

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LAS ISOFORMAS DE
GLUTATIÓN TRANSFERASA DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

GERARDO MALDONADO CUÑA

ASESOR

DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO

MÉXICO, Ciudad de México.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

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.

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | |
| 1. <i>Taenia crassiceps</i> | 3 |
| 1.2 Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> | 4 |
| 1.3 <i>Taenia crassiceps</i> como modelo de investigación..... | 5 |
| 2. Enzimas..... | 6 |
| 2.1 Enzimas detoxificantes..... | 8 |
| 3. Glutación Transferasa..... | 9 |
| 3.1 Glutación..... | 12 |
| 4. Cinética enzimática..... | 13 |
| 4.1 Ecuación de Michaelis-Menten..... | 14 |
| 5 Inhibición enzimática..... | 15 |
| 5.1 Constantes inhibitorias I_{50} , K_i | 18 |
| 6 GST en <i>Taenia crassiceps</i> | 19 |
| II. JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| III. HIPÓTESIS..... | 20 |
| IV. OBJETIVOS GENERAL..... | 20 |
| V. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 21 |
| 1 Purificación de las isoformas GSTTc-1 y GSTTc2..... | 21 |
| 1.1 Obtención del extracto crudo del metacestodo..... | 21 |
| 1.1 Cromatografía de afinidad en Sefarosa-GSH..... | 21 |
| 1.3 Concentración de las fracciones con actividad de GST..... | 22 |
| 1.4 Cuantificación de proteínas..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5 Análisis electroforético en geles desnaturizantes (PAGE-SDS), no desnaturizantes de poliacrilamida y punto isoeléctrico (pI)..... | 23 |
| 2 Ensayo enzimático de la GST..... | 24 |
| 3 pH óptimo de reacción de las GSTs..... | 24 |
| 4 Estabilidad catalítica de las GSTs en función de la temperatura..... | 25 |
| 5 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de afinidad (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (Kcat) y la constante de eficiencia catalítica (Kcat/Km)..... | 25 |
| 6 Estudios de inhibición enzimática..... | 26 |
| 6.1 Determinación de la I ₅₀ | 26 |
| 6.2 Determinación de la Ki y tipo de inhibición..... | 28 |
| VI. RESULTADOS..... | 29 |
| 1. Obtención de las isoformas GSTTc-1 y GSTTc-2..... | 29 |
| 1.2 Cromatografía de afinidad sefarosa-GSH..... | 29 |
| 2. Análisis electroforético..... | 32 |
| 3. Estudio de péptidos..... | 34 |
| 4. Caracterización bioquímica..... | 36 |
| 4.1 pH óptimo de la reacción de las GSTs..... | 36 |
| 4.2 Actividad de las enzimas en función de la temperatura..... | 37 |
| 4.3 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de Michaelis-Menten (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (Kcat) y la constante de la eficiencia catalítica (Kcat/Km)..... | 38 |
| 5. Estudio de inhibición de las GSTTc-1 y GSTTc-2..... | 40 |
| 5.1 Inhibición I ₅₀ | 40 |
| 5.2 Tipo de inhibición de GSTTc-1..... | 43 |
| 6.0 Actividad a otros sustratos..... | 45 |

| | |
|-------------------------------|-----------|
| VII DISCUSIÓN..... | 46 |
| VIII. REFERENCIAS..... | 52 |

Lista de tablas

| | | Página |
|------------------|---|--------|
| Tabla 1. | Clasificación de enzimas | 8 |
| Tabla 2. | Constantes catalíticas y características óptimas de reacción de la TcGST26.5 | 19 |
| Tabla 3 | Amortiguadores con diferentes rangos de pH | 25 |
| Tabla 4. | Concentraciones de sustratos (mM) | 26 |
| Tabla 5. | Inhibidores y sus concentraciones utilizadas | 27 |
| Tabla 6. | Concentraciones utilizadas para determinar Tipo de inhibición | 29 |
| Tabla 7. | Resumen de la purificación | 32 |
| Tabla 8. | Comparación de los valores pH y temperatura entre las GSTs de <i>T. crassiceps</i> | 38 |
| Tabla 9. | Cuadro comparativo de las GST obtenidas y GST mencionadas en Brenda database | 40 |
| Tabla 10. | I ₅₀ GSTTc-1 y GSTTc-2 | 43 |
| Tabla 11. | Resumen de los datos obtenidos de Tipo de inhibición y Ki de GSTTc-1 | 44 |
| Tabla 12. | Tabla comparativa de I ₅₀ y Ki de las enzimas purificadas de <i>T. crassiceps</i> con otros cestodos. Datos tomados de Brenda database | 45 |
| Tabla 13. | Actividad a otros sustratos | 45 |

Lista de figuras.

| | | Página |
|------------------|---|--------|
| Figura 1 | Muestra las microfotografías de los escólex de <i>Taenia crassiceps</i> y <i>Taenia solium</i> . | 3 |
| Figura 2 | Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i> | 5 |
| Figura 3 | Ciclo catalítico de las enzimas | 7 |
| Figura 4 | Estructura cristalizada del complejo GST más ácido sulfénico glutatión de <i>E. coli</i> | 10 |
| Figura 5 | Reacción catalizada por la GST. Glutatión + CDNB | 11 |
| Figura 6 | Dominios de las GST | 11 |
| Figura 7 | Glutatión | 12 |
| Figura 8 | Gráficas de Michaelis-Menten | 15 |
| Figura 9 | Grafica de doble recíprocas con un tipo de inhibición competitiva | 16 |
| Figura 10 | Gráfica de doble recíproca con un tipo de inhibición no competitiva | 17 |
| Figura 11 | Gráfica de doble recíproca con un tipo de inhibición acompetitiva | 18 |
| Figura 12 | Análisis de la cromatografía Sef-GSH | 19 |
| Figura 13 | Secuencia del proceso de purificación de las GSTs | 22 |
| Figura 14 | Resultado de la cromatografía de un extracto crudo de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en Sef-GSH. | 30 |
| Figura 15 | Resultado de la parte final de la cromatografía | 31 |
| Figura 16 | Análisis de las cTcGST-1 (P1) y cTcGST-P2 (P2) en un gel de poliacrilamida 12%. | 32 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 17 | Análisis de punto isoeléctrico y PM. GSTTc-1 (P1) y GSTTc-2 (P2). | 33 |
| Figura 18 | Análisis de péptidos de GSTTc-1 (Tc1) y GSTTc-2 (Tc2) | 35 |
| Figura 19 | Representación 3D de GST | 35 |
| Figura 20 | Efecto del pH sobre la velocidad de conjugación entre GSH y CDNB para GSTTc-1 y GSTTc-2 | 36 |
| Figura 21 | Efecto de la temperatura en la conjugación del GSH con CDNB para GSTTc-1 y GSTTc-2 | 37 |
| Figura 22 | Comportamiento Michaeliano del desarrollo de las reacciones de GSTTc-1 y GSTTc-2 | 39 |
| Figura 23 | Inhibición al 50% de la actividad catalítica de la GSTTc-1 | 41 |
| Figura 24 | Inhibición al 50% de la actividad catalítica de la GSTTc-2 | 42 |
| Figura 25 | Graficas para determinar tipo de inhibicion | 44 |

DEDICATORIA.

*A mi familiares amigos y compañeros de carrera
porque cada uno de ellos es parte de lo que soy y
lo que pretendo ser.....*

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Agustín Plancarte Crespo por haber aceptado ser tutor del servicio social y de mi proyecto de tesis, así como de su dedicación y asesoría que fue fundamental.

A la Dra. Gabriela Nava Balderas por ser parte de mi preparación y parte fundamental para la elaboración de mi trabajo.

Al Dr. Carlos Gustavo Vázquez Peláez por sus comentarios y críticas acerca de mi proyecto.

Al Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales por sus clases, comentarios y sugerencias de mi trabajo.

Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu por comentarios y críticas realizadas al presente trabajo.

Al Dr. José Gerardo Perera Marín por sus comentarios y críticas realizadas a mi trabajo.

A la Dra. Yolanda Vera Montenegro por sus comentarios y críticas realizadas en mi trabajo

Al M.C José Rodrigo Romero Díaz por la ayuda ofrecida de manera incondicional

Al Dr. Alberto Guevara-Flores por la ayuda y comentarios acerca de mi proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina UNAM, Depto. Microbiología y Parasitología, Laboratorio de inmunobioquímica de *Taenia solium*.

Este trabajo fue realizado gracias al donativo proporcionado por La Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) bajo el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT (IN211313).

A mi padre y madre por enseñarme a nunca dejar de seguir los sueños por formarme como un hombre de bien. Gracias a ustedes tengo una carrera terminada.

A mis hermanos por su apoyo incondicional.

A la MVZ Mónica Juárez por darme la oportunidad de empezar a trabajar en el ámbito veterinario.

A la Maestra Hiliana Padilla por sus consejos y apoyo mostrado durante gran parte de mi vida.

A mis amigos Elías, Miguel, José María, Giuseppe, Daniel, Erika, Carlos, Michel, y todas esas personas que compartieron un momento de su tiempo para platicar e intercambiar ideas.

Resumen

MALDONADO CUÑA GERARDO. Caracterización bioquímica y cinética de las isoformas de glutatión transferasas de cisticercos de *Taenia crassiceps*. (Bajo la dirección del Biol. Dr Agustín Plancarte Crespo).

Las enzimas glutatión transferasas (GSTs) (EC 2.5.1.18) son importantes en la fase II de detoxificación de xenobióticos e inactivación de metabolitos secundarios durante el estrés oxidativo. Es poco lo que se conoce de ellas en el cestodo *Taenia crassiceps* no obstante su relevancia como modelo experimental en el metabolismo oxidativo.

Con el interés de profundizar sobre el estudio de las GSTs en este cestodo se realizó este trabajo.

Diversas técnicas bioquímicas para purificar proteínas y procedimientos moleculares y cinéticos se emplearon para obtener en forma pura y caracterizar a este tipo de enzimas.

Se purificaron a homogeneidad dos isoformas de GSTs citosólicas: GSTTc-1 y GSTTc-2. La GSTTc-1 tiene una actividad específica de 26 U/mg usando al CDNB como sustrato. Sus valores catalíticos fueron $K_{m(\text{CDNB})} = 0.86$ y $K_{m(\text{GSH})} = 0.55$ mM y $V_{\text{max}(\text{CDNB})} = 149$ y $V_{\text{max}(\text{GSH})} = 22$ $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. La GSTTc-2 tiene una actividad específica de 19 U/mg con el CDNB. Sus valores catalíticos fueron $K_{m(\text{CDNB})} = 1.03$ y $K_{m(\text{GSH})} = 0.3$ mM y $V_{\text{max}(\text{CDNB})} = 4.7$ y $V_{\text{max}(\text{GSH})} = 77$ $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. También se realizaron estudios de inhibición catalítica indicando sensibilidades diferentes entre estas enzimas para diversos inhibidores clásicos de las GSTs.

Por análisis de péptidos las enzimas difieren entre sí por ocho amino ácidos que por su cercanía entre sí se sugiere que existe un gen para cada una de estas enzimas. En conclusión se amplió la caracterización de la GSTTc-1 y se identificó y caracterizo a una nueva transferasa GSTTc-2 en *T. crassiceps*.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE LAS ISOFORMAS DE GLUTATIÓN TRANSFERASAS DE CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*

I. Introducción.

1.1 *Taenia crassiceps*.

Taenia crassiceps es un helminto parásito del genero *Taenia*, está relacionado tanto con *Taenia solium*, el platelminto del ganado porcino como con *Taenia saginata* el correspondiente al ganado vacuno (Figura 1) Mooney K.A (2000), Willms K (2015). Su forma adulta es una cinta aplanada segmentada de varias decenas de centímetros de longitud. En un extremo de ella se encuentra el escólex y en el opuesto los proglótidos maduros. El cisticerco es la forma larvaria de este organismo y presenta una estructura ovalada de varios milímetros de diámetro, particularmente la cepa Orf presenta en su interior el escólex rodeado del líquido vesicular.

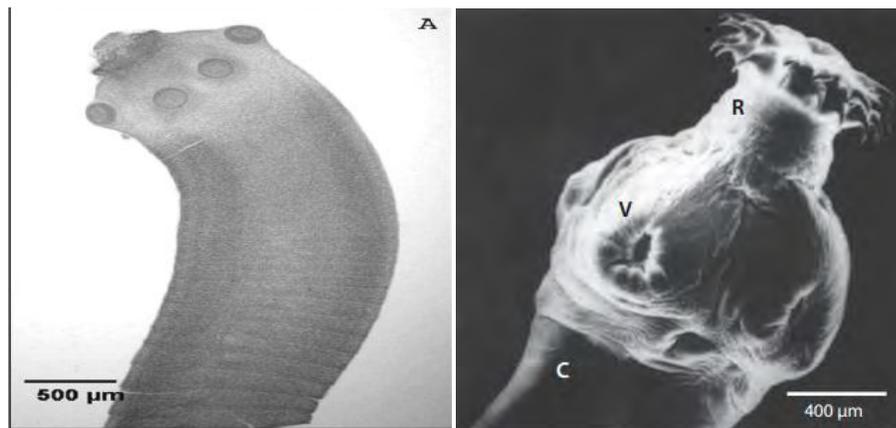


Figura 1. Muestra las microfotografías de los escólex de *Taenia crassiceps* (izquierda) y *Taenia solium* (derecha). Ambas imágenes resaltan el gran parecido anatómico de estas especies, Willms K (2015).

1.2 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

Los huéspedes definitivos de este tenido son principalmente el zorro y el perro, el parásito adulto vive en sus intestinos así sus proglótidos grávidos llenos de miles de huevos salen a través de las heces contaminando el medio ambiente. Los huevos de *T. crassiceps* son ingeridos por roedores y al llegar a su intestino delgado atraviesan el epitelio intestinal y pasan al torrente sanguíneo y linfático donde se dirigen a diversos tejidos transformándose en cisticercos Salazar V (2011). Los roedores parasitados con *T. crassiceps* al ser ingeridos por los cánidos permiten cerrar el ciclo biológico al transformarse en formas adultas en los intestinos de éstos últimos.

