



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



PEDECIBA



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Hidatidosis: Caracterización de nuevas glutación transferasas

Tesis para acceder al título de Magister en Ciencias Biológicas

Sub área Bioquímica

Lic. Verónica López

Orientadora: Dra. Verónica Fernández Mancebo

2016

Imagine if the impossible isn't.

Prof. Ronald Harden

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que me han acompañado en este recorrido y que han contribuido con que este proyecto salga adelante.

En primer lugar agradezco a mi tutora Verónica Fernández por darme ésta oportunidad y colaborar en mi formación profesional.

Gracias a toda la Cátedra de Inmunología, por hacer que las horas trabajando sean muy agradables. A todos los de la “casita de adelante”, Clau, Emi, Gus, Ceci, Marco y Ana, por darme una mano y escucharme siempre que lo necesitaba. En especial quiero agradecer a Paula Arbildi, quien me brindo su tiempo y apoyo a lo largo de todo este trabajo.

A mis amigos de siempre Jhonny y Cintya, por su eterna amistad.

A Jenny, la Birri, Agus y Ceci, por aguantarme en los momentos de catarsis.

A la ANII por el apoyo económico.

A Seba, por bancarme en estos últimos meses de locura...

A mi familia, por el apoyo incondicional que me dieron toda la vida, darme la oportunidad de estudiar y ser FELIZ.

RESUMEN

Las glutatión transferasas (GSTs) constituyen una superfamilia de proteínas multifuncionales involucradas en la detoxificación celular de componentes citotóxicos, principalmente conjugándolos al tripéptido glutatión. Además de esta conjugación, las GSTs suelen exhibir otras actividades como peroxidasa, síntesis de prostaglandinas y actuar como proteínas ligandinas (detoxificación pasiva). Las GSTs pueden clasificarse en tres grandes familias, siendo las citosólicas las estudiadas en mayor profundidad. En los helmintos parásitos, las GSTs representan una de las principales enzimas detoxificantes. Nuestro grupo ha estado enfocado en la caracterización de estas proteínas en el cestodo *Echinococcus granulosus* (EgGSTs) con el propósito de comprender su papel en la infección parasitaria. Identificamos tres diferentes GSTs citosólicas, así como una forma heterodimérica, oligomerización aún no descrita en helmintos. Así, EgGST1 de clase Mu de mamíferos, estaría involucrada en la detoxificación de xenobióticos, incluyendo antihelmínticos. Paralelamente, el análisis de secuencias e inferencias filogenéticas reveló que EgGST2 pertenece a la clase Sigma, mientras EgGST3 muestra características tanto de la clase Sigma como de la Omega. De manera interesante, las GSTs Sigma de algunos parásitos están implicadas en la modulación de la respuesta inmune del hospedero permitiendo la infección, mientras que las Omega están relacionadas con el aumento de la resistencia al estrés oxidativo. Asimismo, el heterodímero, compuesto por estas dos últimas proteínas (EgGST2-3), podría favorecer la utilización de un rango más amplio de sustratos y ligandos. El presente trabajo propone avanzar con la caracterización de las EgGSTs, centrándose en la tipificación de la GST parasitaria heterodimérica.

En primer lugar, se detallan los estudios de expresión y estabilidad de EgGST2-3r, donde se consigue un aumento en el rendimiento global de la producción de la proteína recombinante de un 65 % (33 mg/mL de cultivo). Además, se realizó la caracterización bioquímica de EgGST2-3r, donde se analizó el panel de actividades que presenta, así como algunos de sus parámetros enzimáticos. La enzima presentó actividad frente a sustratos modelos de las glutatión transferasas, actividad frente a productos secundarios de la peroxidación lipídica, actividad ligandina frente a varios compuestos, principalmente drogas antihelmínticas y actividad glutatión peroxidasa.

En suma, los resultados obtenidos indican que EgGST2-3 podría contribuir a la sobrevivencia del parásito en su hospedero a través de mecanismos de detoxificación pasiva y de protección del parásito frente al estrés oxidativo. El conjunto de estos resultados contribuye a la comprensión de la interrelación hospedero-parásito, a partir del entendimiento del rol biológico de éste versátil grupo de enzimas detoxificantes.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>Echinococcus granulosus</i>	1
1.1.1	Consideraciones generales	1
1.1.2	Ciclo de vida de <i>Echinococcus granulosus</i>	2
1.1.3	Equinococosis quística	4
1.2	Metabolismo de xenobióticos	5
1.2.1	Consideraciones generales	5
1.2.2	Metabolismo de xenobióticos en helmintos	7
1.3	Glutación transferasas	8
1.3.1	Consideraciones generales	8
1.3.2	Reacciones catalizadas por las glutación transferasas	10
1.3.3	GST de Helmintos	13
1.3.4	Glutación transferasas en <i>E. granulosus</i>	16
1.4	HIPÓTESIS DE TRABAJO	17
1.5	OBJETIVOS	17
1.5.1	Objetivo general	17
1.5.2	Objetivos específicos	17
2	MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1	Plásmidos	18
2.2	Expresión y purificación de EgGST2-3r	18
2.2.1	Expresión de EgGST2-3r	18
2.2.2	Purificación de EgGST2-3r	19
2.2.3	SDS-PAGE unidimensional	19
2.2.4	Western blot	19
2.3	Caracterización de EgGST2-3r	20
2.3.1	Actividad glutación transferasa	20
2.3.2	Estabilidad de EgGST2-3r	20

2.3.3	Actividad específica con otros sustratos	20
2.3.4	Perfil de inhibidores	21
2.3.5	Actividad dehidroascorbato reductasa	22
2.3.6	Actividad tiol transferasa	23
2.3.7	Actividad prostaglandina sintasa (PGDS)	23
2.3.8	Actividad peroxidasa dependiente de glutatión	24
2.3.9	Actividad ligandina	24
2.3.10	Análisis de la secuencia aminoacídica de EgGST2 y EgGST3	25
2.4	Expresión y purificación de los homodímeros recombinantes en modelo eucariota.	25
2.4.1	Transformación de levaduras	25
2.4.2	Inducción de homodímeros recombinantes en levaduras	26
2.4.3	Purificación de los homodímero recombinante	26
3	RESULTADOS.....	27
3.1	Identificación del heterodímero recombinante.....	27
3.2	Expresión y estabilidad de EgGST2-3r.....	29
3.3	Caracterización básica clásica	29
3.3.1	Especificidad de sustratos	30
3.3.2	Perfil de Inhibidores	31
3.4	Otras actividades catalíticas	36
3.4.1	Actividades específicas de clase Omega: Dehidroascorbato reductasa y tiol transferasa	36
3.4.2	Actividad específica de clase Sigma: Prostaglandina sintasa	38
3.4.3	Actividad Glutatión peroxidasa	40
3.5	Actividades no catalíticas: Ligandina	43
3.6	Expresión de EgGST homodiméricas recombinantes en levaduras	46
3.6.1	Expresión y purificación de EgGST3-3r	46
3.6.2	Optimización de las condiciones de lisis celular	50
3.6.3	Expresión de EgGST1-1r y EgGST2-2r.....	51
4	DISCUSIÓN	54
5	REFERENCIAS	62

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Echinococcus granulosus*

1.1.1 Consideraciones generales

La infección causada por el cestodo *Echinococcus granulosus*, denominada equinococosis quística o hidatidosis, es una zoonosis endémica en muchos países incluido Uruguay (Figura 1) (Brunetti et al. 2016; Savioli et al. 2011). Este parásito puede infectar diversas especies de ganado y accidentalmente humanos, constituyendo un importante problema económico y sanitario (Thompson & Lymbery 1995). A nivel mundial, la zoonosis causada por *Echinococcus*, según la Organización Mundial de la Salud, genera un gasto aproximado de U\$S 3000 millones anuales, asociados tanto al tratamiento de la enfermedad como a pérdidas en la industria ganadera (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs377/en/#>). En el humano esta infección puede permanecer asintomática por largos períodos de tiempo, hasta que el crecimiento del quiste produzca una disfuncionalidad del órgano afectado (generalmente hígado y/o pulmón) o la ruptura mecánica del mismo genere una respuesta inflamatoria sistémica que puede llevar a la muerte del individuo (Brunetti et al. 2010).

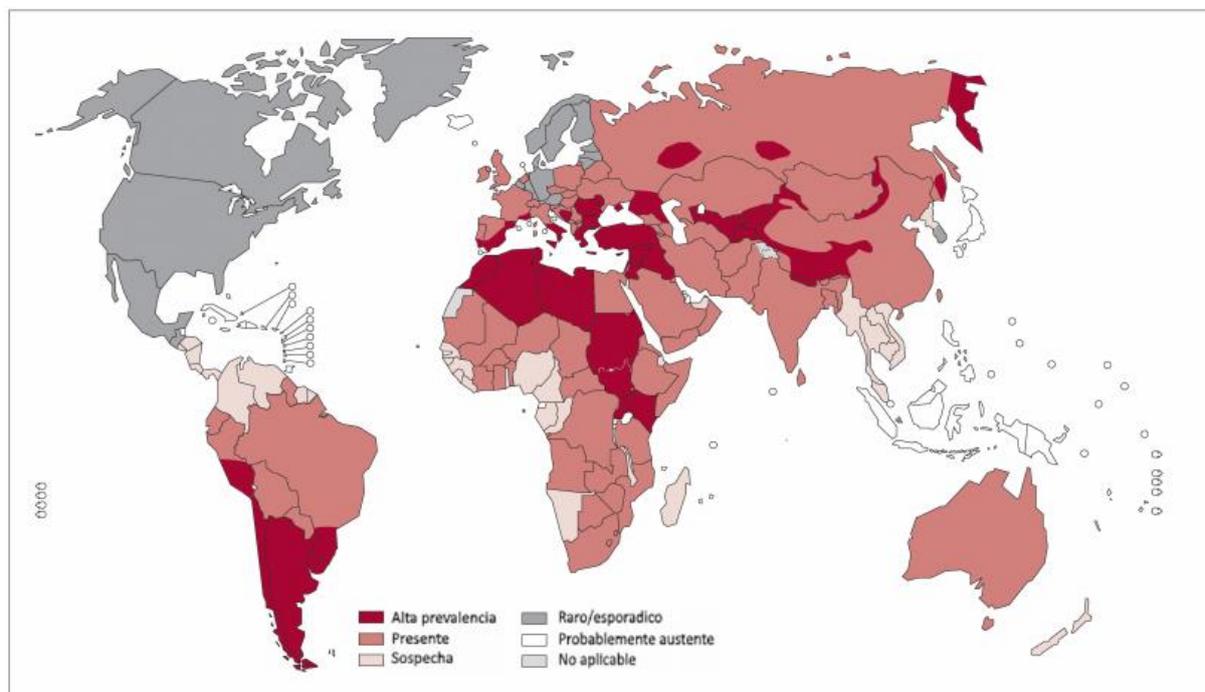


Figura 1. Distribución mundial de *E. granulosus*. Últimos datos disponibles, modificado de Savioli et al. (2011).

1.1.2 Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*

El ciclo de vida de *E. granulosus* (Figura 2) involucra dos hospederos mamíferos, uno definitivo (perros y otros cánidos) y otro intermediario (ungulados: oveja, cabra, cerdo, caballo, etc.). El hospedador definitivo se infecta por ingestión de protoescólex (PEs) los cuales son producidos por reproducción asexual del metacestodo (o quiste hidático). Pueden hallarse varios miles de PEs en un único quiste, y cada uno es capaz de desarrollarse en un gusano adulto, sexualmente maduro, en el intestino delgado del hospedero definitivo. Los gusanos adultos producen huevos, cada uno conteniendo un único embrión (oncósfera), los cuales son eliminados junto con las heces del hospedero. Los huevos, que son capaces de sobrevivir por largos períodos de tiempo en el ambiente, son infectivos para varias especies de herbívoros u omnívoros. Los huevos son ingeridos por el humano y otros hospedadores “aberrantes” que no forman parte del ciclo vital natural (hospedero accidental). Una vez allí, el embrión contenido en el huevo es liberado, atravesando la pared intestinal y llegando a través de la circulación sanguínea a diferentes órganos, principalmente hígado y pulmón, aunque también pueden establecerse en otros órganos (Thompson & Lymbery 1995; Eckert & Deplazes 2004; Higueta et al. 2016).

