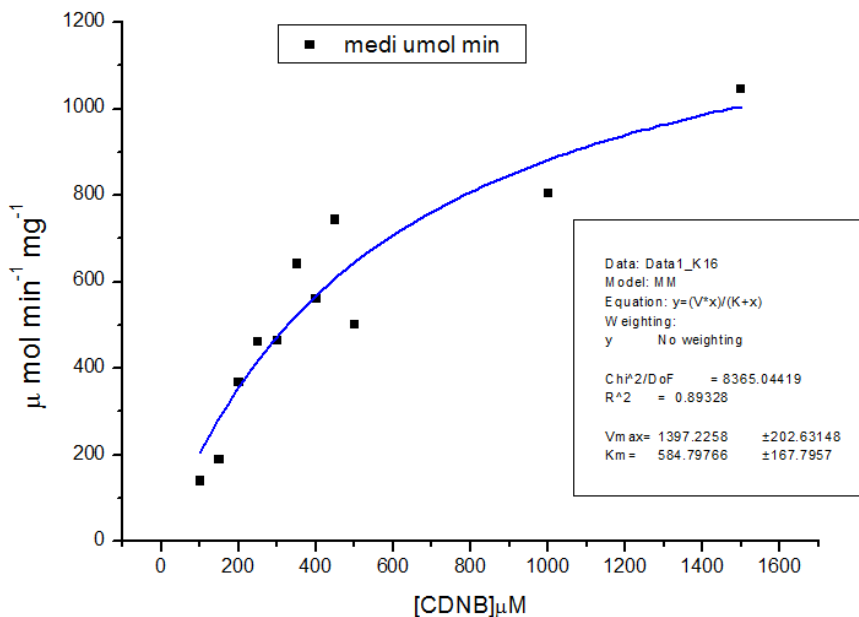


Figura 37. Comportamiento Michaeliano de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de CDNB. Los recuadros incluyen los valores de los parámetros cinéticos aparentes $V_{m\acute{a}x}$ y K_m .

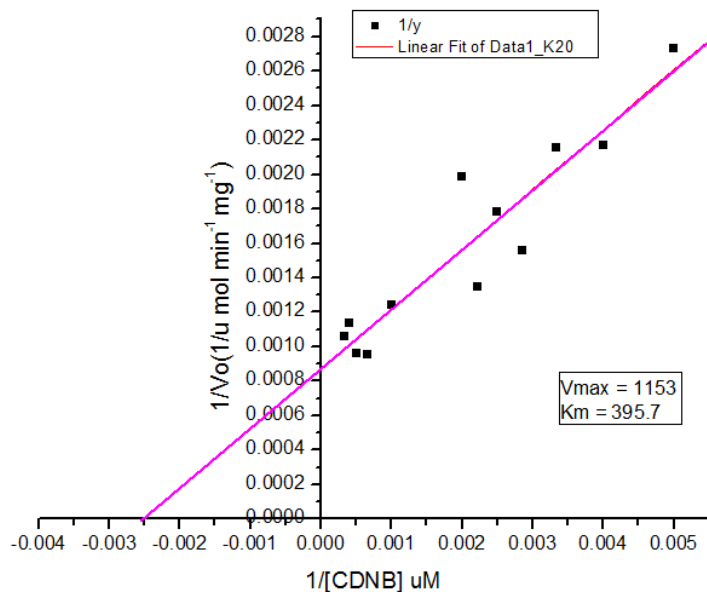


Figura 38. Diagrama de Lineweaver-Burk, obtenida de los valores recíprocos de la gráfica de Michaelis-Menten de la enzima rTcGSTcontig02741 respecto a la variación de concentración de CDNB.

Cuadro 6. Resultados de las constantes catalíticas de rTcGSTcontig02741

	Km (μM)	V max ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	Kcat (S^{-1})	Kcat/Km ($\text{M}^{-1} \text{S}^{-1}$)
rTcGSTcontig02741 sustrato CDNB	580	1397	623	1.0×10^6
rTcGSTcontig02741 sustrato GSH	240	999	446	1.8×10^6

6.13 Cuadro comparativo de las GSTs en diferentes especies

A continuación en los cuadros 7 y 8 se muestran las constantes catalíticas, pH y temperatura óptimas de reacción de diversas GSTs de distintas especies.