Por otro lado, se sabe que *T. crassiceps* puede también reproducirse en su forma larvaria de manera artificial en el peritoneo de ratones. Esta es una forma reproductiva asexual donde cada larva por gemaciones produce decenas de nuevos organismos. (Figura 2) Al infectar intraperitonealmente cisticercos de *T. crassiceps* a ratones sanos, semanas después se obtienen un número mayor de parásitos de los inicialmente infectados. Este mecanismo de reproducción hace del parásito un buen modelo experimental ya que se puede obtener grandes cantidades del mismo de forma sencilla y a un bajo costo, Mooney K.A (2000).

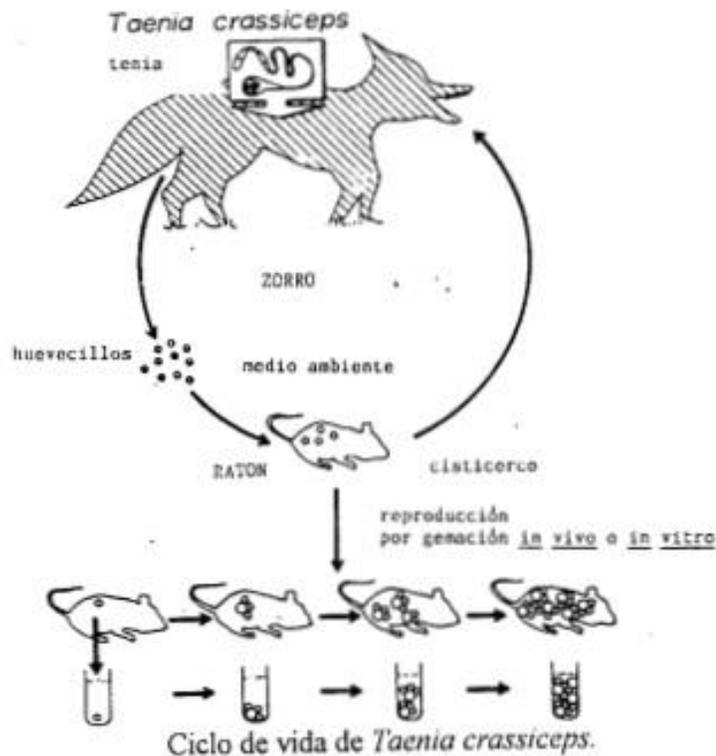


Figura 2. **Ciclo de vida de *T. crassiceps***. Imagen adaptada Rangel L (2011). El huésped definitivo es el zorro y algunos otros cánidos en ellos se desarrolla la *Taenia*. Ésta produce proglótidos grávidos llenos de huevos los cuales son expulsados en las heces del animal. Los roedores ingieren estos huevos y las formas oncosferales liberadas de las cubiertas del huevo atraviesan el intestino delgado alcanzando el torrente sanguíneo y/o linfático. Posteriormente se distribuyen en los tejidos transformándose en cisticercos. La forma de cisticerco tiene la capacidad de reproducirse asexualmente por gemación de manera artificial.

1.3 *Taenia crassiceps* como modelo de investigación.

Este modelo se ha utilizado en diferentes estudios. Se demostró que la infección de *T. crassiceps* en ratones Balb/c con cáncer colo-rectal producía una disminución del tamaño del tumor ocasionando una inmuno-modulación León S (2014). En patología se ha trabajado e intentado recrear la neurocisticercosis

humana causada por *T. solium* en ratones, además de recrear la enfermedad, un grupo diferente de investigación probó dos desparasitantes y evaluaron su efecto in vivo Mateos H et al (2012), Almeida L et al (2014). En el área de bioquímica se han purificado enzimas y se han encontrado antígenos que podrían ser útiles como vacunas ya que se ha visto que existe inmunidad cruzada Lightowlers.M (2010).

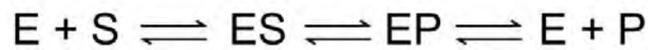
2. Enzimas.

Las enzimas son proteínas globulares que tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas, por lo que son parte fundamental de metabolismo de los organismos. La primera enzima purificada y cristalizada fue la ureasa por Sumner en 1926 esta enzima acelera 10^{14} la reacción espontánea, esta reacción es la hidrólisis de la urea Nelson D et al (2009).

Las enzimas, por lo general, son específicas de cada sustrato y tienen la capacidad de reiniciar el ciclo es decir que no dejan de funcionar tras haber realizado la catálisis, algunas enzimas no requieren más que los grupos químicos que tienen en sus residuos de aminoácidos para este fin. Existen enzimas que necesitan un elemento químico adicional llamado cofactor, este cofactor puede ser iones metálicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} , también pueden utilizar moléculas orgánicas o metaloorgánicas más complejas llamadas coenzima estas moléculas agregan grupos funcionales adicionales transitorios y la mayoría de las coenzimas son derivados de vitaminas, cuando una enzima está completa con su ion metal o

coenzima se le denomina holoenzima y la parte proteica se llama apoenzima o apoproteína Nelson D et al (2009) Murray B et al (2012).

Las propiedades catalíticas de las enzimas se debe a que tienen un sitio activo, este sitio es una zona delimitada por la proteína donde convergen grupos químicos de los residuos, donde se fija el sustrato e inicia el ciclo catalítico el cual es enzima + sustrato, enzima-sustrato, enzima-producto, enzima + producto (Figura 3) Lozano J et al (2005).



E : enzima libre
S : sustrato
ES : complejo enzima-sustrato
EP: complejo enzima producto
P : producto

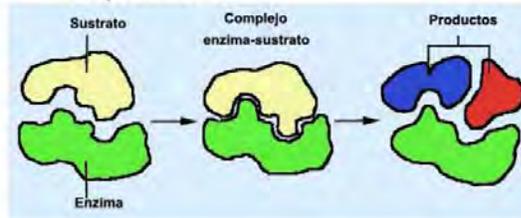


Figura 3. Ciclo catalítico de las enzimas (Imagen adaptada de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/1.4.ENZIMAS_24470.pdf 05/sep/15).

Antes se nombraban a las enzimas utilizando el nombre del sustrato más el sufijo “asa” con el paso del tiempo se fue sistematizando la nomenclatura donde se agregaba el nombre del sustrato y la reacción que hacía, como ejemplo tenemos a la glucosa oxidasa. Las enzimas se identifican, además de su nombre y la reacción, mediante un número de clasificación, fijado por la Comisión de enzimas de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada). Este número, precedido por las siglas EC, contiene cuatro dígitos, que designan la clase,

subclase, subsubclase y el número de orden de la enzima dentro de una clasificación internacional ejemplo la glucosa oxidasa tiene un numero de EC 1.1.3.4. Las enzimas se pueden clasificar por el tipo de reacción que hacen y se engloban en 6 grandes grupos: (ver tabla 1) Lozano J et al (2005) Nelson D et al (2009).

Tabla1. Clasificación de enzimas

| <i>Número</i> | <i>Clase</i> | <i>Descripción</i> |
|---------------|----------------------|---|
| 1. | Oxidoreductasas | Reacciones de oxidación-reducción (transferencia de electrones) |
| 2. | Transferasas | Transferencia de un grupo químico de un donador a un aceptor |
| 3. | Hidrolasas | Ruptura hidrolítica de algún enlace del sustrato |
| 4. | Liasas | Ruptura no hidrolítica de enlaces |
| 5. | Isomerasas | Reacciones de isomerización |
| 6. | Ligasas (sintetasas) | Formación de enlaces covalentes entre dos sustratos |

Tabla 1. En el cuadro se muestra la clasificación de las enzimas según la reacción que realiza. Adaptación Murray R et al. (2012)

2.1 Enzimas detoxificantes.

Son enzimas encargadas de limpiar al organismo de especies reactivas de oxígeno y xenobióticos, estas enzimas forman parte de un sistema detoxificante en la cual existen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Como ejemplo de estas enzimas son superóxido dismutasa, peroxirredoxina, glutatión oxidasa, tiorredoxina reductasa y glutatión transferasa. Tracy W et al (1995).

3 Glutación Transferasa.

Las glutatión transferasas (GSTs) (EC 2.5.1.18) representan el principal grupo de enzimas detoxificantes de xenobióticos en todas las especies de eucariontes (Figura 4). Éstas poseen múltiples isoformas de GSTs citosólicas, mitocondriales y microsomales. Estas enzimas catalizan el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH) sobre compuestos no polares que contienen un carbón, nitrógeno o átomo de azufre electrofílico. Sus sustratos incluyen halogenonitrobenzenos, oxidos de arenos, quinonas y carbonilos α , β insaturados Keen J et al (1978). Existen tres familias de GSTs, las citosólicas, las mitocondriales que comprenden enzimas solubles y están distantemente relacionadas Mannervik B et al (1995) y las GSTs microsomales, llamadas proteínas asociadas a membranas relacionadas con el metabolismo de eicosanoides y glutatión (MAPEG)

Las GSTs citosólicas representan la familia más grande de estas transferasas, con base en las similitudes de sus secuencias de aminoácidos se han clasificado en los mamíferos en ocho diferentes clases: α , μ , π , σ , ω , θ , ψ , ζ Jakobsoon P et al (1999). En organismos diferentes de los mamíferos existen las clases: β , δ , ϵ , λ , φ , τ , e , υ . Se ha encontrado que la secuencia de aminoácidos entre GSTs de la misma clase tiene una similitud mayor al 40% y tan solo del 25% o menos cuando la comparación es con GSTs de diferente clase Alin P et al (1985), Mannervik B et al (1992).

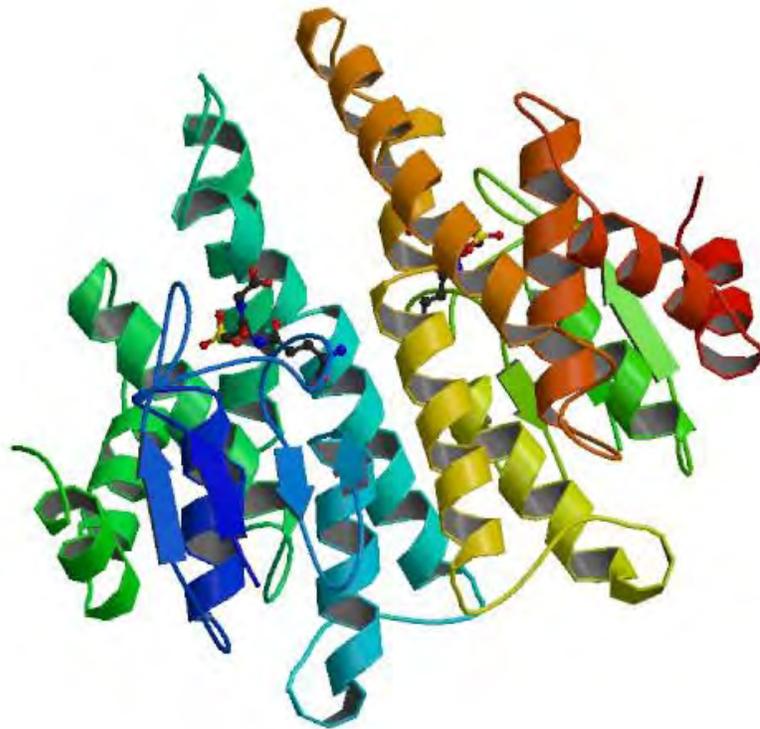


Figura 4. Estructura cristalizada del complejo GST más ácido sulfénico glutati6n de *E. coli*
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1A0F>.

La estructura general de las GSTs consiste en dos dominios N y C Terminal, Las GSTs suelen formar d6meros con subunidades de 24.4 a 26.5 KDa el cual se describe como la mol6cula catal6ticamente activa, no se ha descrito actividad catal6tica en los mon6meros de las GSTs de mam6feros Hern6ndez M et al (2009 y 2012).

Las GSTs reconocen espec6ficamente a sustratos electrof6licos, como el 1,4-clorodinitrobenzeno (CDNB). El dominio C-terminal es el encargado de alojar el sustrato electrof6lico y est6 formado b6sicamente por h6lices α . El

número de hélices varía entre las diferentes clases, estas hélices le brindan un ambiente hidrofóbico para la estabilidad del sustrato dentro del dominio (figura 5). Algunas enzimas utilizan el grupo hidroxilo del residuo de serina, treonina o cisteína localizados entre la lámina $\beta 4$ y la hélice $\alpha 3$ que están directamente relacionadas con el reconocimiento de la porción Y-glutamil del GSH ver Herver M et al (2013) (figura 6).

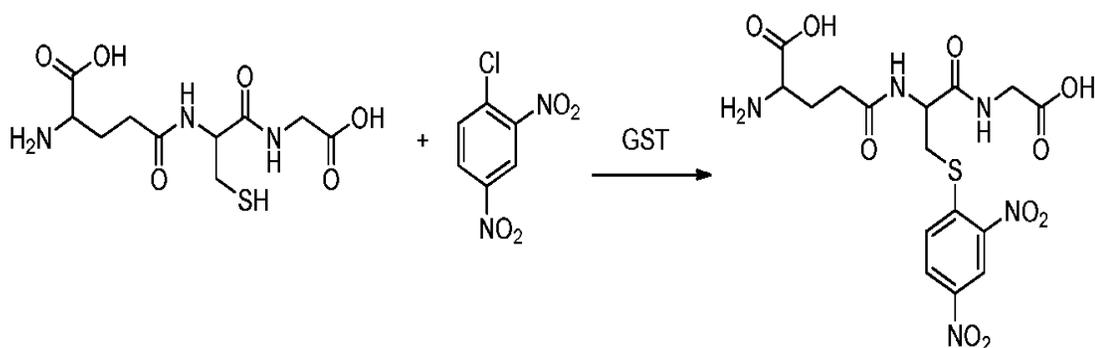


Figura 5. Reacción catalizada por la GST. Glutati6n + CDNB (1, 4, clorodinitrobenzeno) + GST = S-(2,4-dinitrofenil) glutathione + HCl.

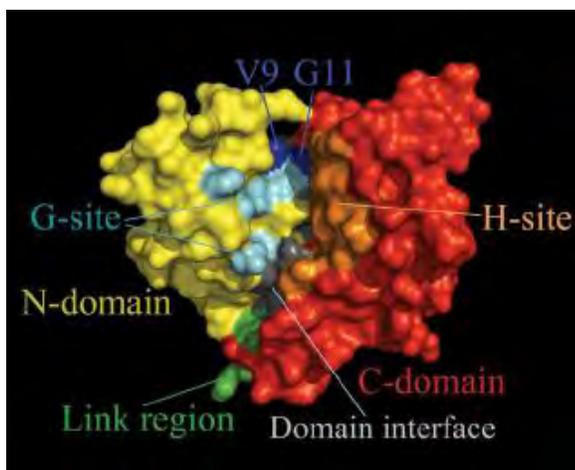


Figura 6. Dominios de las GST. En la imagen se muestra los dominios N y C que conforman a las GSTs en los cuales se encuentran los sitios donde se acopla el GSH sitio-G y las mol6culas hidrof6bicas sitio-H, adaptada Hern6ndez M et al (2009).