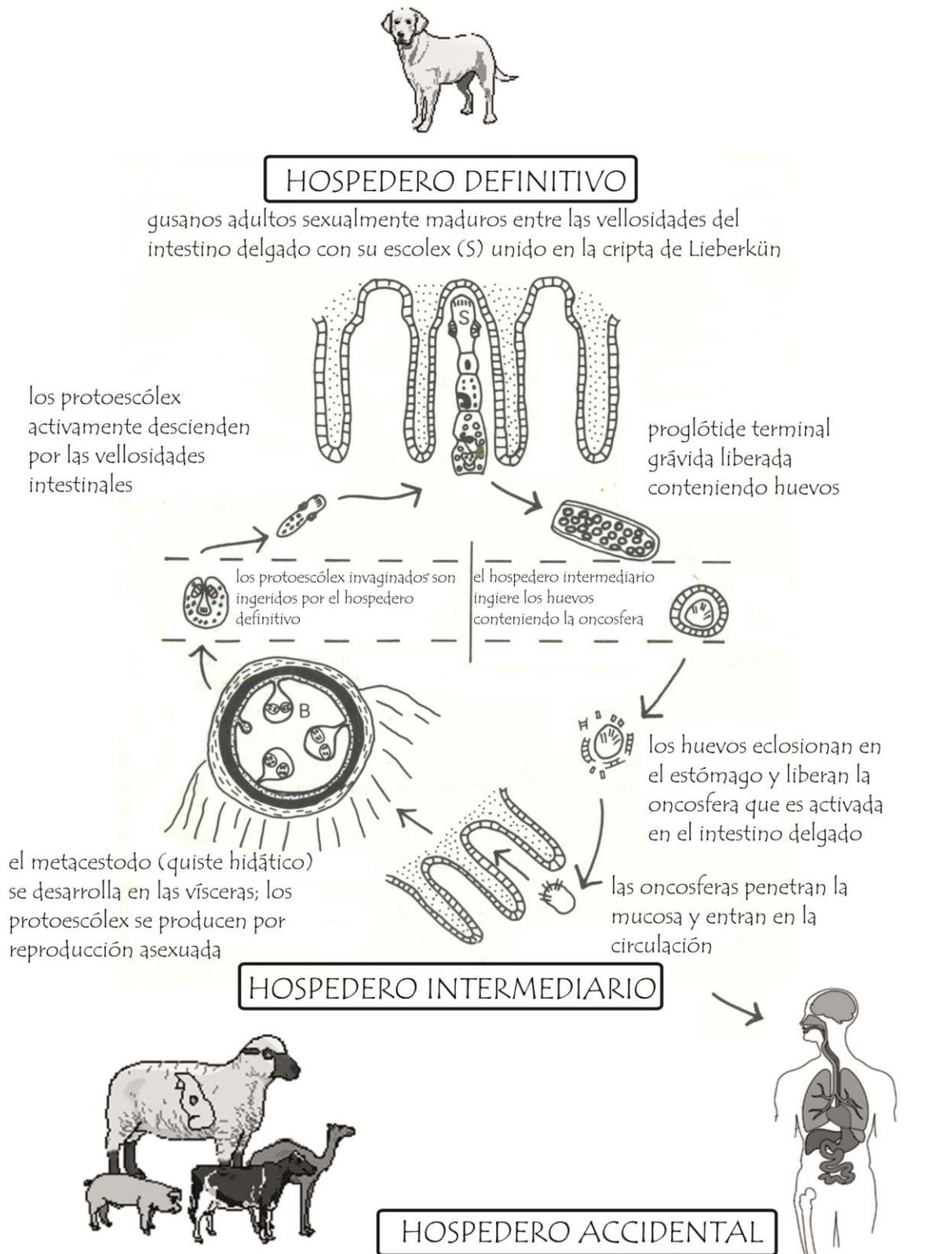


Figura 2. Ciclo biológico de *E. granulosus*. S, escolex; B, vesícula prolígera contenido protoescoléx. Extraído de Arbildi (2013).

1.1.3 Equinococosis quística

En humanos, las infecciones por *E. granulosus* son causa de morbilidad, e incluso pueden ocasionar la muerte si no se administra un tratamiento adecuado (Eckert et al. 2001; Brunetti et al. 2010). En las primeras etapas de la infección en los hospederos intermediarios, los quistes pueden aumentar su tamaño, sin consecuencias patológicas, llegando a ser asintomáticos. Esto dificulta el diagnóstico, el cual se realiza principalmente por ultrasonido, aunque también puede ser detectado por tomografía computarizada o resonancia magnética (Higuita et al. 2016). Los síntomas pueden aparecer meses o incluso años después, cuando los quistes comienzan a ejercer presión sobre los tejidos, y pueden manifestarse de diferentes formas. Esto dependerá del órgano en el que se aloja el quiste, su tamaño, la interacción con los tejidos circundantes y las complicaciones que puedan surgir por una posible ruptura del quiste (Eckert et al. 2001).

Existen varias opciones para el tratamiento, entre ellas la cirugía y la quimioterapia (Brunetti et al. 2016). La cirugía permite remover los quistes, alcanzando una cura completa. Sin embargo, no puede ser practicada a pacientes que presentan múltiples quistes dispersos en diferentes órganos, o si los mismos se encuentran en regiones en las que la intervención puede resultar riesgosa. Además, existe la posibilidad de que durante la cirugía se produzca una dispersión de material parasitario en los tejidos, generando una infección secundaria (Higuita et al. 2016). Por otra parte, en la quimioterapia se emplean drogas como los benzimidazoles desde 1970. Tanto el Albendazol (ABZ) como el Mebendazol (MBZ) han mostrado eficacia frente al estado larvario de *E. granulosus*, el ABZ es el tratamiento que se utiliza en la actualidad, en una dosis oral de 10-15 mg/kg por día, por 3-6 meses. Para aquellos pacientes que no puedan tolerarlo se utiliza una dosis de MBZ de 40-50 mg/kg tres veces por día. Otra droga utilizada es el praziquantel (PZQ) en una dosis 40 mg/kg, este último en combinación con ABZ parece tener mejores efectos en la destrucción de los PEs (Brunetti et al. 2016). Incluso se ha observado que un tratamiento con estos compuestos antes de una cirugía puede disminuir la presión dentro del quiste, facilitando su remoción. De todas formas el problema que presentan estas drogas es la gran cantidad de efectos secundarios que presentan empeorando la situación debido a los largos períodos de tiempo que se debe mantener el tratamiento. Es por esto que la búsqueda de nuevas drogas antihelmínticas,

parece ser una estrategia prometedora para la eliminación de esta parasitosis (Higuera et al. 2016).

1.2 Metabolismo de xenobióticos

1.2.1 Consideraciones generales

Los xenobióticos son compuestos exógenos que no pueden servir como fuente de energía ni como precursores de biomoléculas. La detoxificación de xenobióticos es llevada a cabo por un grupo de enzimas con un amplio espectro de actividades biológicas. Este grupo de proteínas usualmente se denominan enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs) (Matoušková et al. 2016). En un organismo, la mayoría de los xenobióticos son biotransformados a compuestos más polares que son fácilmente excretables. Se considera que éste metabolismo abarca tres fases (Figura 3). La fase I implica la oxidación, reducción o hidrólisis del compuesto. En la fase II los xenobióticos o sus metabolitos modificados en la fase I sufren reacciones de conjugación con compuestos endógenos como glutatión, ácido glucurónico, aminoácidos y sulfatos. El transporte activo de los xenobióticos y de sus metabolitos o conjugados a través de las membranas mediado por transportadores especializados representa la fase III del metabolismo de xenobióticos (Cvilink et al. 2009; Rushmore & Kong 2002).

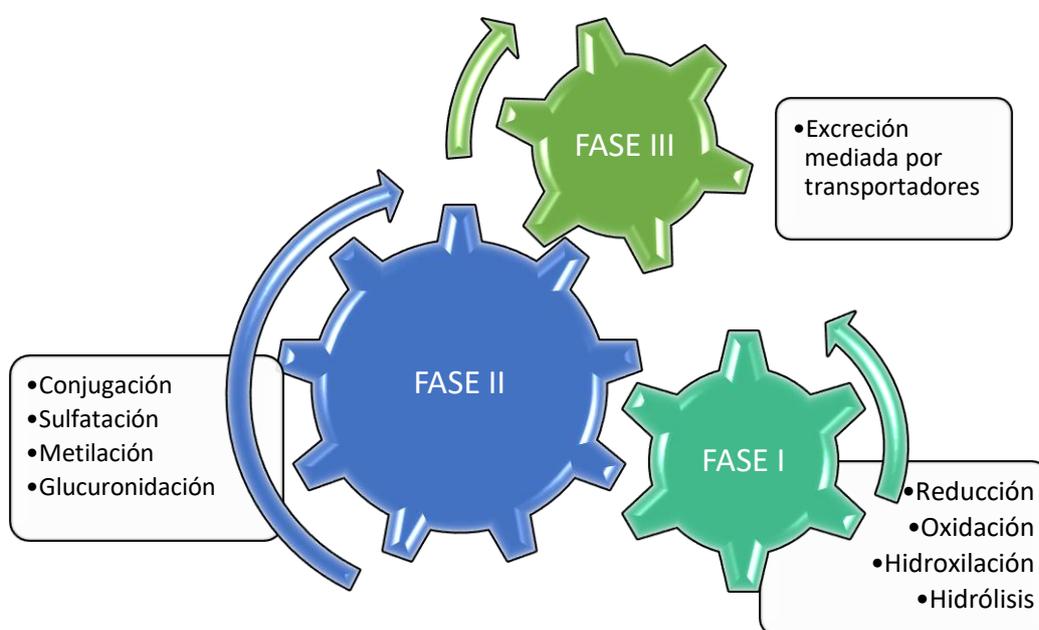


Figura 3. Esquema general de la detoxificación de xenobióticos.

Las principales enzimas involucradas en la fase I pertenecen al grupo de los citocromos P450 (CYPs). Este grupo de enzimas generalmente catalizan la monooxigenación de sustratos, pero también pueden catalizar reacciones de reducción y peroxidación (Anzenbacher & Anzenbacherová 2001). Las reacciones mediadas por las enzimas de fase I, generalmente llevan a la inactivación de muchos xenobióticos potencialmente peligrosos para el organismo, aunque también pueden mediar la bioactivación de estos compuestos (Ioannides & Lewis 2004).

En la fase II del metabolismo detoxificante participan muchas superfamilias de enzimas entre las que se incluyen las sulfotransferasas (SULTs) (Lindsay et al. 2008; Paul et al. 2012), UDP-glucuroniltransferasas (UGTs) (Fedejko & Mazerska 2011; Meech et al. 2012), NAD(P)H:quinona oxidoreductasa (Vasiliou et al. 2006), epóxido hidrolasas (Fretland & Omiecinski 2000; Morisseau & Hammock 2008), metiltransferasas (Oselin & Anier 2007), glutatión transferasas (GSTs) (Hayes et al. 2005; Higgins & Hayes 2011; Mannervik et al. 2005) y N-acetiltransferasas (NATs) (Grant 2008; Vatsis et al. 1995). Las XMEs de fase II generalmente aumentan la hidrofiliidad de sus sustratos, haciéndolos compuestos fácilmente excretables (en bilis y/u orina) y en consecuencia permitiendo la detoxificación. Sin embargo, al igual que con las reacciones de fase I, en algunos casos las reacciones de conjugación pueden resultar en la activación de los metabolitos y por tanto aumentar su toxicidad (Bolton et al. 2000; Bolton & Chang 2001; Glatt 2000). Finalmente, en la fase III del metabolismo de xenobióticos participan numerosos transportadores, dentro de los que se encuentran cinco familias principales; ABC (por sus siglas en inglés: ATP-binding cassette), MATE (por sus siglas en inglés: Multidrug and Toxic Compound Extrusion), MFS (por sus siglas en inglés: Major Facilitator Superfamily), RND (por sus siglas en inglés: Resistance-Nodulation-Cell Division) y SMR (por sus siglas en inglés: Small Multidrug Resistance) (Ardelli 2013). Estos transportadores no solo participan en la excreción de metabolitos que pasaron por las fases I y II, sino que también pueden actuar como barrera para el ingreso a la célula de múltiples drogas (Xu et al. 2005).