Cuadro 7. Constantes catalíticas de GSTs de distintas especies

GST	Km GSH (mM)	Vmax GSH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Km CDNB (mM)	Vmax CDNB ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Kcat (s^{-1}) CDNB	Kcat (s^{-1}) GSH
rAbGSTk ^a	2.95 \pm 0.28	12.77 \pm 0.29	3.81 \pm 0.30	14.35 \pm 0.30	-	-
Gsta3 ^b	0.75 \pm 0.12	3.16 \pm 0.16	1.68 \pm 0.47	7.12 \pm 0.91	37.45	16.6
TsGSTm ^d	0.00016 1	0.15	0.0145	27.9	-	-
recTs26GST _e	-	-	1.06	51.5	22.2	-
TcGST1 ^f	0.55	23	0.86	149	62.46	9.63
TcGST2 ^g	0.3	7.06	1.03	4.77	1.99	2.96
rTcGSTcontig02741	0.24	999	0.58	1397	623	446

Cuadro 8. pH y temperatura óptimos de GSTs de distintas especies

GST	pH óptimo	Temperatura óptima ($^{\circ}\text{C}$)
rAbGSTk ^a	8.0	35
Gsta3 ^b	-	-
CpGST σ 1 ^c	9.0	37
TsGSTm ^d	6.6	-
GSTTc-1 ^f	8.5	35
GSTTc-2 ^g	7.5	40
rTcGSTcontig02741	8.5-9	45

- ^a rAbGST κ : GST Clase kappa del *Haliothis discus* (Sandamalika,2018)
- ^b Gsta3: GST citosólica, clase alfa de pez cebra (Glisic, 2015)
- ^c CpGST σ 1: GST clase sigma de bivalvo de agua dulce *Cristaria plicata*. (Li, 2018)
- ^d TsGSTm: GST microsomal de *Taenia solium* (Nava, 2007)
- ^e recTs26GST: Enzima citosólica recombinante de *Taenia solium* (Torres-Rivera, 2008)
- ^f TcGST1: GST citosólica de *T. crassiceps* (Maldonado, 2017)
- ^gTcGST2: GST citosólica de *T. crassiceps* (Maldonado, 2017)

6.14 Inhibición enzimática, determinación de la constante I₅₀

En las figuras 39, 40 y 41 se presentan las gráficas del porcentaje de la actividad residual (% actividad) de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de bromosulfaleína, rosa de bengala e indometacina, respectivamente. Los valores de las I₅₀ fueron: para el bromosulfaleína = 7.8 μ M, para el Rosa de Bengala = 2.1 μ M y para la indometacina = 154 μ M. Estos valores se situaron dentro del intervalo que identifica a las GSTs de la clase μ y α .

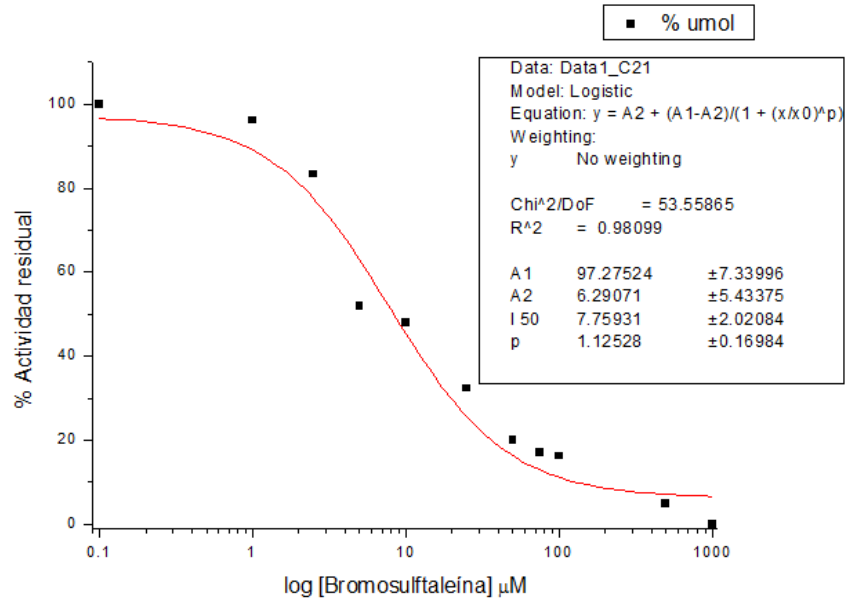


Figura 39. Porcentaje de actividad residual de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de bromosulfaleína y la I₅₀ obtenida.