Las GSTs tienen la capacidad de unir ligandos de manera no catalítica, es decir en un sitio diferente del sitio activo, por este motivo originalmente las GSTs fueron denominadas ligandinas al descubrirse entre 1967 y 1969 que tenían la capacidad de unirse a los ácidos biliares, las GSTs tienen la capacidad de unir tantos ligandos que se sugiere que tienen una función similar a la albúmina pero en el citoplasma Hernández M et al (2009)

3.1 Glutión.

El glutión (γ -L-glutamyl-L-cisteinil glicina) es un tripéptido constituido por tres residuos de amoniácidos, Ácido glutámico, cisteína y glicina (Figura 7), sintetizado por dos enzimas γ -glutamyl-cisteina sintetasa y la Glutión sintetasa, ambas enzimas utilizan como co-sustrato ATP. Zhang X et al (2014), Martínez J, et al (2011)

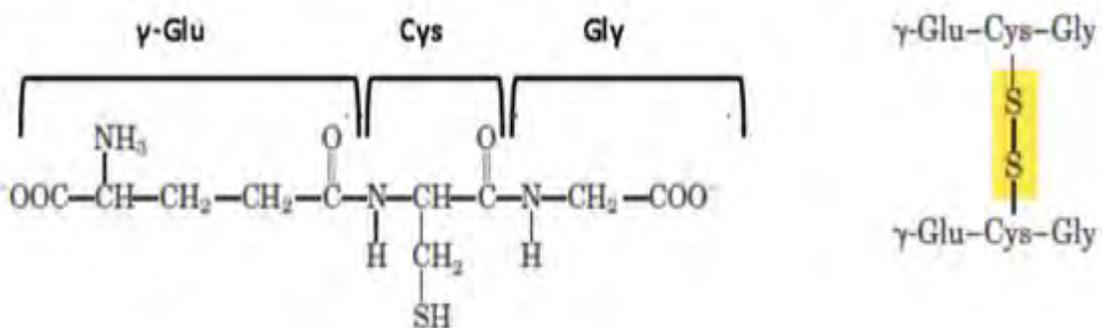


Figura 7. Glutión. Tomada de Jesús Martínez-Sámano, Patricia Victoria Torres-Durán, Marco Antonio Juárez-Oropeza. E. Glutión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. REB 30(2): 56-67, 2011.

Las funciones del glutatión son detoxificación de xenobióticos por medio de la enzima GST, mantenimiento del balance redox intracelular, función antioxidante, transporte y almacenamiento de cisteína y regulación de crecimiento y muerte celular Ballatori N et al (2009) y Denzoin L (2013).

4 Cinética enzimática.

La cinética enzimática permite conocer las características catalíticas de las diferentes enzimas, esta información es importante para conocer su mecanismo de reacción incluyendo sus etapas y secuencias de las mismas, así como su especificidad por el o los sustratos. Además permite modificar variables como pH y temperatura para poder determinar cuáles son los valores óptimos para su reacción Morgesten R et al (1985).

Cuando un ensayo enzimático se realiza con una cantidad de enzima constante y sustrato variable (de menor a mayor cantidad) se obtiene la gráfica de Michaelis-Menten (Figura 8). En ella se identifican la constante de afinidad (K_m) y la velocidad máxima de reacción (V_{max}) Herver M et al (2013). La K_m es definida también como el valor de la concentración del sustrato donde se alcanza la mitad de la V_{max} . Por lo tanto, cuanto menor es el valor de K_m , mayor es la afinidad de la enzima por su sustrato. Así, la V_{max} es velocidad máxima teórica o cuando todos los sitios activos de la enzima están ocupados con sustrato.

Otra constante catalítica importante es el número de recambio (K_{cat}) o número de moléculas de sustrato convertidas en producto por molécula de enzima por unidad de tiempo, en condiciones de saturación de sustrato.

4.1 Ecuación Michaelis-Menten.

La teoría de Michaelis-Menten, habla del efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada. Así, la enzima E se combina con el sustrato S, formando el complejo ES, el cual se disocia dando lugar a enzima libre y producto P, siendo todos estos pasos reversibles Nava G et al (2011).



Muchas enzimas catalizan reacciones con dos sustratos que se influyen mutuamente, el análisis cinético para estas reacciones se simboliza por la ecuación:



Donde pueden existir varios complejos enzima–sustrato (EA, EB, EP, EQ, EAB, EPQ, EPB). La determinación de K_m y V_{max} , en este sistema, es semejante al utilizado en la reacciones con un solo sustrato. Esto es, se mantiene uno de los sustratos a concentración constante y saturante y el otro a concentración variable y posteriormente se invierte el orden.

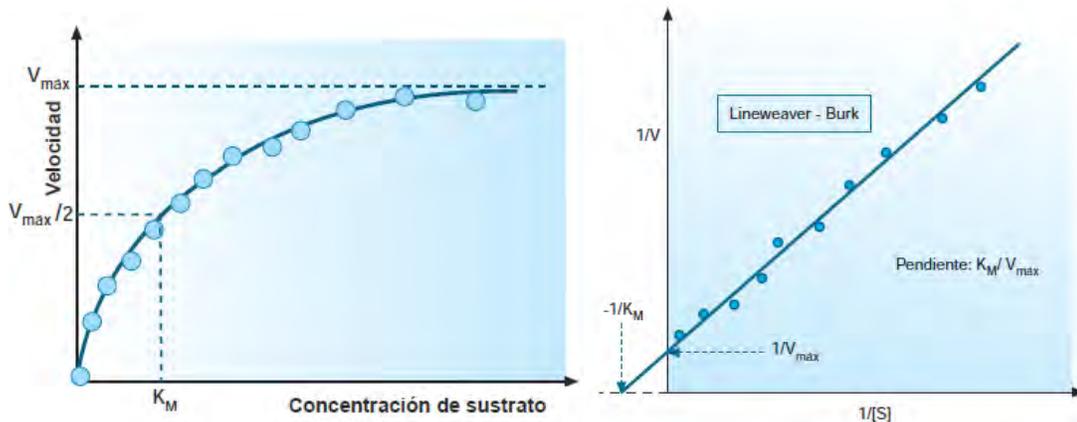


Figura 8. **Gráficas de Michaelis-Menten.** Del lado izquierdo se muestra una gráfica de Michaelis-Menten donde se puede observar el comportamiento catalítico de una enzima. Al principio se tiene un incremento del producto en forma proporcional a la cantidad de sustrato agregado, pero al aumentar la cantidad de sustrato el sistema se satura y la línea deja de ser proporcional (V_{\max}). Del lado derecho se observa una gráfica de Lineweaver-Burk o de doble inversa de la gráfica anterior donde se obtienen los valores K_M y V_{\max} de manera lineal (Imagen adaptada Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud).

5. Inhibición enzimática.

5.1 Tipos de inhibición.

El efecto de un inhibidor enzimático es disminuir la velocidad de reacción catalítica al unirse a la enzima. Este tipo de estudios permite dilucidar el mecanismo y los cambios de la catálisis enzimática, así como la naturaleza de los grupos funcionales. Existen diferentes tipos de inhibición:

Inhibidores Irreversibles: son aquellos que forman enlaces covalentes e inactivan permanentemente a la enzima.

Inhibidores reversibles: La unión del inhibidor a la enzima se puede revertir y al quitar el inhibidor del medio, la enzima toma su forma nativa y por lo tanto su actividad intrínseca.

Existen varios tipos de inhibiciones reversibles:

Inhibición competitiva:

El inhibidor posee una estructura parecida al sustrato y al unirse al sitio activo de la enzima interfiere con la unión del sustrato. En este tipo de inhibición la K_m es mayor y la V_{max} no se modifica, por lo tanto el inhibidor no interfiere con la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato. Cuando se aumenta la cantidad de sustrato en este tipo de reacciones, éste es capaz de desplazar al inhibidor. En graficas doble recíprocas (Figura 9) se puede observar que las líneas se interceptan en la ordenada de las X lo que significa que el valor que cambia es K_m . Nava G et al (2007) Torres A. et al (2008).

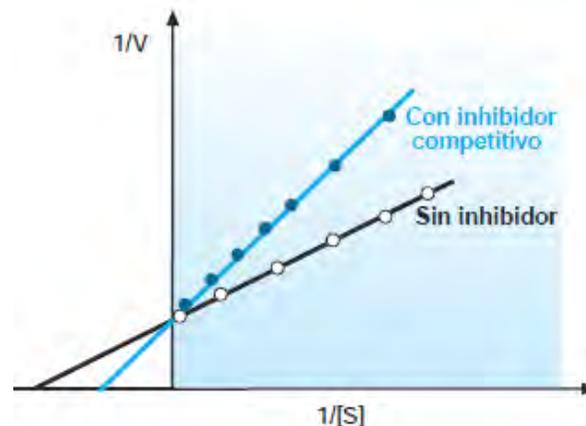


Figura 9. Grafica de doble recíprocas con un tipo de inhibición competitiva Lozano J et al (2005).

Inhibición no competitiva:

En este tipo de inhibición el inhibidor se une en un lugar de la enzima distinto al sitio activo y al unirse le provoca un cambio conformacional que evita la formación del complejo enzima sustrato [ES]. Sus efectos inhibitorios no se anulan al aumentar la concentración de sustrato y en este tipo de inhibición se producen dos tipos de formas inactivas de la enzima [EI] [ESI]. En la inhibición no competitiva se ve disminuida la V_{max} y la K_m no se modifica. En gráficas de doble recíproca las líneas de la reacción catalítica cruzan en la ordenada con valores diferentes indicando la modificación de V_{max} (Figura 10).

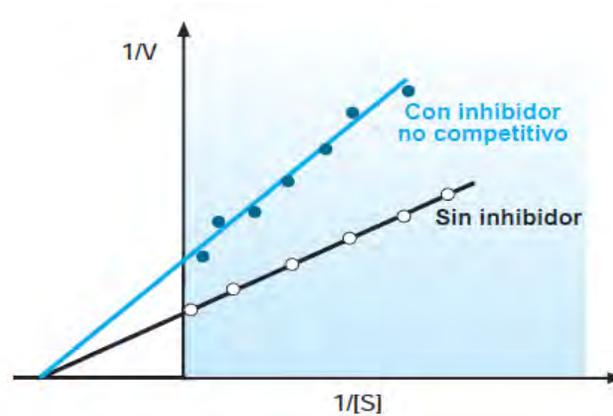


Figura 10. En la imagen se observa una gráfica de doble recíproca con un tipo de inhibición no competitiva.

Inhibición acompetitiva.

La inhibición acompetitiva sucede cuando el inhibidor se fija al complejo $[ES] + [I] = [ESI]$ provocando que no exista la transformación hacia los productos y disminuye la velocidad de reacción, este tipo de complejo disminuye tanto K_m y

V_{max} . En gráficas de doble recíprocas se aprecian líneas paralelas en los distintos ensayos (Figura 11).

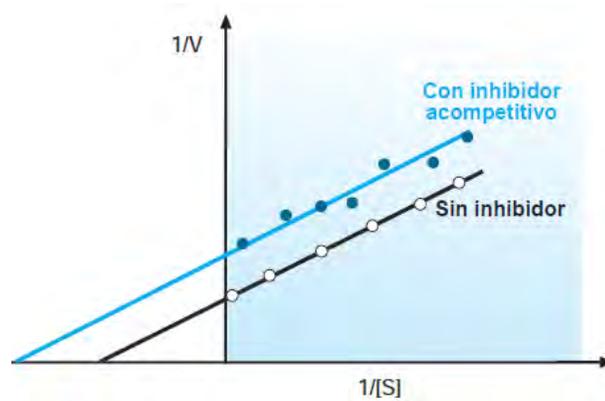


Figura 11. Gráfica de doble recíproca con un tipo de inhibición acompetitiva.

5.1 Constantes inhibitorias (I_{50} , K_i).

La manera más sencilla de evaluar el efecto inhibitorio de una molécula sobre una enzima es determinar el valor de la concentración del inhibidor que inhiba el 50% de la reacción catalítica (I_{50}). Posteriormente, este valor será utilizado como referencia de la concentración del inhibidor para realizar los ensayos enzimáticos enfocados a determinar las constantes inhibitorias (K_i) que una enzima presente para un inhibidor en particular y el tipo de inhibición que el inhibidor desarrolle sobre la enzima Murray B et al (2012), Nava G et al (2007) Habig W et al (1974).

6. GST en *T. crassiceps* (GSTTc)

Anteriormente se ha parcialmente caracterizado a la enzima tanto para su función catalítica como para su función de ligandina (fig. 12), (tabla 2), Hernandez M et al (2012), Romero R (2015).

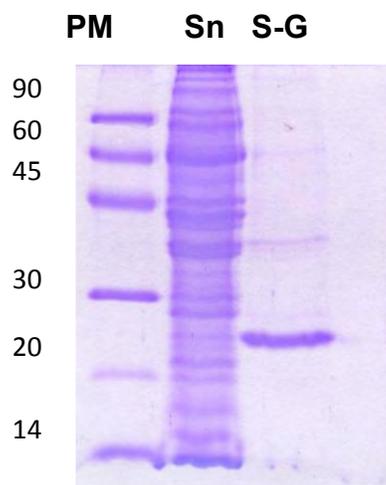


Figura 12. Análisis de la cromatografía Sef-GSH. Análisis comparativo de la fracción sobrenadante (Sn) o extracto crudo y TcGST26.5 (S-G) en PAGE-SDS al 12%, control de pesos moleculares (PM) Romero R (2015).