1.2.2 Metabolismo de xenobióticos en helmintos

Hasta la fecha no existen gran cantidad estudios publicados en cuanto al metabolismo de xenobióticos en parásitos helmintos. Sin embargo, la información disponible sugiere que estos tienen una capacidad reducida de neutralizar toxinas externas en comparación a los mamíferos que los hospedan (Barrett 2009; Cvilink et al. 2009). Es necesario un estudio más profundo del metabolismo de xenobióticos de estos parásitos, el cual podría contribuir a la identificación de mecanismos de resistencia, y a la búsqueda de potenciales blancos para la síntesis de nuevas drogas antihelmínticas o el desarrollo de vacunas (Matoušková et al. 2016). Mientras que la actividad monooxigenasa CYP fue ampliamente detectada en la naturaleza, por muchos años los intentos por demostrar su presencia en helmintos no fueron productivos, llevando a que se considere a estos organismos excepcionales por la falta de CYP (Barrett 1997; Precious & Barrett 1989). Este concepto fue revocado al realizar estudios de genómica, los cuales demostraron la existencia de genes CYP en *Caenorhabditis elegans* y en helmintos relevantes para la salud pública como *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *Trichinella spirallis*, *Onchocerca volvulus*, *Ascaris summ*, *Haemonchus contortus*, *Fasciola hepatica* (Cvilink et al. 2009; Brophy et al. 2012; Saeed et al. 2002; Cwiklinski et al. 2015; Laing et al. 2015). Recientemente, se demostró que la única copia del gen CYP en el genoma de *S. mansoni* era esencial para la sobrevivencia del parásito, implicando que podría ser un buen blanco de drogas para el tratamiento de la esquistosomiasis. Por otro lado *H. contortus* posee múltiples copias del gen CYP y se ha reportado la expresión en distintos estadios (Matoušková et al. 2016). Es necesario un estudio más detallado de estas enzimas, ya que parecen contribuir en gran medida a la resistencia de drogas antihelmíntica (Schuler 2011).

La biotransformación de xenobióticos mediante enzimas reductivas ocurre en menor medida con respecto a las oxidativas, pero en el caso de las cetonas, aldehídos, quinonas, y compuestos con grupos nitros, la reducción puede ser la vía metabólica principal (Matoušková et al. 2016). En los helmintos se ha encontrado un gran número de genes de deshidrogenasas/reductasas (SDRs) y aldo-ceto reductasa (AKRs) (Penning 2015). En contraste a las oxidasas, las enzimas reductivas e hidrolíticas en helmintos han sido consideradas como las enzimas más relevantes en las reacciones de fase I (Barrett 2009). El metabolismo reductivo mostró ser la principal vía metabólica para compuestos con grupos carbonilos. Estas enzimas ejercerían protección contra el efecto tóxico de aldehídos y cetonas

reactivos. La transformación reductiva también es una vía importante para azo- y nitro-compuestos. Por otro lado las reacciones hidrolíticas representarían la principal vía de eliminación para xenobióticos con grupos ésteres, amidas y compuestos cíclicos. En este sentido, los helmintos presentan una batería importante de enzimas con actividad esterasa, incluyendo fosfatasas capaces de hidrolizar nitrofenilfosfatos y organofosfatos (Cvilink et al. 2009).

En relación a la bioquímica del metabolismo de fase II, las enzimas GSTs juegan un rol principal en esta fase de detoxificación. Al ser estas enzimas el tema central de esta tesis, la información referente a las mismas será presentada en la sección siguiente. Por ejemplo, las UDP-glicosiltransferasas (UGTs) son enzimas que catalizan la unión covalente de hexosas a compuestos lipofílicos, mejorando de este modo su carácter hidrofílico. La glucuronidación y la glicosilación son las principales reacciones catalizadas por las UGTs. La glicosilación ha sido reportada como el mecanismo de desactivación de los benzimidazoles como el Albendazol y Flubendazol en *C. elegans* y *H. contortus*, de todas formas las UGTs en helmintos han sido muy poco estudiadas (Matoušková et al. 2016).

Con respecto a la fase III de detoxificación, los transportadores de membrana protegen al organismo contra diversos compuestos. El primer reporte sobre transportadores ABC en helmintos fue descrito en *C. elegans*, y desde ese entonces, diversos transportadores han sido reportados en helmintos como *H. contortus*, *O. volvus*, *A. summ*, *S. mansoni*, *S. japonicum* e incluso en *E. granulosus* (Lincke et al. 1992; Ardelli 2013; Greenberg 2013; Nicolao et al. 2014).

Tomando todo esto en cuenta, comprender como funcionan los mecanismos de detoxificación de xenobióticos en estos parásitos podría llevar al diseño racional de nuevas formulaciones vacunales y/o síntesis de nuevas drogas antihelmínticas.

1.3 Glutación transferasas

1.3.1 Consideraciones generales

Las enzimas glutación transferasas (E.C. 2.5.1.18) son una superfamilia de proteínas multifuncionales con roles fundamentales en la fase II de detoxificación celular de un amplio rango de componentes exógenos y endógenos (Matoušková et al. 2016). Estas catalizan la

conjugación del tripéptido glutatión (GSH: γ -glutamil-cisteinil-glicina) a una amplia variedad de compuestos que contienen un centro electrofílico, en general promoviendo su inactivación, degradación y/o excreción (Oakley 2011).

Originalmente se las consideraba únicamente como enzimas detoxificantes de fase II, cargadas de conjugar GSH a distintos compuestos. Sin embargo, estas están relacionadas con una gran variedad de reacciones de carácter fisiológico. Dentro de estas se pueden destacar: (i) la protección celular frente al estrés oxidativo; (ii) procesos de detoxificación pasiva (transportadores de sustancias nocivas); (iii) biosíntesis de leucotrienos, prostaglandinas, progesterona y testosterona; (iv) catabolismo de aminoácidos; y (v) modulación en procesos de señalización (Plancarte et al. 2014; Cvilink et al. 2009; Higgins & Hayes 2011; Adler et al. 1999; da Fonseca et al. 2010).

Las GSTs están ampliamente distribuidas en una gran variedad de organismos. Estas pueden clasificarse en tres grandes familias, las cuales presentan características estructurales propias y un origen evolutivo separado: GSTs citosólicas, GSTs microsomales, denominadas MAPEG (por sus siglas en inglés: Membrane Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione metabolism) y GSTs mitocondriales de clase Kappa (Higgins & Hayes 2011). Estas tres familias comparten la capacidad de conjugar glutatión a diferentes sustratos, pero presentan importantes diferencias a nivel de su estructura, distribución y localización.

Las GSTs citosólicas han sido el grupo más estudiado, estando presente en todos los organismos aerobios reportados hasta la fecha. Por ejemplo, en mamíferos, las GSTs han sido catalogadas en siete clases diferentes: Alfa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta y Omega (da Fonseca et al. 2010). Inicialmente la clasificación de las GST se basó en las propiedades bioquímicas e inmunológicas que estas poseían. La amplia variedad y superposición de la especificidad de sustratos presentó un problema al intentar extender la clasificación a otros organismos, por lo cual se decidió utilizar como principal criterio de clasificación el análisis directo de la secuencia aminoacídica (Cvilink et al. 2009). Si bien algunas de estas clases son compartidas entre los distintos organismos, existen otras específicas de plantas (Phi, Tau, Lambda), de insectos (Delta y Epsilon), de bacterias (Beta) y de peces (Ro) (da Fonseca et al. 2010). Se considera que las proteínas que forman parte de una misma clase tienen al menos un 40 % de identidad de secuencia a nivel de aminoácidos, mientras que proteínas que pertenecen a

distintas clases presentan menos de un 25% de identidad (Hayes et al. 2005; da Fonseca et al. 2010). Por otro lado, las GSTs citosólicas están formadas por dos dominios. El N-terminal adopta una conformación tipo tiorredoxina ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$) el cual es responsable de la unión al GSH, mientras que en el dominio C-terminal, formado por α -hélices, es donde se encuentra el dominio de unión al sustrato hidrofóbico (da Fonseca et al. 2010). Si bien todas las GSTs citosólicas comparten un plegamiento y una estructura tridimensional similar, existen diferencias entre las clases que determinan sus características particulares a nivel de la catálisis. En particular, el tipo de residuos que participan en la unión del GSH y su localización en la proteína plegada afectará el mecanismo catalítico de estas enzimas. Este hecho ha llevado a proponer una agrupación diferente para las GSTs citosólicas en función de su residuo catalítico (Higgins & Hayes 2011). Esta clasificación plantea que las GSTs de clases Alfa, Mu, Pi y Sigma presentan más similitudes entre ellas que con el resto de las GSTs, dando lugar a las denominadas Y-GSTs. Este término deriva de que todas las GSTs que componen el grupo requieren la interacción de un residuo conservado de Tyr con el GSH en su mecanismo catalítico (Atkinson & Babbitt 2009). El otro grupo de GSTs, denominado S/C-GSTs, estaría constituido por el resto de las GSTs citosólicas, las cuales presentan como residuo clave para la catálisis una Ser (clases Theta y Zeta) o Cys (clase Omega) (Atkinson H. J. y Babbitt P. C., 2009). Dentro de las S/C-GSTs, existen diferencias en su mecanismo catalítico. La Ser presente en las GSTs de clase Theta cumpliría un rol similar al de la Tyr de las Y-GSTs (Frova 2006), mientras que Cys de la clase Omega formaría un disulfuro mixto con el GSH, lo que posibilitaría su transferencia en una reacción similar a la catalizada por las glutarredoxinas.

1.3.2 Reacciones catalizadas por las glutatión transferasas

Hasta el momento, las GSTs citosólicas se han reportado activas únicamente como dímeros de subunidades de 23-30 kDa, formando tanto homodímeros como heterodímeros con subunidades de la misma clase (da Fonseca et al. 2010; Fabrini et al. 2009; Perbandt et al. 2015). Cada monómero posee dos sitios de unión a sustratos, denominados sitio H y sitio G. El sitio de unión al GSH (sitio G) se encuentra en el N-terminal, y es altamente conservado. Mientras que el sitio de unión al sustrato hidrofóbico (sitio H) se encuentra en el C-terminal, y presenta la mayor variabilidad entre las diferentes clases de GSTs (Chaurasia et al. 2016).

El primer reporte de la actividad GST fue descrito en 1961 por Booth et al. quienes purificaron por primera vez una fracción hepática que catalizaba la conjugación de GSH a varios compuestos (Booth et al. 1961). Como ya se comentó, las GSTs catalizan la conjugación de GSH a diferentes compuestos. La actividad canónica de las GST se determina midiendo la conjugación de GSH al sustrato universal 1-cloro-2,4-dinitrobeneno (CDNB) (Figura 4).

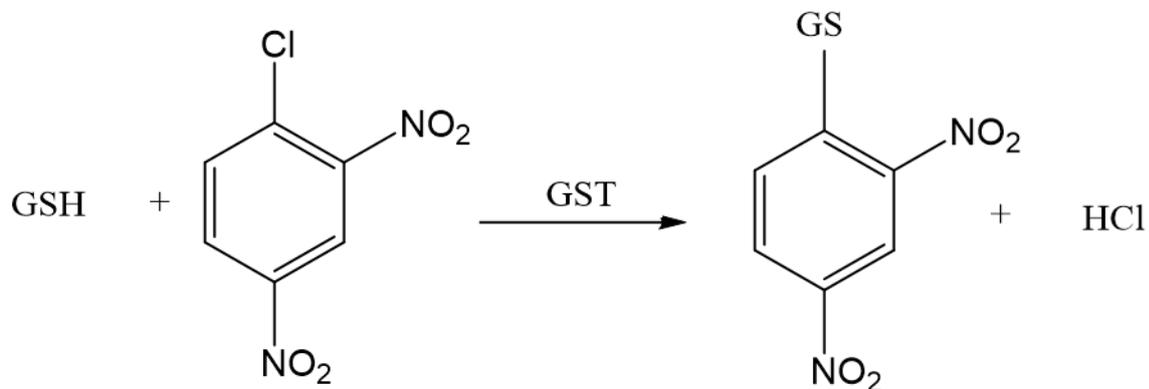


Figura 4. Sustitución nucleofílica aromática de GSH en CDNB catalizada por las enzimas GST.