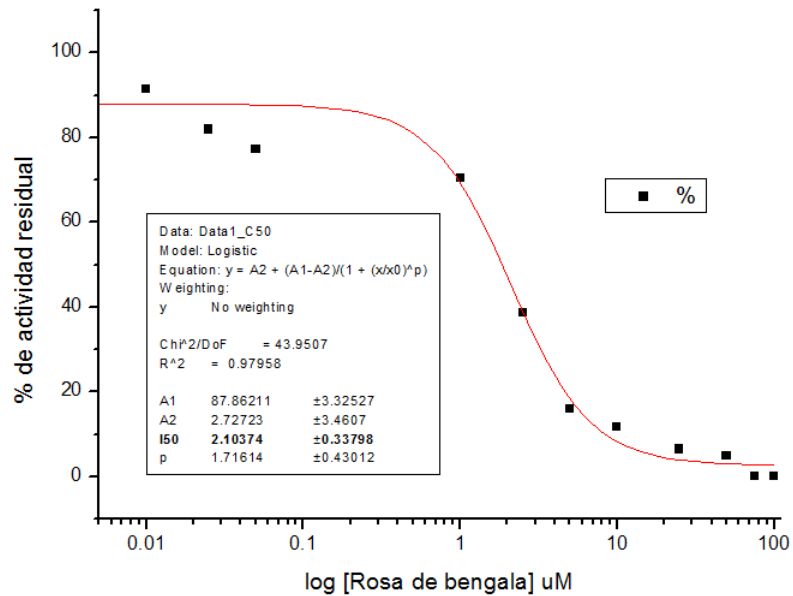


Figura 40. Porcentaje de actividad residual de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de rosa de bengala y la I₅₀ obtenida.

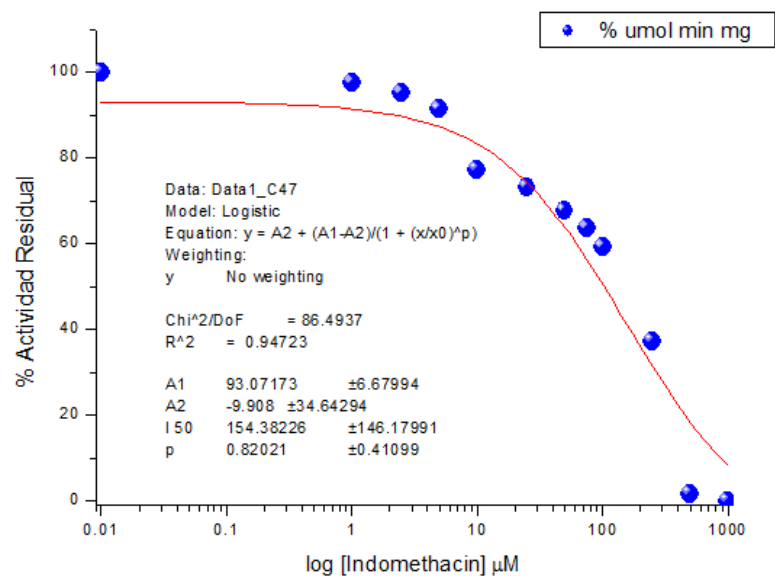


Figura 41. Porcentaje de actividad residual de la rTcGSTcontig02741 frente a las concentraciones de indometacina y la I₅₀ obtenida.

7. Discusión

El combinar los estudios genómicos y proteómicos ha permitido, en diversos organismos, traducir la estructura de un gen en su función biológica vía una proteína. Tales estudios hacen posible el análisis de los diferentes constituyentes de una célula: transcritos, proteínas y metabolitos que ayudan a deducir la función de un gen. Este conjunto de conocimientos muestra un gran potencial biotecnológico para el desarrollo de nuevas biomoléculas de importancia médica, entre otras cosas.

Las enzimas glutatión transferasas como enzimas detoxificantes han demostrado que son de importancia para animales, plantas y parásitos para sobrevivir en ambientes hostiles, así como en la generación de resistencia a pesticidas, desparasitantes y contaminación (Yamamoto et al, 2015), en este caso las GSTs son necesarias para la sobrevivencia de los cisticercos al ambiente hostil generado por el sistema inmune, por eso la importancia del estudio de dichas enzimas.