Tabla 2. Constantes catalíticas y características óptimas de reacción de la TcGST26.5 (Hernández M., 2009 Rev Ibero-latinoamericana 150-158).

| | Km (mM) | Vmax (μMol/min/mg) | pH | Temperatura | I₅₀ (μMol) | Tipo de Inhibición |
|----------------|--------------------|--|------------|--------------------|---|-------------------------------|
| 26.5GST cTc | 0.36 | 0.79 | 7.5 | 10-35 C° | 0.1 Hematina | No competitiva |
| | | | | | 0.53 BST | No competitiva |

BST: bromosulfaleina

II. Justificación

El modelo experimental *T. crassiceps* es utilizado ampliamente en muchos temas de interés biomédico, como son el uso de sus antígenos con propiedades profilácticas contra la neurocisticercosis humana debida a *T. solium* Almeida L et al (2014) , Lightowlers.M (2010). La regulación de la respuesta inmune contra el cáncer y la evaluación del efecto farmacológico de diversos cestocidas León S (2014), Mateos H et al (2012). Sin embargo, existe escasa información sobre las GSTs en *T. crassiceps*, no obstante que estas enzimas multifuncionales podrían participar en las propiedades profilácticas y regulatorias de este cestodo. Adicionalmente, todos los organismos estudiados sobre las GSTs presentan diversas isoformas de esta enzima

III. Hipótesis

En los tejidos de los cisticercos de *T. crassiceps* existe más de una isoforma de GST.

IV. Objetivos.

Objetivo general

- Demostrar por procedimientos bioquímicos la presencia de isoformas solubles de GST en *T. crassiceps*.

Objetivo específico

- Purificar las diversas GSTs que se identifiquen.
- Caracterizar bioquímica y cinéticamente a las GSTs identificadas.
- Comparar entre si las propiedades fisicoquímicas y cinéticas de las GSTs purificadas.

V. Material y métodos.

1. Purificación de las isoformas GSTTc-1 y GSTTc-2.

1.1 Obtención del extracto crudo del metacestodo.

Sesenta ml de cisticercos se homogenizaron en 10 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, NaCL 0.15 M (pH 7.2) (PBS), empleando un triturador de tejidos de la marca Polytron (Brinkam Instruments). Este procedimiento consistió en macerarlos con pulsos de 15,000 rpm durante un minuto y descansos de otro minuto, repitiendo esto tres veces. El homogenizado se centrifugo a 105,000 g / 45 min / 8° C, el precipitado se descarta y el sobrenadante, nombrando sobrenadante (Sn), se recuperó y filtró utilizando una membrana de 0.45 µm para continuar con el proceso de purificación.

1.2 Cromatografía de afinidad en Sefarosa-GSH.

Cuarenta mililitros del Sn se filtraron por una columna de Sefarosa-glutación (3 cm x 41 cm) (Pharmacia biochem) equilibrada en PBS, el volumen de resina ocupado fue de 42 ml. La velocidad de flujo fue 0.25 ml/min y el volumen de cada fracción de 4 ml. Las proteínas que no se adsorbieron a la resina se lavaron de la columna

con 300 ml de PBS. En forma continua las GSTs fueron eluidas de la resina con un gradiente de GSH (0 - 5 mM) en Tris-HCL (pH 8) y el cambio del flujo fue de 1 ml/min. El desempeño cromatográfico de las proteínas se registraron a 280 nm empleando un espectrofotómetro BioRad Biologic LP y se analizó su actividad catalítica siguiendo el método de Habig et al (1974) (figura 13) para este proceso se utilizó un cromatógrafo biologic LP de Bio-rad.



Figura 13. Secuencia del proceso de purificación de las GSTs.

1.3 Concentración de las fracciones con actividad de GST.

Una vez determinadas las fracciones cromatográficas con actividad enzimática se colectaron y concentraron en un sistema de filtración con presión negativa (nitrógeno gaseoso) (Amicon Millipore) a 4° C además dializaron todas las fracciones determinadas.

1.4 Cuantificación de proteínas.

Se determinó por espectrofotometría a 280 nm (A_{280}). Una alícuota de las fracciones a cuantificar se leen en el espectrofotómetro BioRad Biologic LP a una longitud de onda de 280 nm usando diversas diluciones en PBS. El resultado que se obtuvo se multiplicó por el coeficiente de extinción de la proteína ($\epsilon = 1.454$) y por el factor de dilución y así se obtuvo la cantidad de proteínas en mg/ml Torres A et al (2008).

1.5 Análisis electroforético en geles desnaturizantes (PAGE-SDS), no desnaturizantes y punto isoeléctrico (pI).

Siguiendo el procedimiento de Laemmli y utilizando el sistema protean II (Bio-Rad) se analizó el nivel de purificación y determinó el peso molecular de las isoformas de GST. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con sulfatododecil de sodio (SDS), para geles desnaturizantes y sin SDS para geles no desnaturizantes, se realizaron con alícuotas de las proteínas de interés (1-20 μg) más 5 μl de coctel de corrida. Simultáneamente y en carriles vecinos al de la muestras se emplearon alícuotas de marcadores de pesos moleculares conocidos (Amersham Biosciences 17-0446-01) para determinar el factor de movilidad relativa (M_r). Este factor indica separación de moléculas según la movilidad de éstas en la electroforesis y al comparar el M_r de los controles con el de los experimentales se conoce el peso molecular de estos últimos. Al finalizar la electroforesis los geles se tiñeron utilizando azul de Coomassie o nitrato de plata Laemmli, V. (1970). Para determinar el punto isoeléctrico de las enzimas se

realizó un gel de poliacrilamida al 5% mas la presencia de solución de anfolito pH 3.5- 10 y solución de anfolito pH 5-7 las soluciones, de corrida utilizados fueron para la cámara superior hidróxido de sodio 20 mM y para la cámara inferior ácido fosfórico 10 mM, se aplico 200 V por 1.5 hrs y después de 400 V por 1.5 horas. Estos geles se tiñeron con plata.

2. Ensayo enzimático de la GST.

La evaluación de la actividad enzimática específica para GST, se obtuvo por el método de Habig y col tomado de Nava G (2011). Para este fin se emplearon los sustratos glutatión reducido (GSH) a 1 mM y 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) a 1 mM. Se mezcló 40 UI de las fracciones cromatográficas en amortiguador de ensayo formado de (K_2HPO_4) 100 Mm (Ph 6.5), EDTA 1 Mm. La reacción se inició al agregar el CDNB en la celda de ensayo en un mililitro de volumen final. El cambio de absorbancia se registró a 340 nm BioRad Biologic LP durante dos minutos utilizando un espectrofotómetro (Pharmacia biotch modelo Ultrospec 3100 Pro). El control negativo presentó todos los reactivos descritos, excepto la enzima. Los valores de los controles negativos fueron restados a los valores experimentales.

3 pH óptimo de reacción de las GSTs.

Para determinar el pH óptimo de reacción se llevó a cabo un ensayo enzimático (Habig, W, y col. 1974) antes descrito, variando el amortiguador de ensayo del pH a evaluar (Tabla 3).

Tabla 3. Amortiguadores con diferentes rangos de pH

| Amortiguador | pH |
|---|---|
| 50 Mm citrato de sodio – 50 Mm ácido cítrico | 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 |
| 50 Mm de fosfato de sodio monobásico-dibásico | 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 |
| 50 Mm Tris – HCL | 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0 |

4 Estabilidad catalítica de las GSTs en función de la temperatura.

La estabilidad catalítica de las GSTs a diferentes temperaturas se determinó por ensayos de velocidad inicial de la reacción Habig, W et al. (1974). Cada reacción utilizó una alícuota de enzima (0.5 – 4 μg) mezclada en amortiguador de ensayo y se incubó por 5 minutos a una temperatura específica (5 – 70°C). Inmediatamente después se realizaron las cinéticas adicionando los sustratos y registrando el cambio de absorbancia a 340 nm por dos minutos.

5 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de afinidad (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (Kcat) y la constante de eficiencia catalítica (Kcat/Km).

Para determinar las constantes catalíticas de las enzimas para el GSH y CDNB se realizaron diversos ensayos de la velocidad inicial catalizados por las enzimas y evaluados espectrofotométricamente a 340 nm Habig W et al (1974). Para este fin, se mantuvo fija la concentración de la enzima (0.4 μg) y a saturación la del CDNB (10 mM), mientras que la concentración del GSH se varió en un intervalo de 0.025 a 4 mM (Tabla 4). Para determinar las constantes correspondientes para

el CDNB, se realizaron ensayos similares a los anteriores variando la concentración del CDNB en un intervalo de 0.025 a 2 mM, manteniendo a saturación la del GSH (1mM).

Tabla 4. Concentraciones de sustratos (mM)

| CDNB | GSH |
|-------|-------|
| 0.025 | 0.001 |
| 0.050 | .0025 |
| 0.075 | 0.050 |
| 0.1 | 0.075 |
| 0.25 | 0.1 |
| 0.5 | 0.25 |
| 0.75 | 0.5 |
| 1 | 0.75 |
| 1.5 | 1 |
| 2 | 1.5 |
| | 2 |
| | 4 |

Nota: en cada ensayo cada concentración de CDNB se combinó con GSH a 1 mM, y cada concentración de GSH se combinó con CDNB a 10 mM.

6. Estudios de inhibición enzimática.

6.1 Determinación de la constante I_{50} .

La I_{50} es el valor de la concentración de un inhibidor que produce el 50% de la inhibición catalítica para una enzima. Para determinar los valores I_{50} de diversos compuestos inhibitorios tradicionales para las GSTs sobre las transferasas de *T. crassiceps* se realizó el procedimiento descrito por Tahir y Mannervik tomado de Laemmli, V. et al (1970) empleando al CDNB como sustrato. Los inhibidores

utilizados fueron: rosa de bengala (Rb), indometacina (Ind), azul de cibacrón (Ac) y bromosulfaleina(BST).

Los ensayos de inhibición de la velocidad inicial de la reacción utilizaron diferentes concentraciones para cada uno de los inhibidores (ver tabla 5) en una mezcla de reacción formada de 0.5 - 4 µg de proteína en amortiguador de ensayo, 1µM de GSH, 1 mM de CDNB. El volumen final de reacción fue de 1 ml, ésta se inició al adicionar el CDNB y su desarrollo se monitoreó tomando lecturas a 340 nm durante 2-3 minutos.

Los datos obtenidos para cada inhibidor se graficaron como el porcentaje de la actividad residual frente al logaritmo de la concentración del inhibidor. El valor de la I₅₀ se calculó, por un lado, extrapolando del eje de las ordenadas el valor al 50% hacia el eje de las abscisas o concentraciones de inhibidor y por otro lado, utilizando la ecuación correspondiente incluida en el programa Origin (MicroCal, Inc., Northampton, MA).

Tabla 5. Inhibidores y sus concentraciones utilizadas

| Inhibidor | Concentración µM | | | | | | | | | | |
|------------------|------------------|-------|------|-----|------|-------|-----|------|----|--|--|
| Rosa de Bengala | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 10000 | | | | | |
| Indometacina | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 10000 | | | | | |
| Bromosulfaleina | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 10000 | | | | | |
| Azul de cibacrón | 0.0001 | 0.001 | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 | 1000 | 10 | | |

6.2 Determinación de la K_i y tipo de inhibición.

El tipo de inhibición que cada inhibidor (RB, Ind, AC, BST) efectuó sobre las enzimas fue estudiado por medio de sistemas de inhibición simple. El procedimiento para llevarlos a cabo consistió en obtener los datos de las velocidades iniciales de la enzima influida por las sustancias inhibitorias. Para evaluar al AC se mezclaron la enzima (0.3 μg), el GSH (1 mM), AC a 1 y 5 μM en el amortiguador de ensayo, después de 5 minutos se inició la reacción enzimática al añadir una de las siguientes concentraciones de CDNB 25, 50, 75, 100, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 mM, el volumen de la reacción fue de 1 mL. El registro espectrofotométrico del ensayo a 340 nm se realizó durante 2 minutos. El conjunto de datos generados de esta forma sirvió para construir una recta en un sistema de Lineweaver-Burk, donde se graficó el inverso de la velocidad inicial frente al inverso de la concentración de CDNB, de tal forma que la recta representa el inverso de la velocidad inicial de cada una de las enzimas para la concentración de 1 μM de AC. Se construyó otra recta de este tipo para el AC pero con la concentración de 5 μM y otra más en ausencia de inhibidor. Para conocer el tipo de inhibición que ejerció el BST sobre las enzimas, se repitió todo el procedimiento anterior, pero empleando las concentraciones de 500 y 1000 μM para el BST y las mismas concentraciones para el CDNB. De manera similar para el Ind sus concentraciones fueron de 1000 y 2000 μM , y las del CDNB igual a AC y BST. Para RB es el mismo procedimiento descrito con los otros inhibidores pero se utilizó una concentración de 20 y 50 μM .

El comportamiento de las rectas, por el patrón de intersección tanto en el eje de las ordenadas como en el de las abscisas, definió el tipo de inhibición. Los valores de las constantes inhibitorias (K_i) para AC, BST, Ind y RB se calcularon al re-graficar los valores de los interceptos en el eje de las ordenadas, originados de la primera grafica de Lineweaver-Burk frente a la concentración del inhibidor correspondiente Tahir M et al (1985).

Tabla 6. Concentraciones utilizadas para determinar Tipo de inhibición.

| Ligando | Concentración del ligando |
|------------------|----------------------------------|
| Rosa de Bengala | 20, 50 (μM) |
| Indometacina | 1000, 2000 (μM) |
| Azul de Cibacrón | 1, 5 (μM) |
| Bromosulfaleina | 500, 1000 (μM) |

VI. Resultados.

1. Obtención de las isoformas GSTTc-1 y GSTTc-2.

1.2 Cromatografía de afinidad sefarosa-GSH.

La figura 14 muestra el perfil cromatográfico de la fracción Sn de *T. crassiceps* en una cromatografía de afinidad (Sefarosa-GSH). Claramente se observan dos picos cromatográficos, uno compuesto por las fracciones 9 – 35, fracción excluida y el formado por las fracciones 93 – 147 o fracción eluida. Cabe mencionar que el eluído se agrego en forma de gradiente (0-5mM) y se aprecia el inicio del mismo

cuando la conductividad baja y su fin cuando la conductividad se eleva. Este resultado fue reiterativo en trece cromatografías realizadas bajo las mismas condiciones experimentales.