La principal diferencia entre las GSTs y su especificidad de sustrato, radica en la interacción de la proteína con el sulfuro del GSH. De esta manera, dentro de las diferentes actividades de las GST podemos encontrar:

- **Actividad Peroxidasa dependiente de GSH (GPx).** Actividad originalmente característica de las GST de clase Alfa, pero encontrada por ejemplo en la clase Mu de *E. granulosus* (EgGST1) (Harispe et al. 2010). Esta actividad permite la inactivación de peróxido lipídicos que pueden ser generados por la exposición celular a especies oxidantes (Figura 5) (Hayes et al. 2005).

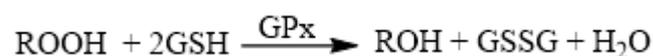


Figura 5. Actividad peroxidasa dependiente de GSH.

- **Dehidroascorbato reductasa.** Actividad característica de las GST de clase Omega, la cual le permite la recuperación del ácido ascórbico (Figura 6). Este es un importante antioxidante, involucrado en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno, como el superóxido, ozono y peróxidos de hidrogeno, los cuales son producidos como parte del metabolismo aerobio (Yang et al. 2009).

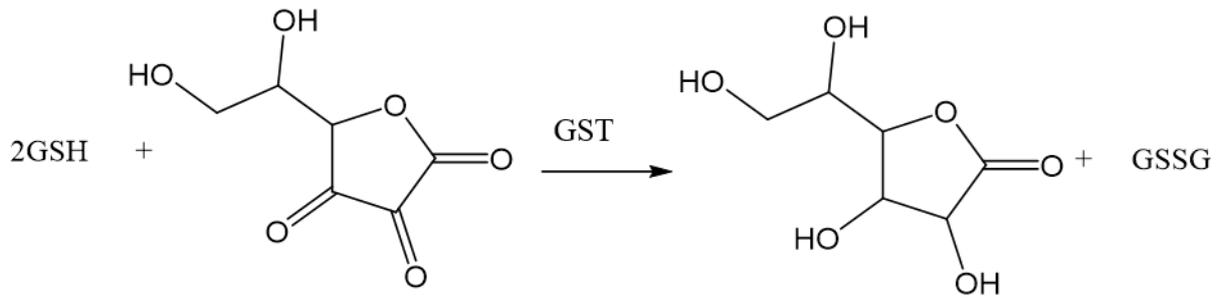


Figura 6. Actividad dehidroascorbato reductasa.

- Tioltransferasa (GRx).** Actividad característica de las GST de clase Omega. Esta se caracteriza por realizar reacciones de glutationilización y deglutationilización de residuos de Cys de proteínas, mediante la formación de disulfuros mixtos con el GSH, impidiendo de esta forma su modificación por moléculas oxidantes y protegiéndolas del estrés oxidativo (Figura 7) (Menon & Board 2013; Whitbread et al. 2005). Este proceso actúa como un mecanismo de protección de dichos residuos evitando su oxidación, que podría conducir a una pérdida de función de la proteína (Townsend 2007). Asimismo, la incorporación de GSH podría producir cambios estructurales en la proteína, que podrían ser importantes tanto para la regulación de su actividad como para su localización subcelular.

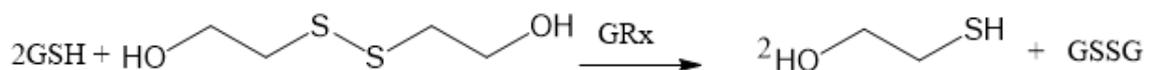


Figura 7. Actividad tioltransferasa.

- Actividad prostaglandina sintasa (PGDS).** Actividad característica de la clase Sigma, específicamente capaz de catalizar la conversión de prostaglandina H₂ (PGH₂) a diferentes prostaglandinas: PGE₂ y PGD₂ (Figura 8). Específicamente hablando de la infección por *F. hepatica*, se vio que esta actividad está relacionada con el desarrollo y la reproducción del parásito, así como la modulación de la respuesta inmune del hospedero (LaCourse et al. 2012). La PGD₂ ejerce diversos efectos en sus células blanco a través de dos receptores de superficie diferentes. En función del tipo de receptor involucrado y de la concentración de prostaglandina, la PGD₂ puede tener efectos pro- o anti- inflamatorios (La-Rocca 2014). La síntesis de PGD₂ por parte de las

GSTs parasitarias podría así estar involucrada en la polarización de la respuesta inmune del hospedero, hacia un perfil de respuesta tipo Th2, permitiendo el establecimiento y sobrevivencia del parásito (LaCourse et al. 2012; Dowling et al. 2010).

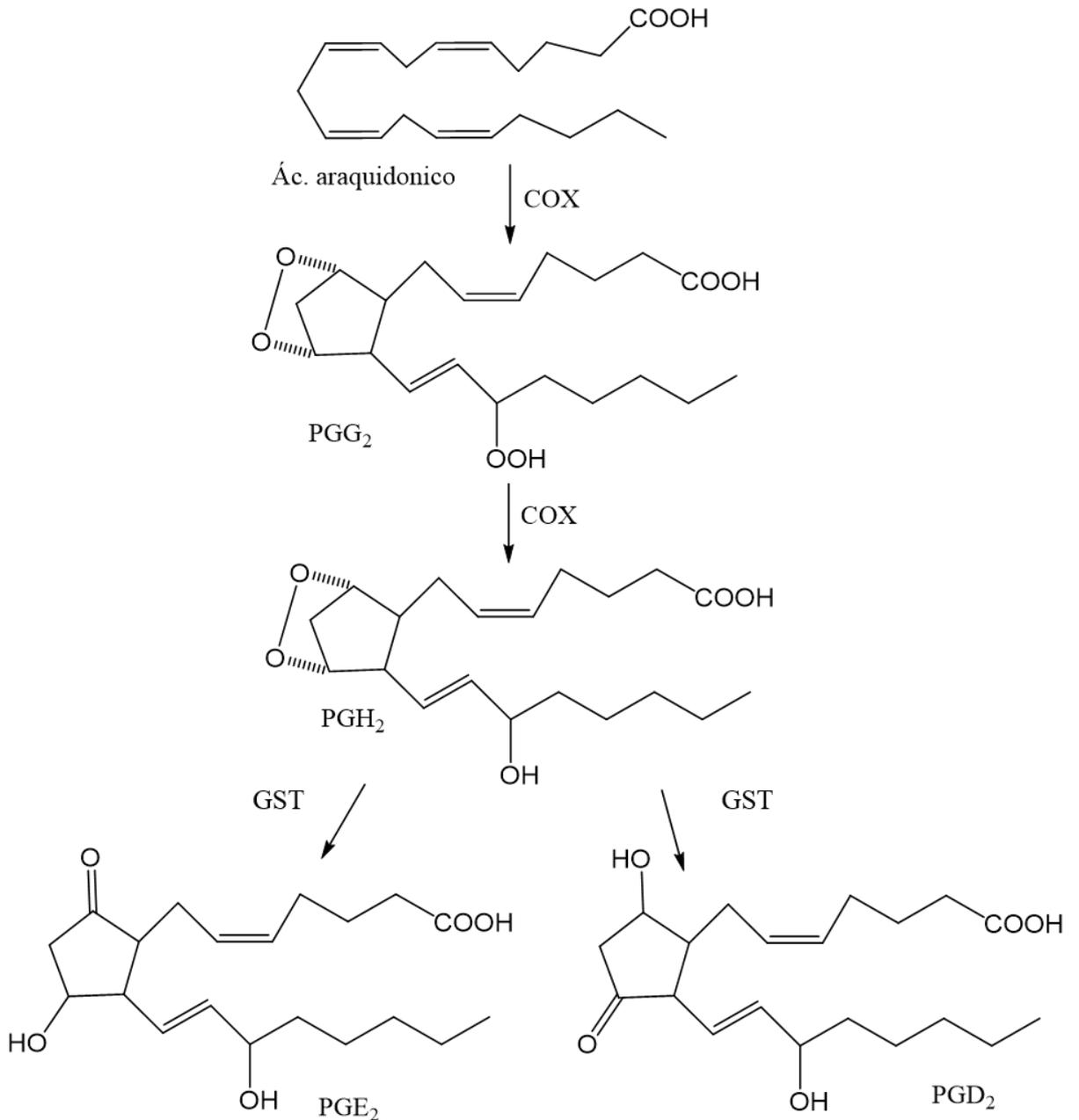


Figura 8. Síntesis de prostaglandinas.

1.3.3 GST de Helmintos

En los parásitos helmintos que carecen de CYP, las GST juegan un rol crucial en la detoxificación, no solo de compuestos generados como consecuencia del propio

metabolismo del parásito sino también los producidos por las células del sistema inmune del hospedero.

La mayoría de las GST de helmintos pertenecen a la clase Mu y Sigma, aunque algunas muestran tener una gran variedad de especificidad de sustratos y/o inhibidores que se superponen entre las diferentes clases (Kim et al. 2016). Entre los helmintos, las GSTs presentan grandes diferencias en la especificidad de sustrato, actividad catalítica e inmunogenicidad. Esto lleva a que entre diferentes helmintos las GSTs tengan un bajo grado de identidad de secuencia y aún más con las GSTs de mamíferos, lo cual dificulta la clasificación (Torres-Rivera & Landa 2008). El sistema inmune del hospedero produce agentes oxidantes que dañan macromoléculas parasitarias, por ejemplo, lípidos de membrana, los cuales pueden llevar a la muerte del parásito. Dado que los helmintos poseen escasos sistemas de detoxificación, sus GSTs adquieren gran relevancia tanto reparando el daño ocasionado por el ataque inmune como actuando sobre compuestos xenobióticos (Figura 9) (Torres-Rivera & Landa 2008; Liebau, Müller, et al. 1996; Brophy et al. 1989; Vibanco-Pérez et al. 2002; Liebau et al. 1997; Liebau, Wildenburg, et al. 1996; McTigue et al. 1995). La expresión de estas enzimas se ha visto relacionada a la resistencia de diversas drogas antihelmínticas (Matoušková et al. 2016). Además, algunas GSTs parasitarias pueden reducir peróxidos orgánicos (actividad GSH-peroxidasa) y/o pueden actuar como proteínas de transporte o reserva intracelular de moléculas provenientes del hospedero (Brophy et al. 1989). Otras GSTs son capaces de producir compuestos inmunomoduladores como las prostaglandinas, permitiendo a los parásitos influir sobre la respuesta inmune del hospedero, y de esta forma establecerse y sobrevivir en él (Sommer et al. 2003).