Este trabajo se enfocó en obtener tres GSTs recombinantes utilizando la información del transcriptoma de *T. crassiceps* (García-Montoya et al, 2016), amablemente proporcionada por el Dr. Alzate, del Centro Nacional de Secuenciación Genómica—CNSG, Sede de Investigación Universitaria—SIU, Universidad de Antioquia, Colombia y caracterizarlas cinéticamente.

Por otro lado, recientemente se publicó la purificación y caracterización cinética de dos GSTs nativas de *T. crassiceps* (TcGST1, TcGST2) (Maldonado, 2017). De esta manera, la información que se ha generado en este trabajo podría aclarar el número total de GSTs que existen en este cestodo y si hubiese alguna correlación entre las secuencias de los tres contigs, del grupo de Colombia, con las TcGST1 y TcGST2. La importancia también de este tipo de investigación se sustenta, por un lado, por la relevancia del modelo *T. crassiceps*-murino en diversas áreas de la biología y medicina parasitaria y por el otro, la larga historia en amplios campos de la ciencia que tienen las GSTs.

Las glutatión S-transferasas (GSTs) (E.C. 2.5.1.18) son una superfamilia de proteínas multifuncionales con papeles fundamentales en la detoxificación de una

amplia variedad de compuestos exógenos y endógenos. En plantas y animales son las principales enzimas de la Fase II de los procesos de detoxificación metabólicos. Las GSTs catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre presente en el glutatión, γ -glutamilcisteinilglicina (GSH), sobre los grupos electrofílicos de diversos compuestos xenobióticos o endobióticos, los cuales son los sustratos secundarios de estas enzimas. También, algunas GSTs detoxifican de forma pasiva al emplear su función de ligandina. Esta función consiste en unir xenobióticos y endobióticos, como ligandos no como sustratos, de manera no catalítica debido a la afinidad natural que existe entre las GST y los compuestos tóxicos mencionados.

Hasta el momento, el número de estudios sobre las GSTs en helmintos es escaso en comparación con los realizados en mamíferos, de tal forma, nuestros datos contribuirán a disminuir un poco esta distancia.

El análisis de las secuencias de nucleótidos de los Contigs: 02546, 02741 y 10408, que hasta el momento no han sido publicadas, indica que codificarían a tres proteínas con pesos moleculares teóricos de: 25,491, 25,484 y 22,035 Da respectivamente. También muestran que son GSTs por incluir los dominios conservados que se conocen para estas proteínas y la gran identidad que comparte con GSTs de otros organismos.

Con base en los datos de las secuencias mencionadas, se construyeron los oligos específicos de avance y los de reversa de cada una de las tres TcGSTs y se logró obtener sus respectivos cDNAs en cantidades suficientes para continuar su clonación.

El estudio comparativo de la alineación de las secuencias de aminoácidos obtenidas de los plásmidos de clonación con el inserto de cada una de las tres GSTs (Contigs: 02546, 02741 y 10408), mostró una diversidad de resultados.

La secuencia 02741 indica que esta proteína recombinante (rGSTcontig 02741) es una clásica GST con pesos moleculares monoméricos dentro de los valores comprendidos en la mayoría de las GSTs. Su amino terminal difiere de los aminos terminales de TcGSTcontig02546 y TcGSTcontig10408. En relación con la primera, existe entre ambas una identidad del 65%. En relación con la segunda, ésta aunque inicia con metionina y ocho aminoácidos más, el programa blast no los considera y

realiza la comparación a partir del amino ácido 41 arrojando una identidad del 99% entre ambas secuencias. La TcGSTcontig02741 fue funcional y gracias a esta propiedad se pudo expresar y caracterizar adecuadamente.

La secuencia de la GSTcontig02546, como se mencionó anteriormente, difiere de las secuencias de las otras dos TcGSTs y prácticamente toda esta recombinante se situó en los cuerpos de inclusión bacterianos cuando las células de expresión se indujeron con IPTG. Adicionalmente, la poca rTcGSTcontig02546 soluble no presentó actividad catalítica. Estos dos inconvenientes, se trataron de solucionar utilizando diversas cepas de bacterias de expresión como: Codón plus, Origami, BL21, pLysS, M15 y Tuner dependientes de arabinosa sin tener éxito.

Una probable explicación de que la TcGST02546 no se logre obtener de manera soluble es que no se regula adecuadamente su expresión aun cambiando las cepas de bacterias, la concentración de IPTG, la temperatura de expresión y demás variables que podemos regular.