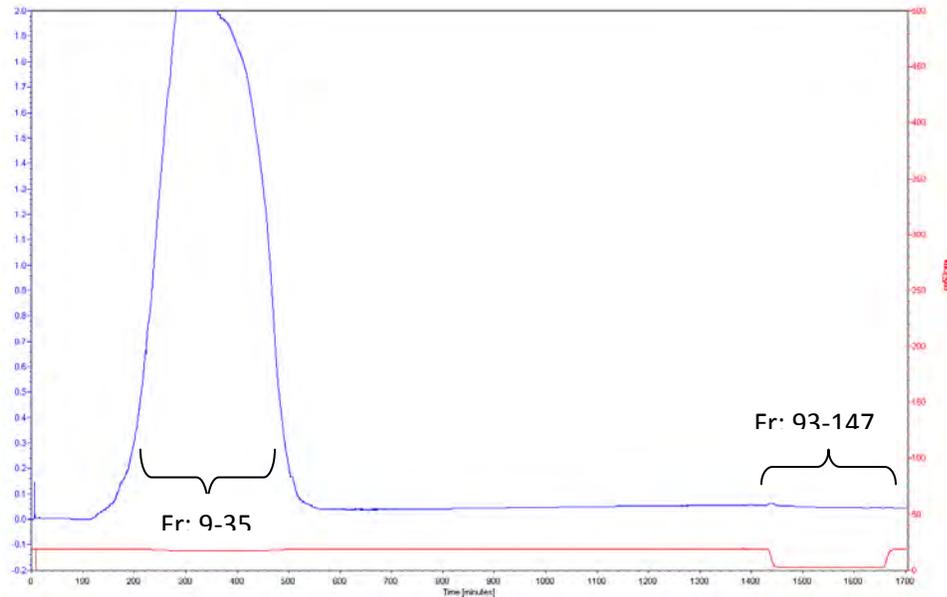


Figura 14. Resultado de la cromatografía de un extracto crudo de cisticercos de *T. crassiceps* en Sef-GSH eluido con un gradiente de GSH (0-5) Proteína reconocida 280 nm (—) y en la línea roja (—) representa la conductividad.

La figura 15 muestra solamente la parte final del perfil cromatográfico de la fracción Sn de *T. crassiceps*, se utilizó un gradiente (0 – 5 mM) de GSH para eluir a las proteínas unidas a la resina. De manera interesante se muestra la presencia de dos picos eluidos por el GSH. El primero de ellos denominado cGSTTc-1 abarcó de la fracción 93-108 y se eluyó a bajas concentraciones de GSH (~0.5 nM), mientras que el segundo llamado cGSTTc-2, de la fracción 139-147 lo hizo a elevadas concentraciones de GSH (~5mM).

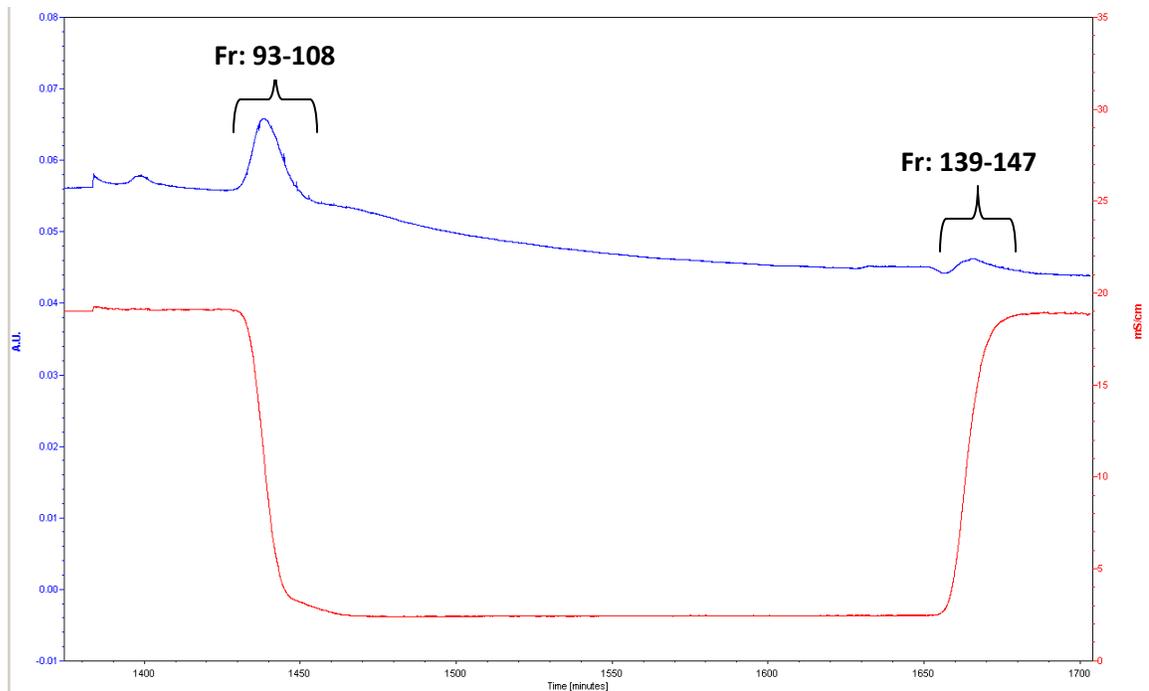


Figura 15. Resultado de la parte final de la cromatografía del Sn en la resina de afinidad al GSH donde se muestra el efecto del gradiente de GSH (5mM) cuando baja la conductividad. Proteína (280 nm) (—), conductividad (—).

La tabla 7 muestra el rendimiento de la purificación de la GSTTc-1 y GSTTc-2. Se observa que con un solo paso de purificación se incrementaron varias centenas de veces la actividad específica de ambas enzimas cuando estas se encuentran puras en comparación al Sn. También se muestra que la diferencia en el rendimiento entre las dos enzimas resultó ser de aproximadamente 32 veces.

Tabla 7. Resumen de la purificación

| Fracción | Volumen (ml) | Proteína total (mg) | Actividad específica (U/mg) | Actividad total (U) | Rendimiento % | Veces purificadas |
|----------|--------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|---------------|-------------------|
| Sn | 50 | 321 | 0.039 | 126.21 | 100 | 1 |
| GSTTc-1 | 1.4 | 0.240 | 26.46 | 6.35 | 5 | 67.29 |
| GSTTc-2 | 1.4 | 0.014 | 19.09 | 0.27 | 0.21 | 48.57 |

2. Análisis electroforético.

Todas las fracciones proteicas obtenidas en el proceso de purificación se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida tanto en condiciones desnaturalizantes empleando el 1,2-mercaptoetanol y SDS (figura 16) como no desnaturalizantes con anfólitos para determinar punto isoeléctrico (pI) (figura 17).

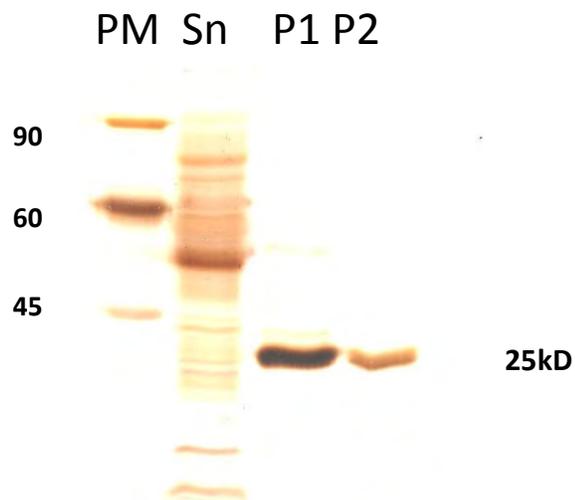


Figura 16. Análisis de las GSTTc-1 (P1) y GSTTc-2 (P2) en un gel de poliacrilamida 12% con SDS. Peso molecular (PM), Sobrenadante (Sn). El gel se tiñó con plata.

La figura 16 muestra una sola banda proteica para GSTTc-1 y GSTTc-2 en comparación al Sn y que ambas se sitúan alrededor de 25 kDa. En apoyo a la pureza con que se obtuvieron las enzimas de *T. crassiceps* es el hecho de haberlas teñido con plata.

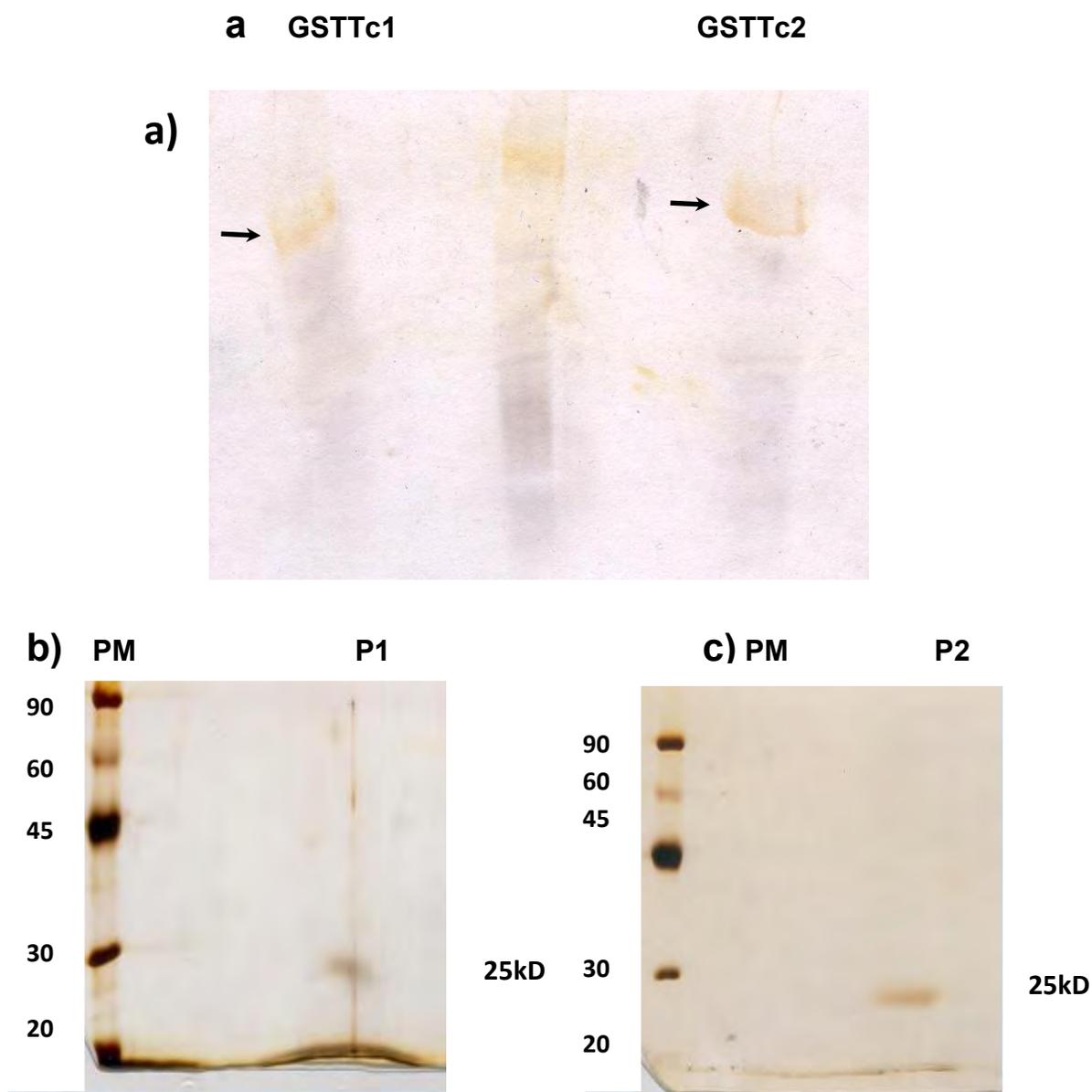


Figura 17. **Análisis de punto isoeléctrico y PM.** GSTTc-1 (P1) y GSTTc-2 (P2) analizadas en geles de poliacrilamida al 12%. (a) gel no desnaturizante indicando un punto isoeléctrico (pI) ligeramente diferente para ambas GSTs de *T. crassiceps* teñido con plata. (b) gel PAGE-SDS 12% que muestra a GSTTc-1 (P1) con un peso molecular de ~ 25 kDa. La muestra se obtuvo recortando la banda P1 del gel no desnaturizante (c) similar a (b) pero la enzima corresponde a GSTTc-2 (P2). b y c teñidos con nitrato de plata.

La figura 17a muestra el gel de poliacrilamida al 12% no desnaturizante teñido con plata. Se aprecian dos regiones proteicas GSTTc-1 (P1) y GSTTc-2 (P2) ambas con un punto isoeléctrico (pI) ligeramente diferente. La Figura 17b corresponde al gel de poliacrilamida SDS 12% donde se puso el fragmento de P1 proveniente del gel (28a) y se tiño con nitrato de plata. Se aprecia que la enzima tiene un PM cercano a 25 kDa. La Figura 17c corresponde al gel similar al anterior pero con la muestra GSTTc-2 (P2) manejada de igual forma que P1 en el gel anterior y presentando el mismo valor de PM que P1.

3. Estudio de péptidos.

El resultado de la secuenciación por espectrofotometría de masas de GSTTc-1 (Tc1) y GSTTc-2 (Tc2) mostró ocho diferentes aminoácidos entre ambas proteínas. Por sus características químicas los ocho amino ácidos de GSTTc-1 son tres no polares, dos polares y tres básicos. Para la GSTTc-2 tiene un amino ácido cargado negativamente en lugar de un básico y el resto similar a GSTTc-1. La posición de los primeros cuatro diferentes amino ácidos entre las enzimas se encuentra principalmente en al amino terminal y el resto distribuidos en el primer tercio de la secuencia primaria (Figura 18).

```

Ts  mapltlaywdirglaeqsrlllkylgveyhdkryhvgpapnfdrsewlsekftlgldfpnlpyymdgdkl
Tc1  vlgywnlkl dipnlpyidrkl
Tc2  tlaywnirl ldfnlpyidrkl

Ts  tqsgaileyiadrhgmipdckkrravlhmlqcevldlrqaftricyspdfeelkpgffetlaqklpnfety
Tc1  tqsgalleyladr hmlqcevldlr cyssdftrl psfletltqk
Tc2  tqsglleyladr psfletltqk

Ts  lgdkewltgekinypdfalcellsqltkfeptclkkypklqaylerfenlpqlsgymsskefktcpcngvs
Tc1  lgdkewltwk ypdfalcellnqltk
Tc2  lgdkewltwk dfalcellnqltk

Ts  akwrgdc
Tc1
Tc2

```

Tc1 vs Tc2 92.5% de identidad

Figura 18. **Análisis de péptidos de GSTTc-1 (Tc1) y GSTTc-2 (Tc2)**. Se muestra el alineamiento comparativo de las secuencias de Tc1, Tc2 y *T. solium* (Ts), se indican en rojo los aminoácidos diferentes entre Tc1 y Tc2.