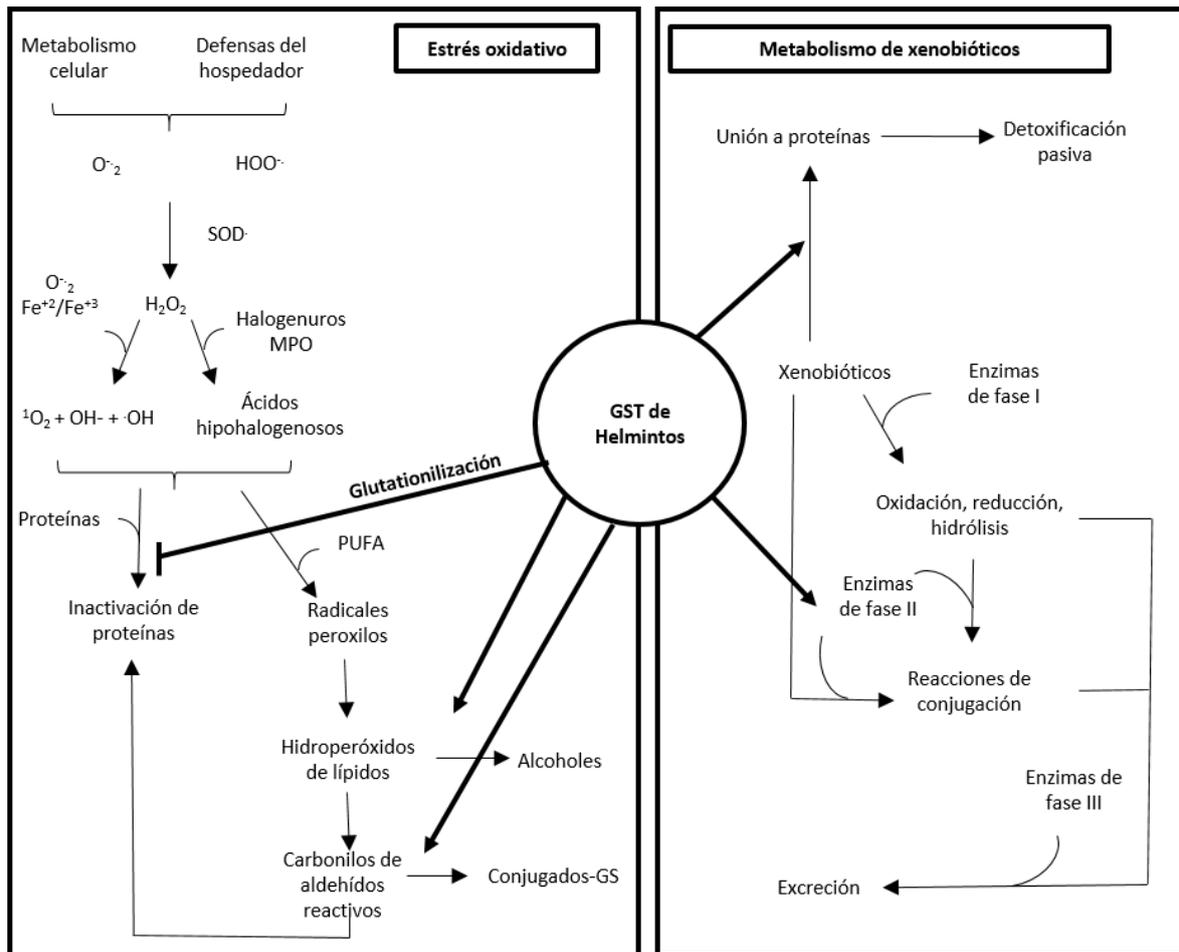


Figura 9. Mecanismos de detoxificación en los que participan las glutatión transferasas parasitarias. Modificado de Arbildi et al. (2011).

A pesar de la existencia de múltiples GSTs en diferentes parásitos helmintos, y su relación con la detoxificación de xenobióticos, aún falta evidencia en relación a su función en el metabolismo de antihelmínticos (Matoušková et al. 2016). Sin embargo, ya se han identificado GSTs parasitarias capaces de conjugar GSH a productos secundarios de la peroxidación de lípidos, tanto en platelmintos (*E. multilocularis*, *E. granulosus*, *Taenia solium* y *Moniezia expansa*) como en nematodos (*O. volvulus* y *A. suum*) (Brophy et al. 1989; Liebau, Müller, et al. 1996; Liebau, Wildenburg, et al. 1996; Liebau et al. 1997; Vibanco-Pérez et al. 2002; Harispe et al. 2010).

Por otra parte, las GSTs pueden proteger a las células en condiciones de estrés oxidativo (Burmeister et al. 2008; Kampkötter et al. 2003). En particular, se han identificado GSTs que podrían estar involucradas en la glutationilación reversible de proteínas (Cwiklinski et al.

2015). Específicamente, la clase Omega de GST ha sido caracterizada en varios helmintos (*O. volvulus*, *S. mansoni*, *Fasciola spp* y *C. elegans*), los cuales pueden presentar esta actividad (Morphew et al. 2012; Girardini et al. 2002; Liebau et al. 2000; Liebau et al. 2008).

Tomando todo esto en cuenta, las GSTs comprenden una superfamilia de enzimas de alta importancia para la supervivencia de los parásitos helmintos, y de especial interés para el estudio de nuevos blancos para drogas antihelmínticas o formulaciones vacunales (Matoušková et al. 2016).

1.3.4 Glutati3n transferasas en *E. granulosus*

Al igual que en varios helmintos, se ha detectado actividad GST en *E. granulosus* (Morello et al. 1982; Repetto et al. 1986). Trabajos previos por parte de nuestro grupo han identificado y caracterizado una enzima denominada EgGST1 con actividad GST proveniente de un extracto de PEs (Fernández et al. 2000; Fernández & Hormaeche 1994). Esta enzima presenta homología con la clase Mu de mamíferos y fue caracterizada como una enzima con funciones detoxificante en el contexto de una infecci3n (Harispe et al. 2010). Por otro lado, el análisis del transcriptoma completo de *E. granulosus* mostro la existencia de secuencias que codifican para al menos ocho GSTs. Dentro de estas se identificaron que cuatro pertenecen a las clase Mu, dos a la clase Sigma y una microsomal y otra que no se conoce la clase a la cual pertenece (Tsai et al. 2013). Más aún, en un estudio genómico más específico se confirmó la presencia de dos nuevas GST citos3licas identificadas como EgGST2 y EgGST3 (Iriarte et al. 2012). Los estudios filogenéticos confirmaron que EgGST2 pertenece a la clase Sigma (Iriarte et al. 2012). En otros helmintos esta clase de GST presenta un rol inmunomodulador, mediante la síntesis de prostaglandinas (LaCourse et al. 2012). Por otro lado la secuencia de la EgGST3 no pudo ser clasificada dentro de ninguna clase descrita hasta el momento, debido a que posee similitudes a las GSTs de clase Sigma, pero presenta un residuo de Cys en el sitio catalítico, concordante con las GST de clase Omega (Iriarte et al. 2012). El clonado y expresi3n de ambas enzimas recombinantes en un sistema procariota formo parte de dos trabajos de maestrías de nuestro grupo de trabajo (Arbildi 2013; La-Rocca 2014). Si bien no fue posible obtener las enzimas recombinantes enzimáticamente activas, ambas fueron utilizadas para la producci3n de antisueros específicos. A su vez fue posible obtener de forma activa una enzima heterodimérica compuesta por las subunidades EgGST2 y EgGST3 (La-Rocca 2014). Esta

enzima se ha encontrado en el sonicado de PEs (datos aceptados para su publicación Arbildi et al.).

El presente trabajo se centra en la caracterización bioquímica de esta enzima heterodimérica EgGST2-3r y la expresión de los homodímeros recombinantes correspondientes en un modelo de expresión eucariota (Young & Robinson 2014; Parker & Newstead 2014; Bill 2014; Gelperin et al. 2005) .

1.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las GSTs filogenéticamente diferentes de *E. granulosus*, EgGST2 y EgGST3, se asocian para formar una enzima heterodimérica activa (EgGST2-3) posiblemente para adquirir nuevas propiedades que beneficien la infección en el hospedero.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Nuestro grupo tiene como objetivo general contribuir a la comprensión de la relación hospedero-parásito en la infección por *E. granulosus* a través de la tipificación de las GSTs parasitarias, enzimas que, como se ha documentado tendrían un papel clave en la biología de la infección por helmintos.

1.5.2 Objetivos específicos

1- Caracterizar las actividades catalíticas y no catalíticas de EgGST2-3r.

2- Establecer los perfiles de sustratos del heterodímero recombinante.

3- Determinar el patrón de inhibidores de la EgGST2-3r.

4- Expresar y purificar las tres EgGSTs homodiméricas recombinantes enzimáticamente activas (EgGSTr) en levaduras.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Plásmidos

En este trabajo se utilizaron dos vectores diferentes para la producción de proteínas recombinantes en un modelo procariota, previamente clonados (Iriarte et al. 2012; La-Rocca 2014). La región codificante de EgGST2 fue clonada en el vector pET28a (Promega), junto con una cola de histidina, necesaria para la purificación por cromatografía de afinidad en Ni-agarosa. Este vector le confiere resistencia a la kanamicina en una concentración de 50 µg/mL (Iriarte et al. 2012). La región codificante de EgGST3 fue clonada en el vector pET5a (Novagen), que confiere resistencia a la ampicilina en una concentración de 200 µg/mL (La-Rocca 2014).

Para el modelo eucariota, las construcciones fueron fabricadas por GenScript en el plásmido pYES2 (Thermo Fisher Scientific). La región codificante para cada homodímero recombinante (*EgGST1*, *EgGST2*, *EgGST3*) fue introducido en tres vectores diferentes, junto con una cola de histidina, necesaria para la purificación por cromatografía de afinidad en Ni-agarosa.

2.2 Expresión y purificación de EgGST2-3r

2.2.1 Expresión de EgGST2-3r

La expresión del heterodímero se realizó según lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (La-Rocca 2014), con algunas modificaciones. Para la expresión de EgGST2-3r se realizó un cultivo nocturno de 10 mL de LB (Luria Bertani, kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 200 µg/mL) de células transformadas de la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* con los plásmidos correspondientes, el cual se diluyó a un volumen final de 600 mL conteniendo además glucosa en una concentración de 1 %. El cultivo se dejó crecer a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.4-0.6 a 600 nm y se enfrió en hielo por 10 minutos. Luego se indujo la expresión de EgGST2-3r mediante el agregado de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) en una concentración final de 0.66 mM durante 3-4 horas a 20 °C. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado durante 10 minutos a 4400 g a 10 °C, y el precipitado celular fue resuspendido en buffer de lisis (1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8). La lisis se realizó por sonicado durante 10 minutos (power 40, pulse 30 %). Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a 4472 g, seguida por dos centrifugaciones de

10 minutos a 15871 g. La fracción soluble fue obtenida para realizar los pasos de purificación sobre la misma.

2.2.2 Purificación de EgGST2-3r

La purificación de EgGST2-3r se realizó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Ni-agarosa (Invitrogen), utilizando la cola de histidina presente en la subunidad EgGST2 de la proteína de interés. En primer lugar, se equilibró la resina con solución de lisis (1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8). Luego, se pasó la fracción soluble obtenida en la sección anterior. Tras lavar la columna con buffer de lavado (20 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 20 mM imidazol), las proteínas retenidas se eluyeron con imidazol 250 mM en el mismo buffer. Se cuantificó la concentración proteica por absorbancia a 280 nm, considerandose 1 unidad de absorbancia igual a 1.0 mg/mL. La muestra se concentró hasta obtenerla a 10 mg/mL y se realizó un paso extra de purificación por gel filtración en Superdex-75 (GE-Healthcare) equilibrado con 20 mM Tris-HCl (pH 8) conteniendo 150 mM NaCl. La proteína purificada se conservó a -20 °C en una concentración de 1 mg/mL hasta su uso.

2.2.3 SDS-PAGE unidimensional

Las electroforesis SDS-PAGE fueron realizadas según protocolos estándar (Laemmli 1970). Se incorporó a las muestras un volumen igual de buffer muestra 2X (0.125 M Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % v/v Glicerol, 0.2 M DTT, 0.02% Bromophenol Blue, pH 6.8). Se prepararon geles 15 % y se tiñeron con Coomassie Blue R-250 (0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250, etanol 30 %, Ácido Acético 10 %).