La secuencia de la TcGSTcontig10408, como se mencionó anteriormente tuvo una identidad del 99% con la TcGSTcontig02741. Una explicación a este resultado podría ser la función del oligo de avance que se construyó para la TcGSTcontig10408: CCC CAT ATG ACA AGC GGT ACA ACT TTG GC el cual tiene una similitud al oligo realizado para la TcGSTcontig02741: TGG CAT ATG GCT CCG GTT CTC GGG TAT TG, además de que el oligo de reversa es igual, por lo tanto los oligos pudieron haberse unido a los mismos sitios del cDNA y dar origen al mismo gen.

En relación a la caracterización cinética llevada a cabo por la rTcGSTcontig02741, los datos revelaron que la recombinante, empleando al CDNB como sustrato secundario, desarrolló a un pH de 8.5 – 9.0 su óptima actividad específica. Este dato concuerda con la función catalítica que tienen las GSTs (Mannervik, 1988 y Brophy, 1990).

La afinidad de la rTcGSTcontig02741, desarrollada para el CDNB, fue similar o ligeramente menor comparándola con las publicadas para las GSTs de tremátodos y diversos cestodos, incluyendo las de *T. crassiceps* (O'leary y Tracy, 1988 y Brophy et al, 1989). Sin embargo, la Vmax resultó mas elevada que cualquiera de las

TcGST1 y 2 nativas. En relación con la afinidad de rTcGSTcontig02741 para el GSH ésta se mantuvo dentro de los rangos observados en otras GSTs. El valor de V_{max} para este sustrato, al igual que con el de CDNB resulto muy elevado. Esta diferencia de valores de V_{max} entre esta recombinante y los obtenidos con las formas nativas de *T. crassiceps* (Cuadro 7) puede explicarse por un lado, debido a que la obtención de una proteína recombinante resulta con una menor desnaturalización, por ser un proceso rápido, que en la obtención de una proteína nativa por ser un proceso mas lento. Por el otro lado, la proteína nativa proviene de un extracto crudo donde existe un inhibidor de la actividad para las GSTs descrito por Brophy y Barret (Brophy, P. M., Barret, J. 1990. Blocking factors and the isolation of glutathione transferase from *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). Parasitol 100: 137-141).

Adicionalmente, debido a que los valores de la actividad específica de la enzima están dentro del rango de los sustratos que caracterizan a las GSTs de la clase μ y α , podría situarse a la rTcGSTcontig02741 dentro de estas familias moleculares (Rowe et al, 1998 y Mannervik et al, 1995).

Respecto a los valores de pH y temperatura óptimos demostraron que es una proteína más estable que las formas nativas, esto debido probablemente a que el proceso de obtención de proteínas nativas es más agresivo y largo, comenzando por el descongelamiento y maceración de cisticercos, así como que las proteínas recombinantes pueden tener una estructura diferente que protege a la proteína de desnaturalización como puede ser la cantidad de residuos hidrofóbicos (Phe, Val, Ala y Thr).

Se estudió la sensibilidad de la rTcGSTcontig02741 hacia los inhibidores indometacina, rosa de bengala y bromosulfaleína. Las formas de las gráficas de la actividad residual frente a la concentración del inhibidor fueron típicas de inhibiciones lineares simples para los tres compuestos. La rTcGSTcontig02741 fue menos susceptible hacia estos inhibidores en comparación con las GSTs de *Moniezia expansa* y *Schistosoma mansoni* (Brophy, 1989). Basándose en que la rTcGSTcontig02741 tuvo valores de susceptibilidad hacia los tres inhibidores dentro del rango que caracteriza a las GSTs, tanto de la clase μ como de la clase α se

sugiere que podría clasificarse dentro de estos grupos. Algo similar también se observó con el efecto de los sustratos.

De un cultivo de 200 ml de bacterias pLysS se purificó una cantidad de 720 mg de enzima r-TcGSTcontig02741, comparado con un cultivo de 500 ml de bacterias Origami con el gen de r-TcGST 02546 del cual se obtuvo una cantidad de 10 mg de enzima.

Los logros obtenidos en este trabajo demostraron que el Contig 02741 del transcriptoma de *T. crassiceps* codifica para una glutatión transferasa funcional (rTcGSTcontig02741). Las constantes catalíticas de esta rTcGSTcontig 02741 se asemejan en general a las descritas para las GSTs de helmintos. Los datos sobre el rendimiento proteico como los catalíticos, sugieren que esta recombinante sería la misma TcGST1 obtenida de los tejidos del cestodo por procedimientos bioquímicos de purificación de proteínas (Maldonado et al, 2017).