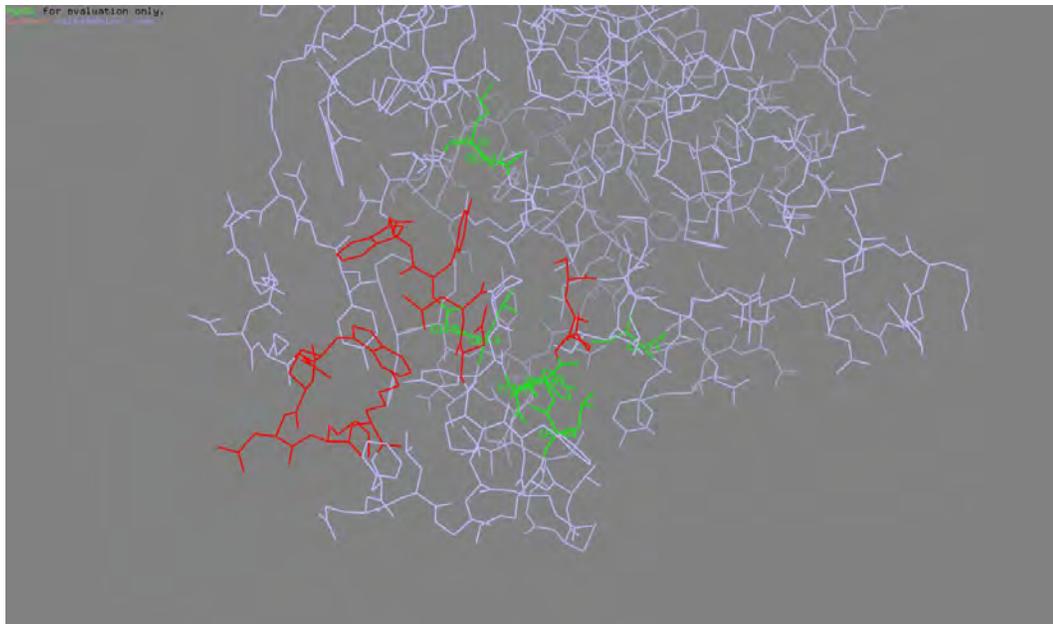


Figura 19. **Representación 3D de GST**. Se observa en la figura el modelo cristalográfico de GST en rojo se observa los aminoácidos que conforman el sitio de unión del GSH y en verde los aminoácidos que están diferentes entre GSTTc-1 y GSTTc-2.

En la figura 19 se observa un modelo de cristalografía de GST en donde se marcan en verde los aminoácidos de unión a GSH y en rojo los aminoácidos diferentes entre GSTTc-1 y GSTTc-2, los aminoácidos 4 Thr, 6 Ala, 10 Ile, 11 Arg y 74 Glu provocan en GSTTc-2 una mejor unión del GSH que en GSTTc-1.

4. Caracterización bioquímica.

4.1 pH óptimo de la reacción de las GSTs.

La Figura 20 presenta las gráficas obtenidas para determinar el pH óptimo de reacción. Para GSTTc-1 el pH= 8.5 y para GSTTc-2 el pH= 7.5 fueron los óptimos para su trabajo catalítico. En ambas curvas se contempla un comportamiento similar de incremento en la actividad a partir de valores bajos de pH que decaen después de su pH óptimo de reacción. Sin embargo, como demostración de ser enzimas diferentes el comportamiento de GSTTc-1 fue más inestable a pHs diferentes del óptimo en comparación con GSTTc-2.

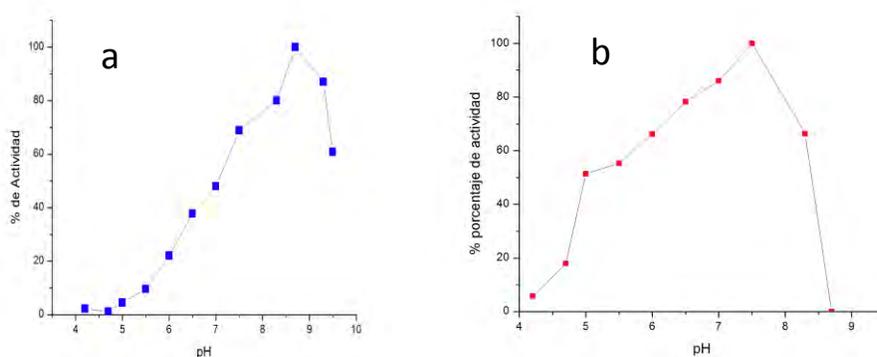


Figura 20. **Efecto del pH sobre la velocidad de conjugación entre GSH y CDNB para GSTTc-1 y GSTTc-2.** La figura 30a) pertenece a GSTTc-1 con un pH óptimo de 8.5 En la figura 30b) pertenece GSTTc-2 con un pH óptimo de 7.5.

4.2 Actividad de las enzimas en función de la temperatura.

La figura 21 indica el porcentaje de actividad enzimática de ambas GSTs de *T. crassiceps* purificadas en función de la temperatura. La GSTTc-1 incrementa lentamente su actividad conforme se incrementa la temperatura de reacción a partir de los 20° hasta llegar al valor óptimo en los 60°C y desnaturalizarse rápidamente. La GSTTc-2 en cambio es a temperaturas 30 - 40°C donde es más activa pero a un poco más de incremento de la temperatura pierde su función. La diferencia entre ambas gráficas está relacionada por la modificación de su Km en función de la energía de activación requerida por cada enzima para catalizar sus sustratos. Así la GSTTc-1 muestra menos cambios en su Km en comparación con la GSTTc-2.

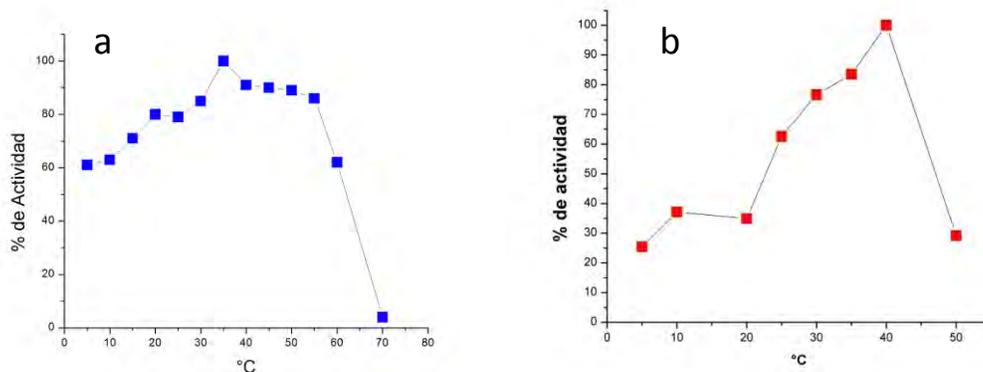


Figura 21. **Efecto de la temperatura en la conjugación del GSH con CDNB.** La Figura 31a corresponde a GSTTc-1 y la figura 31b a la GSTTc-2. Todas las velocidades de reacción se realizaron incubando previamente a las enzimas a la temperatura indicada durante 10 min.

En la tabla 8 muestra en forma resumida los valores de pH y temperatura óptimos para la GSTTc-1 y GSTTc-2, estos datos se obtuvieron por medio de la interpolación del valor más alto obtenido hacia el eje de las X.

Tabla 8. Comparación de los valores pH y temperatura entre las GSTs de *T. crassiceps*

| GST | pH | Temperatura °C |
|------------|-----------|-----------------------|
| GSTTc-1 | 8.5 | 35 |
| GSTTc-2 | 7.5 | 40 |

4.3 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de Michaelis-Menten (Km), velocidad máxima de reacción (Vmax), número de recambio (Kcat) y la constante de la eficiencia catalítica (Kcat/Km).

La figura 22 muestra las gráficas de Michaelis-Menten (actividad específica versus concentración de sustrato) desarrolladas por figura 32 a GSTTc-1 y figura 32 b por GSTTc-2. En todas ellas se observa una hipérbola rectangular con límites de Vmax y valores de Km en la concentración de sustrato donde se establece la mitad de la Vmax. En la Tabla 9 se resumen las constantes catalíticas de ambas enzimas originadas por ensayos de velocidad inicial siguiendo el método de Habig et al (33). La GSTTc-1 desarrollo una Vmax de $149 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y presentó una km de $0.86 \mu\text{M}$ con el sustrato CDNB y para el GSH Vmax $23 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una Km de $0.54 \mu\text{M}$.

Para GSTTc-2 se obtuvo una Vmax de $4.7 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una Km de 1038.49 para el CDNB y para el GSH se obtuvo una Vmax de $77.06 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una Km de $297.76 \mu\text{M}$.

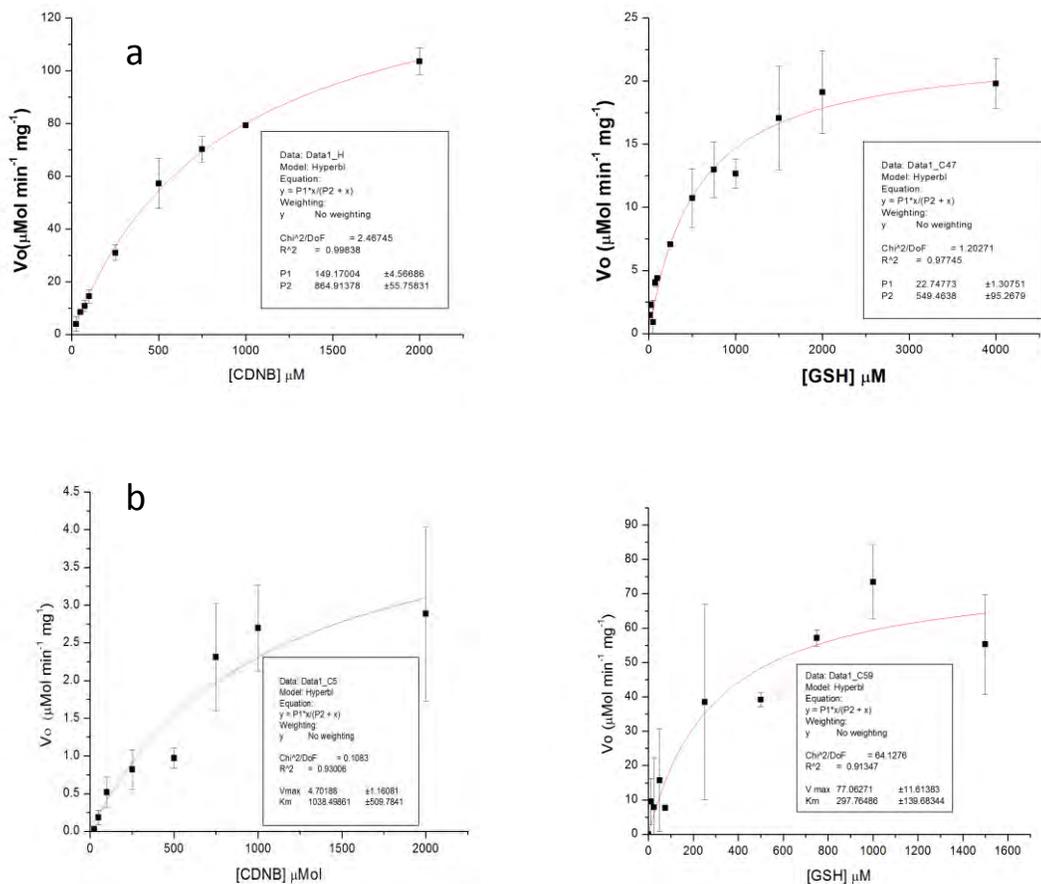


Figura 22. Comportamiento Michaeliano del desarrollo de las reacciones de GSTTc-1 (figura 32a) y GSTTc-2 (figura 32b) utilizando GSH y CDNB como sustratos. Los recuadros incluyen los valores de los parámetros cinéticos aparentes de V_{max} y K_m .

Con los valores obtenidos se realizaron los cálculos para obtener K_{cat} , K_{cat}/K_m .

En el cuadro se muestra diferentes valores cinéticos de GSTs en diferentes especies, donde se puede apreciar que los valores obtenidos de las isoformas de glutatión transferasa purificados de *T. crassiceps* se encuentran dentro del rango de las demás enzimas mostradas

Tabla 9. Cuadro comparativo de las GSTs obtenidas y GSTs mencionadas en Brenda database

| GST de diferentes especies | Vmax $\mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ | | Km (mM) | | Kcat (S^{-1}) | | Kcat/Km ($\text{M}^{-1}, \text{S}^{-1}$) | |
|-------------------------------|---|------|---------|-------|--------------------------|-------|---|-------------------|
| | CDNB | GSH | CDNB | GSH | CDNB | GSH | CDNB | GSH |
| <i>T. crassiceps</i> GST-1 | 149 | 23 | 0.86 | 0.55 | 62.46 | 11.61 | 0.72×10^5 | 0.2×10^4 |
| <i>T. crassiceps</i> GST-2 | 4.77 | 7.06 | 1.03 | 0.3 | 1.97 | 32.3 | 0.19×10^4 | 0.1×10^5 |
| <i>T. solium</i> | 51.5 | | 1.06 | 0.2 | 22.2 | | | |
| <i>E. granulosus</i> | 2.5 | | | | | | 2.5 | |
| <i>S. japonicum</i> | 8 – 12 | | 2.68 | 0.057 | 187 | | | |
| <i>H. sapiens</i> | 33 | | 0.34 | | 1.15 | | 4.8 | 0.001 |
| <i>M. musculus</i> | 130 | | 2.28 | 0.455 | 2286 | | | |

5 Estudio de inhibición de las GSTTc-1 y GSTTc-2.

5.1 Inhibición I_{50} .

La Figura 23 muestra las gráficas de la actividad residual de GSTTc-1 al ser inhibida por (a) rosa de bengala, (b) indometacina, (c) azul de cibacrón, (d) bromosulfaleina cuando se utilizó al CDNB como sustrato. Los cuatro inhibidores utilizados lograron inhibir al 100% a la enzima y con valores de I_{50} de 0.034, 0.2, 1.6 y 2 mM respectivamente.