2.2.4 Western blot

Las proteínas previamente separada por SDS-PAGE en una dimensión fueron transferidas a una membrana de PVDF (previamente tratada con metanol y equilibrada con agua) y detectadas por anticuerpos específicos (Towbin et al. 1979). La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó usando electrodos de carbono grafito en condiciones semisecas (Novablot, LKB), en buffer de transferencia (190 mM glicina, 25 mM Tris pH 8, metanol 20 %), siguiendo las indicaciones del fabricante (0.8 mA/cm²) por 45 minutos. La visualización de las proteínas se realizó por tinción de la membrana con Fast Green. Posteriormente, la membrana se bloqueó con PBS conteniendo Tween 0.5 % y leche descremada al 1 %, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó la membrana con los sueros en las

diluciones correspondientes en PBS-Tween-leche durante toda la noche a 4 °C. Se lavó la membrana con PBS-Tween y se incubó con un conjugado anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) por una hora a 37 °C (dilución 1/5000 en PBS-Tween-leche). Por último se reveló con 100 µl de Fosfato de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indoilo (BCIP) 15 mg/ml en N,N-Dimetil Formamida (DMF) y 100 µl de azul de nitro tretazolio (NBT) 30 mg/ml (H₂O:DMF, 30:70) en 10 ml de buffer carbonato (NaHCO₃ 0.1 M, MgCl₂ 1 mM pH 9.8).

2.3 Caracterización de EgGST2-3r

2.3.1 Actividad glutatión transferasa

La actividad glutatión transferasas fue determinada a 25 °C en un volumen de reacción de 1 mL, en 100 mM KH₂PO₄ pH 6.5, conteniendo 10 µg de EgGST2-3r, 1 mM CDNB y 4 mM GSH (Morello et al. 1982). La formación de producto fue monitoreada por 1 minuto a 340 nm ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se calculó la actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 µmol de sustrato por minuto. La velocidad de reacción no enzimática se sustrajo de las velocidades enzimáticas. Esta actividad se halló luego de cada purificación como una forma de evaluar la integridad de la proteína.

2.3.2 Estabilidad de EgGST2-3r

La estabilidad de EgGST2-3r se evaluó como se describe en Wang et al. (2014) utilizando una concentración final de 10 % de PEG-6000 (Wang et al. 2014). La EgGST2-3r en 20 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, se sometió a distintas condiciones de fuerza iónica (25-300 mM de NaCl) y de pH (7 a 9). Determinando la concentración de proteínas remanente en la fracción soluble, luego de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Asimismo, se analizó la estabilidad a diferentes temperaturas de almacenamiento (4, -20 y -80 °C) en presencia de glicerol (0-50 %) como conservante, a corto y mediano plazo. La integridad de la proteína se evaluó midiendo la actividad específica GST en condiciones estándar antes y después de cada tratamiento.

2.3.3 Actividad específica con otros sustratos

La actividad específica de la EgGST2-3r con distintos sustratos fue evaluada según la literatura a 25 °C utilizando 10 µg de la enzima (Tabla 1) (Habig et al. 1974; Brophy et al. 1989).

Tabla 1. Condiciones generales para los ensayos de conjugación con GSH junto a cada sustrato.

Sustrato	[sustrato] mM	[GSH] mM	pH	λ (nm)	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)
CDNB	1	4	6.5	340	9.6
1,2-dicloro-4-nitrobenceno (DCNB)	1	5	7.5	340	8.5
Ác. Etacrínico	0.2	0.25	6.5	270	5
<i>trans, trans</i> -2,4-decadienal	0.05	2.5	6.5	280	-29.7

Cada reacción se siguió por 1 minuto y se calculó la actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) como la cantidad de enzima necesaria para convertir 1 μmol de sustrato por minuto. La velocidad de reacción no enzimática se sustrajo de las velocidades enzimáticas. Los datos representan determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes. El análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

2.3.4 Perfil de inhibidores

Se realizaron estudios de inhibición de la actividad canónica ([CDNB] 1 mM, [GSH] 4 mM) frente a inhibidores convencionales y drogas antihelmínticas (Tabla 2). Del ajuste de los gráficos de velocidad en función de sustrato en presencia de inhibidor se calcularon las IC_{50} (Motulsky, H., y Christopoulos 2004). Los datos representan determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes. El análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Tabla 2. Rango utilizado para cada inhibidor.

	Rango testeado (μM)
INHIBIDORES CONVENCIONALES	
Cloruro de Trifenilestaño (TPT)	0-500
Bromosulfotaleína (BSP)	0-500
Cibacron Blue	0-500
Ác. Elágico	0-500
Alizarin	0-500
Nitropiridin-N-oxido	0-500
<i>trans,trans</i> -2,4-decadial	0-1000
Ác. Quenodesoxicólico	0-6600
Bilirrubina	0-1000
DROGAS ANTIHELMINTICAS	
Praziquantel	0-1000
Benzimidazoles:	
Albendazol	0-500
Fenbendazol	0-500
Mebendazol	0-500
Fenoles halogenados:	
Rafoxanida	0-300
Closantel	0-100
Hexaclorofeno	0-100
Bitionol	0-200

2.3.5 Actividad dehidroascorbato reductasa

La actividad fue determinada a 30 °C en un volumen de reacción de 1 mL, en 200 mM KH_2PO_4 pH 6.85, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 3 mM GSH, 1.5 mM ácido dehidroascorbico (DHA) y 10-100 μg de EgGST2-3r (Schmuck et al. 2005). La reacción se siguió por 2 minutos a 265 nm ($\epsilon_{\text{ascorbato}} = 14.7 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) luego del agregado de la enzima. La velocidad de reacción no enzimática se sustrajo de las velocidades enzimáticas. Los datos representan determinaciones por duplicado de dos experimentos independientes. El análisis

de los resultados se llevó a cabo empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

2.3.6 Actividad tiol transferasa

La actividad fue determinada a 30 °C en un volumen de reacción de 1 mL, en 50 mM KH₂PO₄ pH 8, 0.5 mM GSH, 0.2 mM NADPH, 0.5 U glutatión reductasa, 2 mM 2 hidroxietil disulfuro (HEDS) y 10-100 µg de EgGST2-3r (Figura 10). La mezcla de reacción se incubo por 3 minutos y se siguió la oxidación del NADPH luego del agregado del mismo por 5 minutos a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Schmuck et al. 2005). La velocidad de reacción no enzimática se sustrajo de las velocidades enzimáticas. Los datos representan determinaciones por triplicado de dos experimentos independientes. El análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

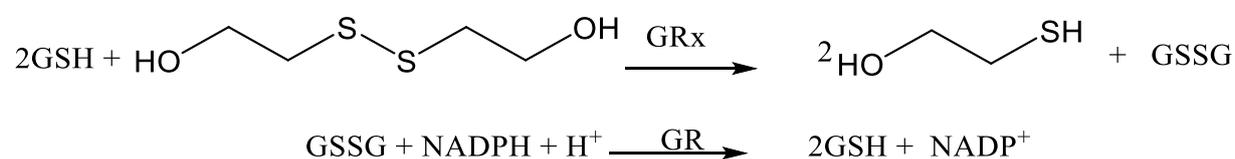


Figura 10. Actividad tioltransferasa dependiente de GSH acoplada a la oxidación de NADPH.

2.3.7 Actividad prostaglandina sintasa (PGDS)

La actividad fue determinada a 25 °C en un volumen de reacción de 1 mL, 100 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 10 mM GSH, 50 mM NaCl, 0.5 mM triptófano, 100 µM ácido araquidónico, hematina:COX-2 1U y 10-100 µg de EgGST2-3r. La mezcla fue incubada por 10 minutos a 37 °C, seguido de una incubación de 4 minutos a 25 °C, con agitación (LaCourse et al. 2012). Las prostaglandinas fueron extraídas al agregar 2.5 mL de hexano:isopropanol:ác. acético (30:20:2), mezclándose por 30 segundos y se agregó 2.5 mL de hexano. Se centrifugó la mezcla a 10000 g por 2 minutos a 4 °C. La capa superior se separó y el solvente fue evaporado. La mezcla se reconstituyó en metanol y fue inyectada en un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo con trampa lineal (QTRAP4500, ABSciex) acoplado a cromatografía líquida (Infinity 1260 series, Agilent). Las muestras se separaron por cromatografía líquida de fase reversa (columna Luna C18(2), 100 x 2 mm, 5 µm) empleando un gradiente de acetonitrilo (30-100 %) en agua con 0.05% de ácido acético. La detección se realiza mediante un experimento de MRM (del inglés: multiple reaction monitoring) en modo negativo con

transiciones específicas para cada analito (LaCourse et al. 2012). El análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

2.3.8 Actividad peroxidasa dependiente de glutatión

Esta actividad se evaluó acoplándola a la oxidación de NADPH (Figura 11).

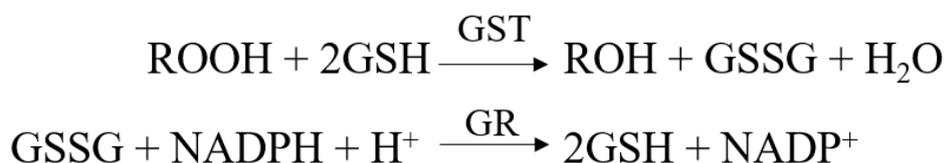


Figura 11. Actividad peroxidasa dependiente de GSH acoplada a la oxidación de NADPH.

El ensayo se realizó aumentando las concentraciones de enzima (0-5 μM) en presencia 1.2 mM de hidroperóxido de cumeno, 1 mM GSH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La oxidación del NADPH se siguió a 340 nm según Haripe et al. (2010). Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro T70+ UV/Vis (PG instruments Ltd) a 30 °C en cubetas de paso óptico de 1 cm. Las velocidades iniciales se midieron a intervalos de 0.1 s por un período total de 5 minutos. La reacción se inició por agregado de la enzima a 0.1 M de KH_2PO_4 pH 7 conteniendo; 0.2 mM de NADPH, 2 U de glutatión reductasa (GR), hidroperóxido de cumeno (CHP) y GSH. El CHP fue disuelto en etanol 90 % (v/v). La concentración final de etanol en la mezcla de reacción fue constante de 0.9 % (v/v). La velocidad de reacción no enzimática se sustrajo de las velocidades enzimáticas. La velocidad de reacción enzimática fue lineal entre 2-5 minutos luego del inicio. Los datos representan determinaciones por triplicado de tres experimentos independientes. La determinación de algunos de los parámetros cinéticos se realizó según describe Danielson and Mannervik (1985) (Ecuación 1). Los análisis de regresión no lineal se llevaron a cabo mediante método iterativo, empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

$$v/[HD] = k_{\text{cat}}/K_M^{\text{CHP}} [\text{CHP}] \quad \text{Ecuación 1. HD: heterodímero, CHP: hidroperóxido de cumeno.}$$

2.3.9 Actividad ligandina

Se siguieron los cambios en la intensidad de fluorescencia de la enzima durante el agregado de inhibidores convencionales y drogas antihelmínticas para determinar las constantes de

disociación (Plancarte et al. 2014). La longitud de onda de excitación y de emisión fueron 280 nm y 340 nm respectivamente. Se realizaron las medidas en 100 mM KH₂PO₄ pH 6.5, 100 mM NaCl, y 3.1 μM EgGST2-3r a 25 °C en un espectrofluorímetro Varioskan Flash (Thermo scientific). La mayoría de los ligandos fueron disueltos en DMSO, en un rango de concentración entre 0-1 mM, dependiendo del ligando. La concentración final de DMSO en la mezcla de reacción fue constante menor al 10 %. Se graficó según la Ecuación 2:

$$1 - F/F_0 \text{ vs } [\text{ligando}] \text{ Ecuación 2}$$

Donde F es la intensidad de fluorescencia luego del agregado de cada ligando, mientras que F₀ es la fluorescencia intrínseca de la proteína. La constante de disociación (K_D) fue calculada ajustando los datos obtenidos a la Ecuación 3:

$$1 - \left(\frac{F}{F_0}\right) = \left(\frac{a}{2E_t}\right) [(E_t + x + K_D) - \sqrt{(E_t + x + K_D)^2 - 4xE_t}] \text{ Ecuación 3}$$

Donde x es la concentración total del ligando en la reacción y E_t representa la concentración de los sitios de unión; a (el valor asintótico al que la ordenada tiende a mayores valores de x). Los datos fueron procesados con el programa empleando el programa GraphPad Prism v6.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

2.3.10 Análisis de la secuencia aminoacídica de EgGST2 y EgGST3

Se realizó la alineación de distintas secuencias de GSTs mediante PSI-BLAST, utilizando el algoritmo BLOSUM62 (Bawono & Heringa 2014). Se analizó la presencia de los residuos conservados tanto de clase Omega como de clase Sigma (Hervé et al. 2003; Brock et al. 2013).