Los datos relacionados con el Contig 10408 indicaron que aunque en el transcriptoma se referiría a una proteína diferente de la secuenciada por el Contig 02741 resultó ser la misma. Esta confirmación se obtuvo al comparar las secuencias de amino ácidos de ambas recombinantes utilizando sus plásmidos de expresión más los insertos. De esta manera se obtuvo una identidad del 99%. Por obvias razones, aunque se logró expresarla y purificarla, no se continuó con su caracterización.

Con respecto al Contig 02546 se logró clonar y expresar una proteína con un peso molecular menor al de la mayoría de las GSTs publicadas. Sin embargo, los inconvenientes de expresarse, la mayoría de ella, en cuerpos de inclusión y la poca soluble ser inactiva no se realizó su caracterización.

El conjunto de estos resultados sugieren que la información del transcriptoma de *T. crassiceps* es de gran utilidad al lograr identificar, al menos, una GST del parásito que concuerda con su existencia *in vivo*. Cuando termine de purificarse este transcriptoma y sea publicado se podrá obtener una descripción completa del número y características de las GSTs presentes en este cestodo.

8. Bibliografía

Adedolapo, Y., Olusanjo, I., Adeyemi, J. y Afolayan, A. (2015) "Some novel features of glutathione transferase from juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to lindane-contaminated water". *Perspectives in science*. Vol. 4: 62-65.

Alić, A.; Hodžić, A.; Škapur, V.; Alić A.; Prašović, S. y Duscher, G. (2017). "Fatal pulmonary cysticercosis caused by *Cysticercus longicollis* in a captive ring-tailed lemur (*Lemur catta*)". *Veterinary parasitology*. Vol. 241:1-4.

Almeida, L., Fraga, C., de Souza Lino, R. y Vinaud, M. (2014). "Partial reverse of the TCA cycle is enhanced in *Taenia crassiceps* experimental neurocysticercosis after in vivo treatment with anthelmintic drugs." *Parasitology Research*. Vol. 113(4):1313-1317.

Axarli, I.; Rigden, D. y Labrou, N. (2004) "Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I". *Biochemical Journal*. Vol. 382(Pt 3):885-93.

Bartling, D., Radzio, R., Steiner, U., y Weiler, E. (1993) "A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Molecular cloning and functional characterization." *Eur J Biochem*. Vol. 216(2):579-86.

Board, P., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermin, L., Schulte, G., Danley, D., Hoth, L., Griffor, M., Kamath, A., Rosner, M., Chrnyk, B., Perregaux, D., Gabel, C., Geoghegan, K. y Pandit, J. (2000) "Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases." *The journal of biological chemistry*. Vol. 275(32):24798-806.

Brophy, P. y Barret, J. (1990). "Glutathione transferase in helminths". *Parasitology*. Vol. 100: 345-349.

Brophy, P., Southan, Ch. & Barret, J. (1989). "Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*". *Biochem J*. Vol. 262: 939-946.

Coleman, J. O. D.; Randall, R. y Blake-Kalff, M. M. A., (1997) "Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane". *Plant, cell and environment*. Vol. 20: 449-460.

Fernández-Cañón, J. y Peñalva, M. (1998) "Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue." *Journal of biological chemistry*. Vol. 273(1):329-37.

García-Montoya, G.M., Mesa-Arango, J., Isaza-Agudelo, J., Agudelo-Lopez, S., Cabarcas, F., Barrera, L. y Alzate, J. (2016) "Transcriptome profiling of the cysticercus stage of the laboratory model *Taenia crassiceps*, strain ORF". *Acta Tropica*. Vol. 154: 50-62.

Glisic, B., Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Loncar, J., Fent, K., Kovacevic R. & Smital, T. (2015) "Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*)". *Aquatic Toxicology*. Vol.158: 50-62.

Habig, W., Pabst, M. & Jakoby, W. (1974) "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." *Journal of biological chemistry*. Vol. 249: 7130-7139.

Jensson, H., Guthenberg, C., Alin, P. y Mannervik, B. (1986) "Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals". *FEBS Lett*. Vol. 203(2):207-9.