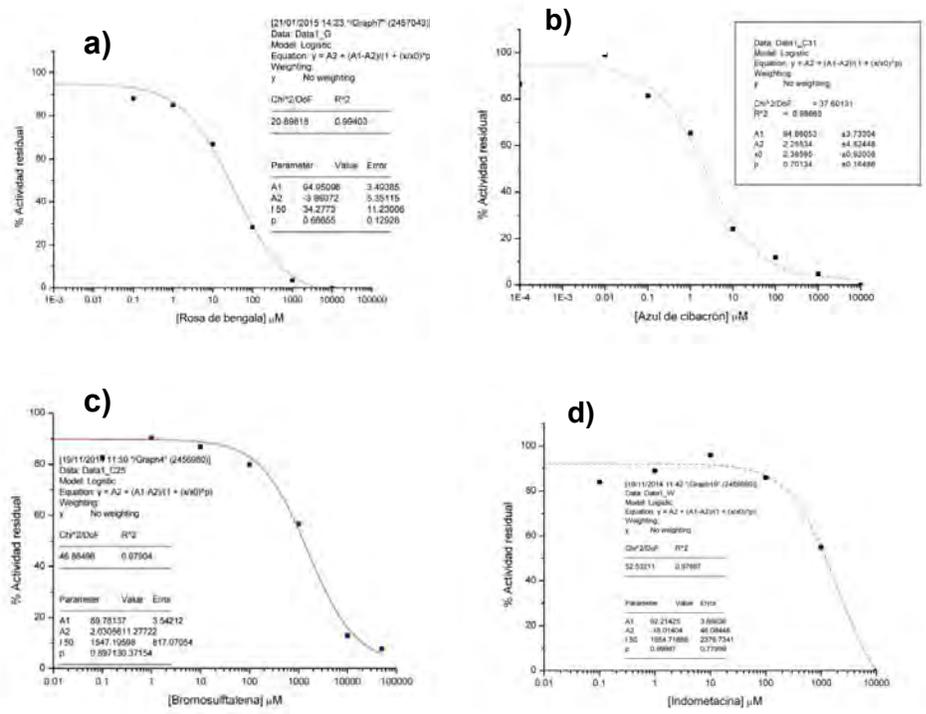


Figura 23. Inhibición al 50% de la actividad catalítica de la GSTTc-1 por (a) rosa de bengala, (b) azul de cibacrón, (c) bromosulfaleina, (d) indometacina en presencia del sustrato CDNB.

La figura 24 muestra las gráficas de actividad residual de GSTTc-2 que se realizaron con los cuatro sustratos mencionados (rosa de bengala, indometacina, azul de cibacrón y bromosulfaleina) para obtener su I_{50} GSTTc-2 donde se puede observar que ninguno de los cuatro inhibidores pudo inhibir la enzima al 100% los valores estimados de I_{50} fueron 0.00008, 0.00014, 1.54, 1.2 mM respectivamente.

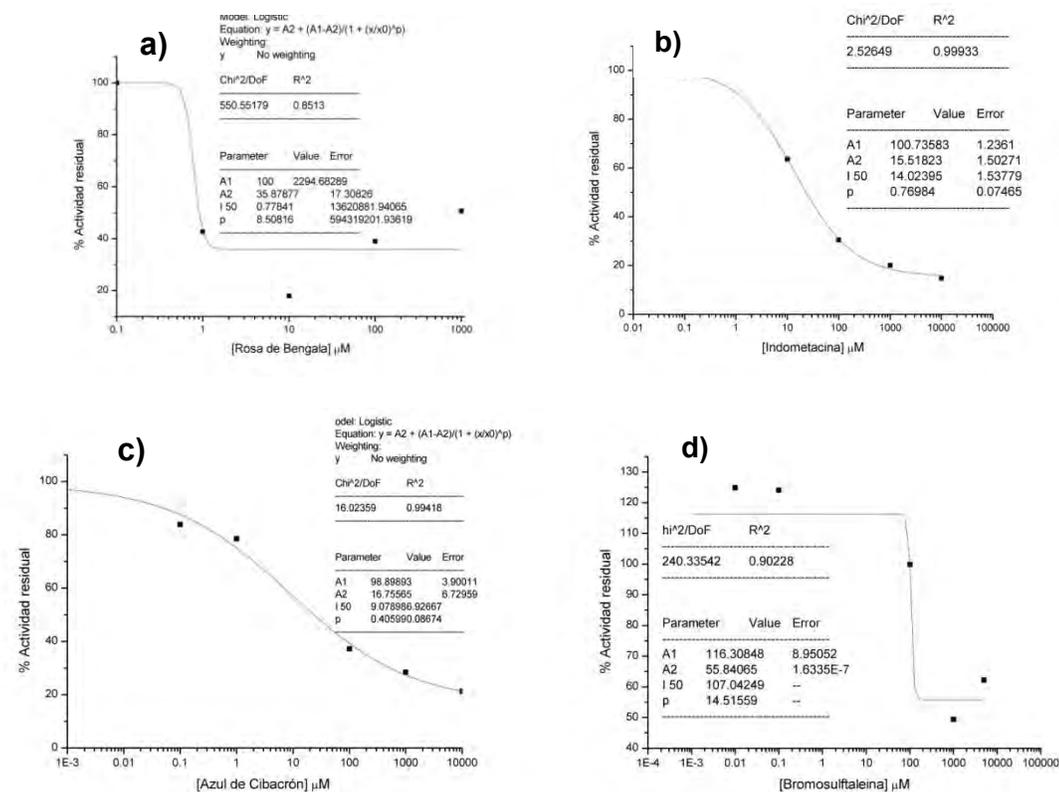


Figura 24. Inhibición al 50% de la actividad catalítica de la GSTTc-2 por (a) rosa de bengala, (b) azul de cibacrón, (c) bromosulfaleina, (d) indometacina en presencia del sustrato CDNB.

La Tabla 10 presenta los datos comparativos entre los valores de I_{50} de las enzimas de *T. crassiceps*. La sensibilidad para cada uno de estos inhibidores fue diferente entre las enzimas y cada enzima exhibió también amplias sensibilidades para los mismos. Para ambas enzimas el rosa de bengala y el azul de cibacrón fueron más efectivos en su acción inhibitoria que los otros dos reactivos, de hecho para la GSTTc-1 se requirieron cerca de mil veces más de concentración de bromosulfaleina e Indometacina para realizar su efecto.

Tabla 10. I_{50} GSTTc-1 y GSTTc-2

| Inhibidor | GSTTc-1 | GSTTc-2 |
|------------------|---------------|---------------|
| | I_{50} (mM) | I_{50} (mM) |
| Rosa de bengala | 0.034 | 0.0008 |
| Indometacina | 2 | 0.014 |
| Bromosulfaleina | 0.16 | 0.107 |
| Azul de cibacrón | 0.002 | 0.009 |

X 100% Inhibición X 80% Inhibición

5.2 Tipo de inhibición de GSTTc-1.

La figura 25 revela gráficas de doble recíproca construidas con las velocidades iniciales de reacción de la GSTTc-1 bajo el efecto de (a) bromosulfaleína, (b) indometacina, (c) azul de cibacrón, (d) rosa de bengala para obtener el tipo de inhibición y su constante inhibitoria (K_i).

Las gráficas obtenidas indican que rosa de bengala, bromosulfaleina y azul de cibacrón tienen un tipo de inhibición no competitiva es decir que el sustrato se está fijando a una parte de la enzima que no es el sitio activo e indometacina mostro que su tipo de inhibición es acompetitiva es decir que el sustrato se está uniendo al CDNB y eso impide que se una al sitio activo.

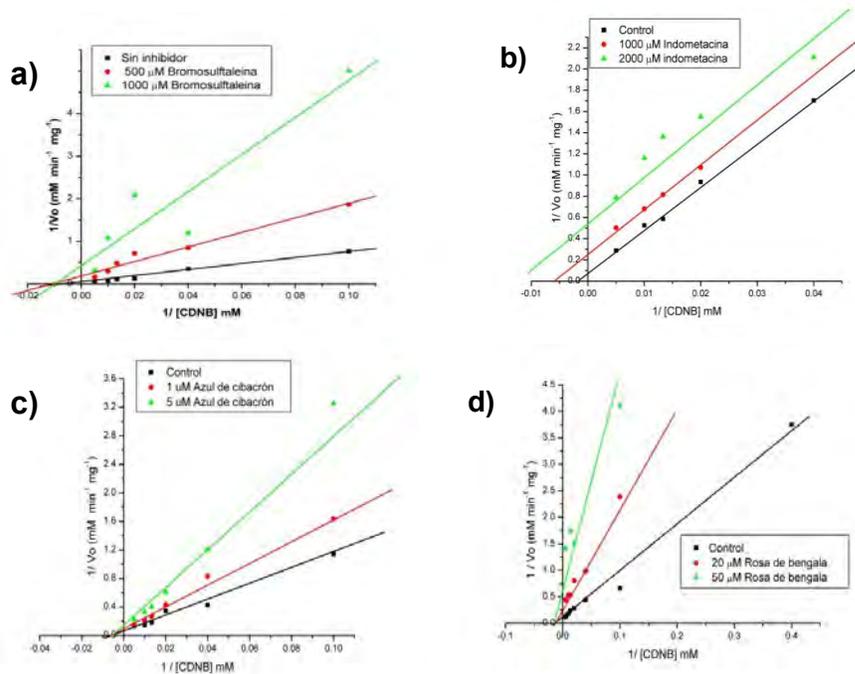


Figura 25. Gráficas para determinar tipo de inhibición. Gráficas doble recíprocas de las velocidades iniciales de reacción de la GSTTc-1 afectada por (a) bromosulfaleína, (b) indometacina, (c) azul de cibacrón, (d) rosa de bengala. Los inhibidores se emplearon a la concentración establecida en la Tabla 6. También se puede observar que todos los inhibidores desarrollaron un tipo de inhibidor no competitiva excepto la indometacina con el tipo acompetitivo.

En la tabla 11, se muestra el tipo de inhibición y la K_i obtenida de GSTTc-1.

Tabla 11. Resumen de los datos obtenidos de Tipo de inhibición y K_i de GSTTc-1

| Inhibidor | Tipo inhibición | K_i (μM) |
|------------------|-----------------|-------------------------|
| Rosa de bengala | No competitiva | 2.7 |
| Indometacina | Acompetitiva | 0.02 |
| Bromosulfaleína | No competitiva | 13 |
| Azul de cibacrón | No competitiva | 0.3 |

En la tabla 12, se presenta una comparación entre los datos obtenidos de I_{50} con las isoformas purificadas de GST con las demás GST's de cestodos cercanos,

humano y ratón. En donde los valores obtenidos en el laboratorio se encuentran dentro los rangos encontrados en la base de datos BRENDA.

Tabla 12. Tabla comparativa de I_{50} y K_i de las enzimas purificadas de *T. crassiceps* con otros cestodos. Datos tomados de Brenda database.

| GST de diferentes especies | I_{50} (mM) | | | | K_i (μ M) | | | |
|------------------------------|---------------|--------|---------|--------------------|------------------|------|------|-----|
| | RB | In | BST | AC | RB | In | BST | AC |
| <i>T. crassiceps</i> GSTTc-1 | 0.0034 | 0.1954 | 0.1574 | 0.0009 | 2.7 | 0.02 | 12.9 | 0.3 |
| <i>T. crassiceps</i> GSTTc-2 | 0.008 | 0.0014 | 0.0107 | 0.0009 | | | | |
| <i>T. solium</i> | 0.0143 | | 0.01765 | 0.0265 | | | | |
| <i>E. granulosus</i> | 0.188 | | | $12 \cdot 10^{-5}$ | 0.69 | | | |

RB: rosa de bengala In: Indometacina AC: Azul de cibacrón BST: bromosulfaleina

6. Actividad a otros sustratos

Se realizaron pruebas de velocidad inicial con ambas enzimas con diferentes sustratos los cuales fueron 1,2-Dicloro-4nitro-benzeno (DCNB) PM. 192.01 y el Epoxy-fenilpropano PM 150 de los cuales solo fue capaz de catalizar el dicloro nitrobenzenceno (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad a otros sustratos.

| Sustrato | GSTTc-1 μ Mol min^{-1} mg^{-1} | GSTTc-2 μ Mol min^{-1} mg^{-1} |
|--------------------|--|--|
| CDNB | 79.3 | 2.69 |
| DCNB | 2 | 1.4 |
| Epoxy fenilpropano | Sin Actividad | Sin actividad |

VII. Discusión.

El modelo experimental *T. crassiceps*-murino es ampliamente utilizado en áreas de la inmunología preventiva y en la evaluación de fármacos cestocidas entre otros. En la primera, particularmente en la construcción de una vacuna péptidica sintética contra *T. solium* utilizando epitopos antigénicos de *T. crassiceps*. Lightowlers.M (2010). En la segunda estudian la eficacia del tratamiento con Albendazol y Prazicuantel y lo relacionan con su administración a los diez días posteriores a la infección y una duración de veinte días de tratamiento Almeida L (2014). Toda esta diversidad experimental en el modelo de *T. crassiceps* está de alguna forma relacionada con la formación de compuestos xenobioticos y endobióticos en los tejidos del parásito. De esta forma, el conocer la participación de enzimas detoxificantes utilizadas por el cestodo aclararía en parte los mecanismos de acción contra antígenos potencialmente protectores y fármacos utilizados contra *T. crassiceps*. Sin embargo, existe poca información relacionada con las enzimas detoxificantes en este organismo.

Nuestro interés en este trabajo se enfocó en el estudio de las glutatión transferasas (GSTs) por ser las principales enzimas de detoxificación de la fase II Hernandez M (2012). Nos planteamos el objetivo de saber el número de isoformas de GSTs existentes en *T. crassiceps* y posteriormente caracterizarlas bioquímica y cinéticamente.

Se purificaron dos isoformas de cGST de *T. crassiceps*: GSTTc-1 y GSTTc-2 por medio de una cromatografía de afinidad sefarosa-GSH y el empleo de un gradiente de GSH (0 - 5 mM). Este uso del gradiente fue una modificación al

procedimiento de purificación para estas enzimas publicado por Meyer D et al (1989). En nuestra experiencia el empleo de una sola concentración de GSH para eluir a las GSTs de *T. crassiceps* unidas en la cromatografía de afinidad, método mencionado, resultaba en una sola banda proteica al análisis por geles de poliacrilamida. Sin embargo, al utilizar el gradiente en el paso de elución obtuvimos a la GSTTc-1 a bajas concentraciones de GSH (0.1 mM) y a la GSTTc-2 a una mayor concentración (5 mM). En las figuras 26 y 27 se muestra que la señal de absorbancia emitida por la GSTTc-2 en comparación con la GSTTc-1 es débil pero visible, sin embargo al utilizar una sola concentración de elución solo se observó un solo pico de absorbancia.