2.4 Expresión y purificación de los homodímeros recombinantes en modelo eucariota.

2.4.1 Transformación de levaduras

Un cultivo nocturno de células de *Saccharomyces cerevisiae* se diluyó hasta obtener una DO < 0.1 en medio YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa), y se incubó a 30 °C 220 rpm hasta obtener una DO = 0.4. Se centrifugó por 3 minutos a 1500 g. El precipitado celular se resuspendió en 500 μL de LiTE (0.1 M acetato de litio, 10 mM Tris HCl pH 7.6, 1 mM EDTA) y se centrifugó por 2 minutos a 800 g. El precipitado se volvió a resuspender en 270 μL de LiTE y se alicuotó de a 90 μL. A la suspensión de células se le agregaron 10 μL de ADN de

esperma de salmón (Invitrogen), el cual fue previamente hervido por 5 minutos. A la mezcla se le agrego el ADN plasmídico (pYES2) junto con 750 μ L de PEGLiTE (LiTE, 40 % PEG). Se mezcló por inversión y se incubo por 30 minutos a 30 °C. Se agregó 100 μ L de DMSO y se calentó por 10 minutos a 42 °C. Se centrifugó 2 minutos a 800 g y se resuspendio en 1 mL de YPD para luego volver a centrifugar por 2 minutos a 800 g. El precipitado se resuspendio en 300 μ L de YPD y se incubo por 1h a temperatura ambiente. Por último se plaqueo en medio selectivo SC-U (medio selectivo sin uracilo), y se incubo por 48 h a 30 °C (Kawai et al. 2010).

2.4.2 Inducción de homodímeros recombinantes en levaduras

Un cultivo nocturno de células transformadas en SC-U (conteniendo 2% glucosa), se centrifugó por 5 minutos a 1500 g a 4 °C. El precipitado celular se resuspendio en 400 mL de SC-U (0.1 % glucosa). El cultivo se incubó a 30 °C, a 220 rpm hasta llegar a una DO = 0.4-0.6. El cultivo se centrifugó por 5 minutos a 1500 g a 4 °C y el precipitado se resuspendio en 400 mL de medio de inducción SC-U (conteniendo 2% galactosa). El cultivo se incubó a 30 °C, a 220 rpm por 6 horas. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado durante 5 minutos a 3000 g a 4 °C, y el precipitado celular fue resuspendido en un volumen apropiado de reactivo de lisis Y-PER (Yeast Potein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific), dependiendo de la masa. La mezcla se agito a temperatura ambiente por 20 minutos y se centrifugó 10 minutos a 14000 g y se continuó trabajando con la fracción soluble.

2.4.3 Purificación de los homodímero recombinante

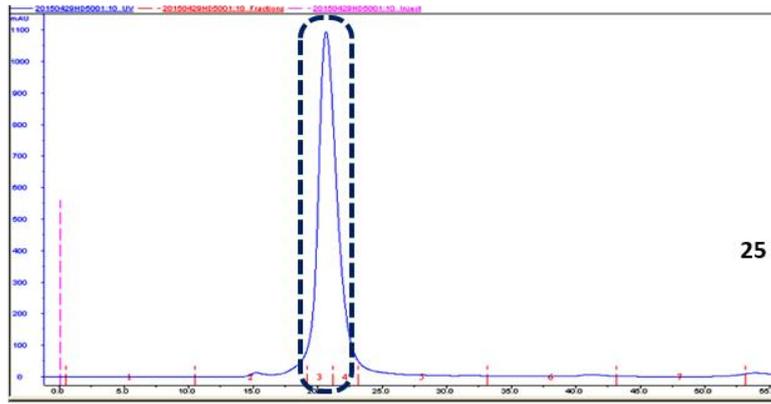
La purificación se realizó por afinidad de una cola de histidinas (incorporada a cada proteína) a una resina de Ni-agarosa (Invitrogen). Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Primero se equilibró la resina con buffer nativo (50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 0.5 M NaCl), luego se pasó la fracción soluble obtenida en la sección anterior. Luego de lavar la columna con buffer de lavado (50 mM NaH₂PO₄ pH 8, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol), las proteínas retenidas se eluyeron con imidazol 250 mM en el mismo buffer. Se cuantificó la concentración proteica por el método de Bradford (Bradford 1976), se juntaron los tubos positivos. La muestra se concentró hasta obtenerla a 1 mg/mL y se midió la actividad canónica.

3 RESULTADOS

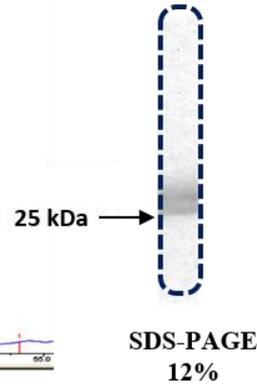
3.1 Identificación del heterodímero recombinante

La expresión del heterodímero se realizó según lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (La-Rocca 2014). La estrategia de purificación del heterodímero mediante cromatografía de afinidad Ni-agarosa utilizando la cola de histidina de la subunidad EgGST2, implica que solo la subunidad EgGST2 será retenida por la columna. Este hecho facilita la purificación, ya que de existir el homodímero EgGST3r, este no quedaría retenido en la columna. Luego, con el objetivo de verificar la presencia del heterodímero en el eluído de la columna, el pico principal en la purificación fue identificado por Western blot, gel de poliacrilamida y espectrometría de masas (Maldi/TOF/TOF) (Figuras 12-13). Se realizó una electroforesis de poliacrilamida donde se visualizan dos bandas por arriba de 25 kDa, aproximadamente correspondientes a las masas teóricas de cada subunidad (25.7 kDa y 26.5 kDa para EgGST3 y para EgGST2 respectivamente) (Figura 12B). Para analizar la equimolaridad de cada subunidad en la producción se realizaron diluciones seriadas y se visualizaron mediante un gel de poliacrilamida (Figura 12C). Ambas bandas desaparecen a la misma dilución, sugiriendo que ambas subunidades se encuentran en partes iguales. A su vez ambas bandas presentaron reactividad con los antisueros de conejo específicos para cada subunidad (Iriarte et al. 2012), lo que confirma que ambas proteínas están presentes en el eluído por Western blot (Figura 12D). Finalmente, se confirmó por espectrometría de masas (Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo) que la banda superior coincide con la secuencia de EgGST2 y la inferior corresponde a EgGST3 (Figura 13). De esta forma se demuestra que tanto la subunidad 2 como la 3 se encuentran presentes.

A) Superdex 75



B)



C) rEgGST-3 (ug) 20 2 0.2 0.02 0.002 0.002 0.0002 0



D) Western-blot

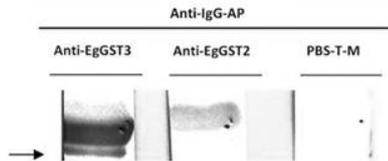


Figura 12. Purificación de EgGST2-3r. La proteína eluida por columna de Ni-agarosa fue separada por gel filtración en una columna Superdex 75 (A). El pico fue analizado en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (B), gel de poliacrilamida en diluciones seriadas (20 µg a 0.0002 µg) (C) Western blot (D) según Iriarte et al. (2012).

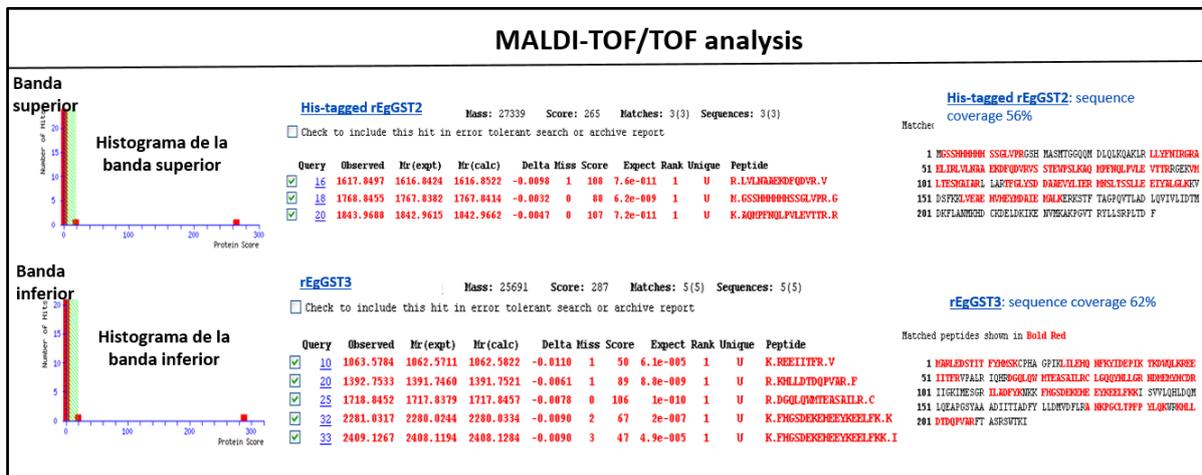


Figura 13. Identificación por espectrometría de masas de EgGST2-3r. La secuencia de cada banda fue identificada por espectrometría de masas Maldi/TOF/TOF en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo.

3.2 Expresión y estabilidad de EgGST2-3r

Se modificó la técnica empleada anteriormente por nuestro grupo de trabajo (La-Rocca 2014), para aumentar la eficiencia y la pureza de la enzima recombinante. Se sumó un paso de purificación por gel filtración en Superdex-75 (GE-Healthcare) equilibrado con 20 mM Tris-HCl pH 8, conteniendo 50 mM NaCl. Luego, con el fin de mejorar la estabilidad se evaluaron distintas condiciones, adaptando la técnica descrita por Wang et al. (2014) usando 10 % PEG-6000. El rendimiento global aumentó un 65 % (33 mg/L de cultivo) gracias a los cambios en el buffer y en las etapas de extracción. La integridad de la proteína purificada luego de cada producción se evaluó midiendo la actividad canónica frente al sustrato universal CDNB. El valor obtenido de la misma fue del orden de 3.0-3.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para todos los casos. De esta forma se aseguró la reproducibilidad del proceso. Tomando en cuenta los resultados de estos ensayos, EgGST2-3r se mantuvo almacenada en 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl (1 mg/mL) a -20 °C hasta su uso.

3.3 Caracterización básica clásica

Como fue planteado en la introducción, las GSTs citosólicas de mamíferos clásicamente fueron agrupadas en diferentes clases. Basándose principalmente en la capacidad de llevar a cabo la catálisis de un panel de sustratos y del perfil de inhibición. Por ejemplo, la clase Alfa se caracteriza por presentar alta actividad frente al hidroperóxido de cumeno, y ser inhibida por Cibacron Blue y BSP. La clase Mu presenta alta actividad frente al BSP y al DCNB; y es inhibida por hematina, Cibacron Blue y TPT. La clase Pi presenta alta actividad frente al ácido etacrínico y es inhibida por hematina (Danielson & Mannervik 1985; Harispe et al. 2010). Posteriormente debido al amplio panel de sustratos y frente al hecho de que la caracterización de las GSTs de distintos organismos no se ajustaba al canon establecido por las de mamíferos, se adicionó a la clasificación el criterio filogenético, siendo éste hoy en día el principal criterio.

Por otro lado, del estudio de las secuencias y la estructura genética de EgGST2-3 se desprende que ambas subunidades son filogenéticamente distantes. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que la subunidad 2 presenta una alta homología con la clase Sigma. Por otro lado la subunidad 3 presenta homología a la clase Sigma en su región C-terminal, mientras que la región N-terminal presenta homología a la clase Omega (Iriarte et al. 2012). Por esto nos

planteamos que la enzima heterodimérica podría presentar además de las actividades clásicas de cada subunidad, nuevas actividades adquiridas como consecuencia de la asociación de ambas clases. Para testear esta hipótesis empleamos un amplio panel de sustratos e inhibidores con el fin de caracterizar todas las posibles actividades que ésta presenta.