Li, Z., Cha, Y., Hu, B., Wen, C., Jian, S., Yi, P. & Gang, Y. (2018) "Identification and characterization of two distinct sigma-class glutathione-S-transferase from freshwater bivalve *Cristaria plicata*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* . Vol. 219-220: 52-61.

Maldonado, G.; Nava, G. Y Plancarte, A. (2017) "Two glutathione transferase isoforms isolated from juvenile cysts of *Taenia crassiceps*: identification, purification and characterization." *Journal of Helminthology*. 1-9.

Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jansson, H., Tahir, M., Warholm, M. & Jornvall, H. (1995). "Identification of the three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties". *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 82: 7202-7206.

Mannervik, B. y Danielson, U. (1988) "Glutathione transferases--structure and catalytic activity". *Critical Reviews in Biochemistry*. Vol. 23(3):283-337.

Mazzetti, A.; Fiorile, M.; Primavera, A. y Lo Bello, M. (2015) "Glutathione transferases and neurodegenerative diseases". *Neurochemistry International*. Vol. 82:10-8.

Meister, A. y Anderson, M. (1983) "Glutathione". *Annual review of biochemistry*. Vol. 52: 711-760.

Mooney, K.; Spolski, R.; See, E. y Kuhn, R. (2000) "Immune destruction of larval *Taenia crassiceps* in mice." *Infection and immunity*. Vol: 68(5): 2393–2401.

Nava, G., Robert, L. & Plancarte, A. (2007) "Characterization of *Taenia solium* cysticerci microsomal glutathione S-transferase activity." *Parasitology Research*. Vol. 101: 1373–1381.

O'leary, K. & Tracy, J. (1988). "Purification of three cytosolic glutathione S-Transferases from adult *Schistosoma mansoni*". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 264: 1-12

Overton, T. (2014) "Recombinant protein production in bacterial hosts". *Drug discovery today*. Vol: 19: 590-601.

Plancarte, A., Romero, J., Nava, G., Reyes, H. y Hernández, M. (2014) "Evaluation of the non-catalytic binding function of Ts26GST a glutathione transferase isoform of *Taenia solium*." *Experimental Parasitology* . Vol. 138:63-70.

Rowe, J., Patskovsky, Y., Novikova, E. & Listowsky, I. (1998). "Rationale for recassification of a disctintive subdivisión of mammalian class Mu glutationes-transferases that are primarily expressed in testis". *J Biol Chem*. Vol. 273: 9593-9601

Sandamalika, W., Priyathilaka, T., Liyanage, D., Lee, S., Lim, H. y Lee, J. (2018) "Molecular characterization of kappa class glutathione S-transferase from the disk abalone (*Haliotis discus discus*) and changes in expression following immune and stress challenges." *Fish & shellfish immunology*. Vol. 77:252-263.

Sciutto, E., Fragoso, G., Hernández, M., Rosas, G., Martínez, J., Fleury, A., Cervantes, J., Aluja, A. y Larralde, C. (2013) "Development of the S3Pvac vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review". *Journal of Parasitology*. Vol. 99(4):686-692.

Sciutto, E.; Fragoso, G. y Larralde, C.(2011) "*Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine" En *Parasite Immunology*. Vol: 33(1):79-80.

Smith, S.; Jowsey, I. y Hayes, J. (2003) "Expression of the murine glutathione S-transferase alpha3 (GSTA3) subunit is markedly induced during adipocyte differentiation: activation of the GSTA3 gene promoter by the pro-adipogenic eicosanoid 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol: 312(4):1226-1235.

Tahir, M. & Mannervik, B. (1986) "Simple inhibition studies for distinction between homodimeric and heterodimeric isoenzymes of glutathione transferase." *Journal of biological chemistry*. Vol. 261 (3): 1048-1051.

Torres-Rivera, A. & Landa, A. (2008) "Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 477 : 372- 378.

WHO. (2015) *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on Neglected Tropical Diseases 2015*. Geneva, Suiza.

Willms, K. y Zurabian, R. (2010). "Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models". *Parasitology*. Vol. 137(3):335-46.

Wongsantichon, J., Harnnoi, T. y Ketterman, A. (2003) "A sensitive core region in the structure of glutathione S-transferases". *Biochemical Journal*. Vol. 373: 759-765.

Yamamoto, K., Higashiura, A., Hossain, M., Yamada, N., Shiotsuki, T. y Nakagawa, A. (2015) "Structural characterization of the catalytic site of a *Nilaparvata lugens* delta-class glutathionetransferase". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 566: 36-42.