Para corroborar la existencia de que GSTTc-1 y GSTTc-2 son dos diferentes enzimas se llevaron a cabo estudios de análisis de péptidos de estas dos muestras. Para este fin se emplearon las bandas proteicas situadas en ~25 kDa en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (Fig. 28) de las fracciones concentradas con actividad de GST eluidas en la cromatografía de afinidad (Fig. 26). Las secuencias obtenidas de ellas se compararon con la secuencia completa de aminoácidos de *T. solium* por no existir la correspondiente para *T. crassiceps*.

De doscientos doce potenciales aminoácidos presentes en ambas enzimas de *T. crassiceps*, ocho fueron diferentes (3.8%) entre sí (Fig. 36). Todos los distintos aminoácidos presentes entre GSTTc-1 y GSTTc-2 excepto uno, están situados a distancias de uno a seis aminoácidos. Esta observación permite sugerir que existe un gen para cada una de las enzimas de *T. crassiceps* debido a que no hay exones de dimensiones tan pequeñas como las que separan a la mayoría de los aminoácidos que diferencian a GSTTc-1 y GSTTc-2. De esta forma no es

probable que por procesos co-transcripcionales de corte y empalme de RNA (RNA-splicing) se hayan obtenido las isoformas de GSTs en *T. crassiceps*.

Las enzimas de *T. crassiceps* tienen una identidad entre ellas del 92.5%. La posición de la mayoría de los ocho aminoácidos diferentes entre las enzimas se encuentran cercanos a sitio de unión del GSH, este hecho podría significar diferencias catalíticas entre ambas enzimas. Por ejemplo, el aminoácido en la posición cuatro valina en la GSTTc-1 y treonina en la GSTTc-2 sería una explicación a la mayor eficiencia catalítica desarrollada por la GSTTc-2 que por la GSTTc-1. Esta treonina confiere una mayor solubilidad a la región mencionada en comparación con valina y por lo tanto un área de unión más estable al GSH y así contribuir al mejoramiento de la catálisis.

También por estudios de catálisis enzimática se demostró que GSTTc-1 y GSTTc-2 son dos proteínas diferentes. Por ejemplo, la actividad específica para el sustrato CDNB fue mayor para la GSTTc-1 y menor para la GSTTc-2. Por otro lado, la GSTTc-2 resultó tener mayor afinidad para el GSH y menor para el CDNB mientras que para la GSTTc-1 fue de forma inversa. En consecuencia tanto el número de moléculas de sustrato transformadas por molécula de enzima en un segundo (K_{cat}) como la eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) tuvieron la misma proporción anterior entre las enzimas. La similitud entre ambas enzimas es el comportamiento tipo Michaelis-Menten durante el desarrollo de la reacción en el estado estacionario para ambos sustratos.

Los análisis físico-químicos de las GSTTc-1 y GSTTc-2, como estabilidad funcional a la temperatura (figs. 30, 31), revelaron para la primera una mayor dependencia a esta variable en comparación con la segunda, es decir la GSTTc-

1 se muestra estable en un rango mayor de temperatura que la GSTTc-2. En relación a los datos de la dependencia del pH, indican que cada enzima al desarrollar su reacción catalítica presentó un patrón de actividad de transferasa diferente, donde se involucran distintos grupos ácido/bases con diferentes valores de pKa. Esto último sugiere que muy probablemente el tipo de aminoácidos cercanos al grupo activo sean diferentes entre las enzimas.

Se probaron como sustratos el DCNB (2,4-Dicloronitrobeneno) y 1-2 Epoxy -3-nitrofenixipropano, para GSTTc-1 tuvo una V_o a DCNB de $2 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}$ y para Epoxy -3-nitrofenixipropano no tuvo capacidad de catalizarlo, para GSTTc-2 tuvo una V_o de $1.4 \mu\text{Mol min}^{-1} \text{mg}$ y no pudo catalizar Epoxy -3-nitrofenixipropano.

Es importante señalar que los valores catalíticos y físico-químicos de las enzimas de *T. crassiceps* están dentro del rango de valores publicados para helmintos y vertebrados.

Los estudios inhibitorios de la actividad catalítica de las enzimas de *T. crassiceps*, con cuatro inhibidores clásicos para las GSTs, muestran de igual forma, claras diferencias entre GSTTc-1 y GSTTc-2. El rango de inhibición en la primera estuvo entre micro y mili molar a diferencia de solo micro molar en la segunda. El orden de capacidad inhibitoria por los inhibidores fue completamente diferente para ambas enzimas. Desafortunadamente, el tipo de inhibición solo pudo realizarse con la GSTTc-1 y no con la GSTTc-2 debido a las bajas concentraciones obtenidas de esta enzima. Aunque estos últimos datos no son comparativos por el momento entre las enzimas de *T. crassiceps*, en un futuro cercano se podrá ver que similitud o no pudiera existir para la inhibición del tipo acompetitivo

desarrollada por la presencia de la indometacina sobre la GSTTc-1 y el tipo no competitivo por los otros tres inhibidores. También serán útiles los datos de los valores de K_i (tabla 11) para estos inhibidores para fines comparativos.

Como se mencionó las GSTs son importantes para realizar procesos de detoxificación de sustancias xenobióticas y endobióticas así, la existencia de varias isoformas en un mismo organismo ayudaría a incrementar su protección Riveron J et al (2014).

Es significativo continuar estudiando a las GSTTc-1 y GSTTc-2 y evaluar diversos tópicos como son la resistencia de los organismos cisticercosos y/o teniasicos a moléculas cestocidas y la capacidad de los cestodos de evadir al sistema inmune de (23, 24, 38). Por ejemplo, se ha mostrado que el vector de la malaria *Anopheles funestus* de la región de Benin en Africa tiene la capacidad de metabolizar al insecticida 1,1,1-tricloro-2,2-bis-etano (DDT) muy eficientemente en comparación con mosquitos del mismo género de otras regiones. La explicación a este hecho es la presencia de una glutatión transferasa (GSTe2) que tiene un aminoácido diferente a las GSTs de los vectores que no metabolizan correctamente DDT Molina D et al (2009), Meyer D et al (1989).

La cGSTTc-1 adicionalmente a su función catalítica tiene la función de ligandina Hernandez M (2012), que consiste en unir de forma no catalítica diversos ligandos y transportarlos a diferentes sitios del citoplasma o extracelulares Romero R (2015). Esto se considera como una detoxificación pasiva además de tener probables funciones de transporte similares e las de la albúmina pero en el citoplasma. Sería importante realizar estudios con la cGSTTc-2 enfocado en este sentido para evaluar si cuenta también con esta función.

El estudio de las GSTs utilizando el modelo experimental *T. crassiceps*-murino ha permitido en este trabajo demostrar la presencia de una nueva GST y realizar su caracterización cinética, así como abrir diversos temas de investigación relacionados no solo con protección contra productos tóxicos sino también con funciones dentro del metabolismo aerobio de estos organismos.

VIII. Referencias.

Alin P, Jensson H, Guthenberg C, Danielson U, Tahir M, Mannervik 1985. Purification of major basic glutathione transferase isoenzymes from rat liver by use of affinity chromatography and fast protein liquid chromatofocusing Anal Biochem vol: 146: 313 - 320.

Almeida L, Fraga M, Souza R Lino, Clare M, Partial V. 2014. Reverse of the TCA cycle is enhanced in *Taenia crassiceps* experimental neurocysticercosis after in vivo treatment with anthelmintic drugs. Parasitol Res vol: 113:1313 – 1317.

Amstrong RN 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferase. Chem Res Toxicol; Vol 10: 2 - 18.

Ballatori N, Krance S, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond C 2009 Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biol Chem Vol 390:191 - 214.

Denzoin L, Soraci A, Tapia M 2012. Homeostasis del glutati3n. Bioqu3mica Cl3nica Latinoamericana, vol. 47, n3m. 3

Habig W, Pabs J, Jakoby W. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biol. Chem, vol: 249: 7130-7139

Hern3ndez M., Nava B., Agust3n P. Purificaci3n, 2009. Caracterizaci3n y demostraci3n de la funci3n acarreadora de la Glutati3n S-transferasa de *Taenia crassiceps*. Rev. Ibero-latinoamericana. Parasitol. vol 68 (2), 150-158.

Herve M, Angeli V, Pinzar E, Wintjens R, Faveeuw Ch, Narumiya S, et al. 2003 Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur J immunol.*, vol 33: 2764-2772

Jakobsoon P, Morgenstern R, Mancini J, Hutchinson A, Persson B. 1999. Common structural features of MAPEG – a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci*; vol: 8: 689 – 92.

Javier Callón Álvarez Edith. “Proteínas conjugadas” [en línea] México [Consulta: 09 de Septiembre de 2015] <<http://proteinas.org.es/proteinas-conjugadas>>

Javier Callón Álvarez Edith. “Proteínas simples” [en línea] <<http://proteinas.org.es/proteinas-simples>> México [Consulta: 09 de Septiembre de 2015]

José Rodrigo Romero Díaz 2015. Estudio de la función catalítica y de ligandina de las Glutación S-Transferasas de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* frente a peróxidos lipídicos. Tesis de Maestría en Ciencias México DF. Laboratorio de inmunobioquímica de *Taenia solium*. Febrero de. Universidad Nacional Autónoma de México.

Keen J, Jakoby W. 1978. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. *J Biol Chem* vol: 253: 5654 – 57.

Laemmli, V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature (London)* vol: 227: 680-685.

Laura Maribel Rangel Ruiz. 2011 Estudio de la respuesta inmune por la coinfección de *Taenia crassiceps* y *Toxoplasma gondii*. Tesis de licenciatura Los reyes Iztacala Estado de México FES-Iztacala Universidad Nacional Autónoma de México.

León S, Callejas E, Ledesma Y, Coronel J, Pérez C. 2014. Helminth Infection Reduces the Development of Colitis-Associated Tumorigenesis. *Internacional Journal of biological sciences*; 10(9): 948 - 956. doi: 10.7150/ijbs.9033.

Lightowlers.M. 2010 *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium*, and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunology*, vol: 32, 701 – 709

López J, María C, Amaral R, Kalil S. 2010 Proteólisis enzimática del colágeno dentinario. *Odontoestomatología / Vol. XII. Nº 14*

Lozano J, Galindo J, García C, Martínez J, Peñafiel R, Solano M 2005. *Bioquímica y Biología Molecular para ciencias de la salud tercera edición*. Madrid España, MCGraw-Hill interamericana de España, (92 - 111)

Mannervik B, Widersten M. 1995. Binary combinations of four protein subunits with different catalytic specificities explain the relationship between six basic glutathione S-transferases in rat liver cytosol. *J Biol Chem*; vol 257: 9909 - 9912.

Mannervik B, Awasthi Y, Board P, Hayes J, Di Ilio C, Ketterer B, Et al 1992. Nomenclature for human glutathione S-transferase *Biochem J*; vol 282: 305 - 306.

Martha Hernandez. 2012. Evaluación de la función de ligandina de la Glutación S-Transferasa de cisticercos de *Taenia solium*. Tesis de Maestría en ciencias.

México Df, Laboratorio de inmunobioquímica de *Taenia solium*., Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez J, Torres P, Juárez M. 2011. Glutación y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. REB vol: 30(2): 56 - 67,.

Mateos H. Pereira B, Candido E, Oliveira A, Lopes V, Clare M, et al. 2012; Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. Arq Neuropsiquiatr vol: 70(4):287 - 292.

Meyer D, Lalor E, Coles B, Kispert A, Alin P, Mannervik B. 1989. Single-step purification and h.p.l.c. analysis of glutathione transferase 8-8 in rat tissues. Biochem J.vol 260: 785-788

Molina D, Figueroa L. 2009. Resistencia metabólica a insecticidas organofosforados en *Anopheles aquasalis* Curry 1932, municipio Libertador, estado Sucre, Venezuela. Biomédica; 29:604-15

Mooney K.A, 2000 Immune destruction of larval *Taenia crassiceps* in mice. Infect Immun,. Vol 68(5): p. 2393 - 401.

Morgesten R., Depierre W. 1985. Microsomal Glutathione Transferase. The journal of biological Chemistry. Vol: 260: 13976 – 13983.

Murray B, Botham K, Kenelly P, Rodwell V, P Anthony Weil. Harper. 2012. Bioquímica Ilustrada 29 Edición. MacGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. Álvaro Obregón México D.F. (17 - 46)

Nava G, Lacleste P, Bobes R, Carrero J, Reyes H, Enriquez S et al 2011 Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Experimental Parasitology* Vol: 128 217-224

Nava G, Robert L, Plancarte A. 2007. Characterization of *Taenia solium* cysticerci microsomal glutathione S-transferase activity. *Parasitol Res*, Volume 101, Issue 5, pp 1373-138

Nelson D., Cox M. Lehninger principios de bioquímica Quinta edición. Barcelona España. Ediciones Omega S.A de C.V. 2009 (72 - 92)

Philip J., Sherrat J. Glutathione S-Tranferases. Enzyme systems that metabolisedrugs and other xenobiotics. 2002

Riveron J, Yunta , Sulaiman S, Djouaka R, Irving H, -Menze B. et al. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vectorl. *Genome Biology*, 15:R27.

Salazar Castañón Victor Hugo. 2011. Estudio de la influencia de *Taenia crassiceps* en la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium yoelii* 17 XL en un modelo murino de la infección. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Tahir M, Guthemberg C, Mannervik B. 1985. Inhibitors for distinction of three types of human glutathione tranferase. *Federation of European Biochemical Societies.*, Vol: 181 (2): 249 – 252.

Torres A., Landa A. 2008 Glutathione transferase from parasites: A biochemical view. *Acta trópica.*, Vol: 105: 99-112

Tracy W, Vande E. 1995. *Xenobiotic Metabolism: Biochemistry and Molecular Biology of parasites.* Marr J. Muller M, Academic Press, San Diego,

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

Yan Z., Enbo M. 2014. Molecular Cloning, Characterization and Positively Selected Sites of the Glutathione S-Transferase Family from *Locusta migratoria*. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0114776

Zhang X, Wang J, Zhang M, Qin G, Li D, 2013, pp. 529 - 539.