3.3.1 Especificidad de sustratos

En primer lugar, se analizó la actividad glutatión transferasa de EgGST2-3r frente a algunos de los sustratos considerados modelo. Además, se estudió la actividad frente a dos compuestos que podrían generarse como productos secundarios de la peroxidación lipídica (*trans*-2-nonenal y *trans,trans*-2,4-decadienal), los cuales son marcadores de estrés oxidativo (Salvatore et al. 1995; Torres-Rivera & Landa 2008; Plancarte et al. 2014). El heterodímero presentó actividad frente al sustrato universal, CDNB, al igual que otras GST de clase Sigma, incluso mostrando valores mayores de actividad específica, con respecto a los presentados por otra GST del mismo parásito pero de distinta clase (EgGST1r) (Tabla 3). A su vez, a diferencia de la EgGST1r, para el resto de los sustratos modelos, solo presentó actividad frente al DCNB, siendo este un sustrato característico de la clase Mu. Además, EgGST2-3r presentó actividad frente al *trans,trans*-2,4-decadienal. Si bien esta es menor a la que muestra EgGST1r, la capacidad de conjugar GSH a estos compuestos se ha relacionado con la protección del parásito frente a la exposición a especies oxidantes producidas por la respuesta inmune del hospedero (Torres-Rivera & Landa 2008).

Tabla 3. Especificidad de sustrato de EgGST2-3r. Comparación de la actividad específica de EgGST2-3r frente a diferentes sustratos, con EgGST1-1r (clase Mu), FhGST-S1 (clase Sigma) y CsGSTo (clase Omega). En la tabla se indica para cada sustrato a que clase representa.

	Marcador de GST de mamífero	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			
		EgGST2-3r	EgGST1r ^a	FhGST-S1 ^b	CsGSTo ^c
CDNB	Todas	3.3	2.5	4.7	0.10-0.13
DCNB	Mu	0.31	ND	ND	ND
BSP	Mu	ND*	0.015	-	-
Ác. Etacrínico	Pi, Alfa	ND	0.87	0.90	ND
trans-2-nonenal	Estrés	ND*	0.15	0.33	-
trans,trans-2,4-decadienal	Estrés	0.086	0.16	0.051	-

ND indica que no se detectó actividad en las condiciones ensayadas.

a(Harisper et al. 2010), b(LaCourse et al. 2012), c(Kim et al. 2016), *datos hallados anteriormente por nuestro grupo pero todavía no publicados.

Previamente en nuestro grupo de trabajo se obtuvieron los parámetros cinéticos aparentes $V_{max\ app}$ y $K_M\ app$, para el CDNB y el GSH. Para el CDNB los valores fueron de $0.10\ \text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ y $3.72\ \text{mM}$, respectivamente; mientras que para el GSH de $0.03\ \text{mM}\cdot\text{min}^{-1}$ y $0.39\ \text{mM}$, respectivamente (datos en manuscrito en preparación). La $V_{max\ app}$ estimada por esta metodología es dependiente de la concentración de CDNB, ya que el mismo no se logró saturar, es por esto que la V_{max} no presenta un valor igual para ambos sustratos. Para completar este estudio, como parte de la presente Tesis de Maestría se halló la $k_{cat\ app}$, evaluando las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de enzima. Este resultado mostró un valor de $k_{cat\ app}$ de $1.73\ \text{s}^{-1}$.

3.3.2 Perfil de Inhibidores

Se analizó la actividad canónica frente a la exposición de la enzima con diferentes inhibidores, y por otro lado con varias drogas antihelmínticas. Se calcularon los valores de IC_{50} (concentración del inhibidor necesaria para llegar al 50 % de actividad enzimática) para cada inhibidor y droga antihelmíntica (Tabla 4). Para esto se determinó el porcentaje de actividad remanente de la enzima con el sustrato universal CDNB luego de ser incubada por 5 minutos

con cada inhibidor o droga. Se graficaron los valores de actividad remanente en función del log de la concentración de cada inhibidor o droga (Figura 14).

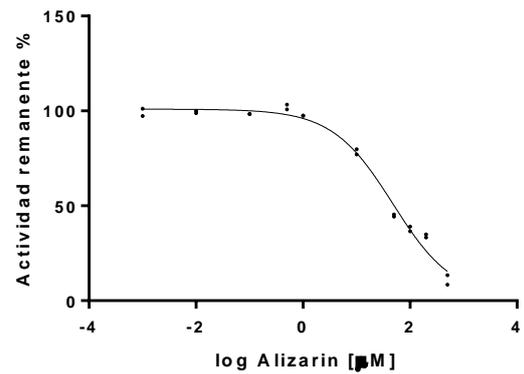
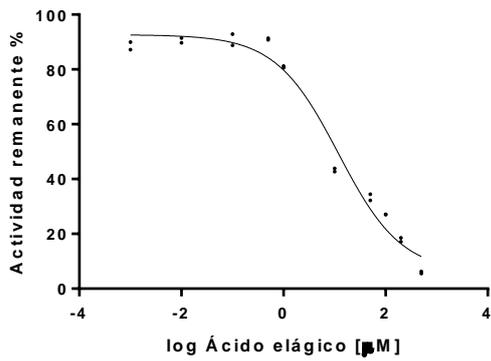
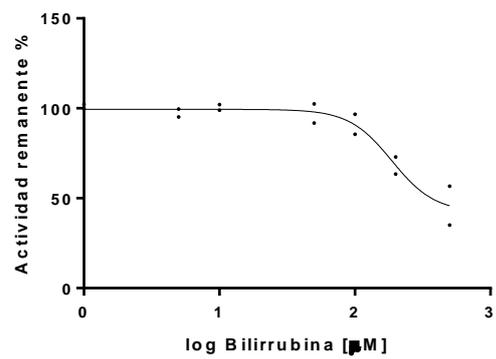
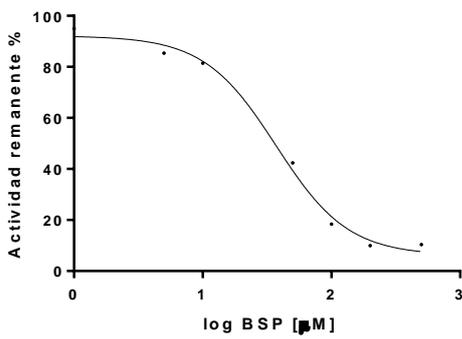
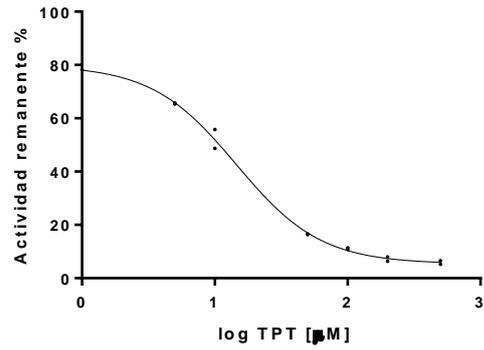
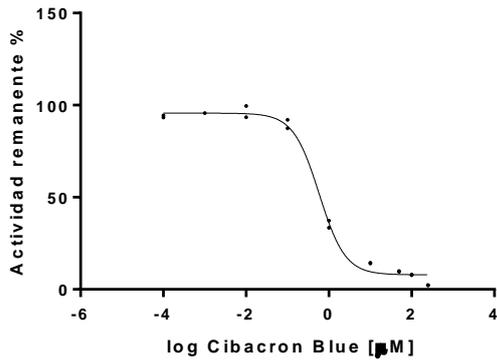
Los mayores niveles de inhibición se obtuvieron con los inhibidores convencionales, siendo el Cibacron Blue el inhibidor que presentó la mayor inhibición. A pesar de que el heterodímero presenta un panel de inhibición muy similar a la EgGST1r, las mayores diferencias se observan para el BSP, Nitripiridin-N-oxido, ácido quenodesoxicólico y la bilirrubina. Mientras que la IC₅₀ para el BSP y la bilirrubina presentan un orden menor para EgGST2-3r con respecto a EgGST1r, ni el Nitripiridin-N-oxido ni el ácido quenodesoxicólico son capaces de inhibir a la EgGST1r en las condiciones de estudio.

Tabla 4. Valores de IC₅₀ para los distintos inhibidores. Se compara el valor de las IC₅₀ entre las dos GSTs pertenecientes a *E. granulosus* caracterizadas hasta el momento (EgGST2-3r y EgGST1r).

Inhibidores	IC ₅₀ (μM)	
	EgGST2-3r	EgGST1r ^a
TPT	10	2.3
BSP	24	188
Cibacron Blue	0.61	0.12
Otros inhibidores		
Ác. Elágico	12	7.3
Alizarin	45	65
Nitripiridin-N-óxido	201	NI
<i>trans,trans</i> -2,4-decadienal	93	-
Ác. Quenodesoxicólico	50	NI
Bilirrubina	45	165

a(Harispe et al. 2010)

NI indica que no presento actividad en las condiciones ensayadas.



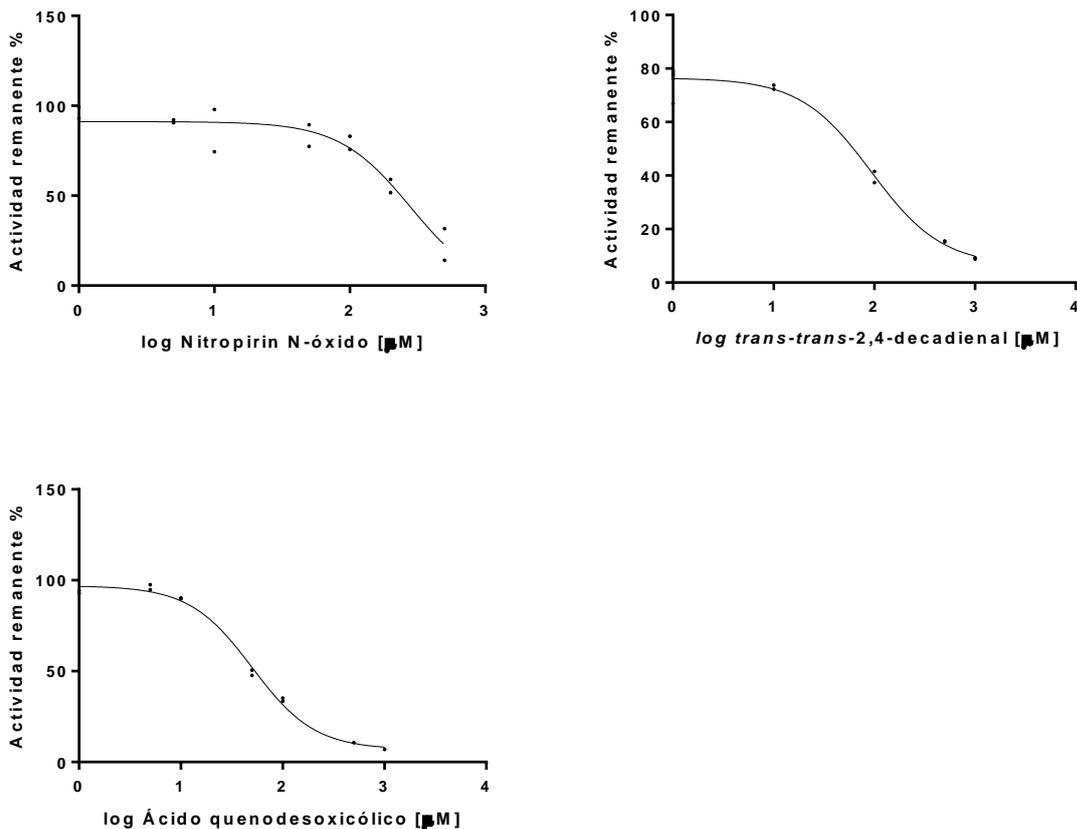


Figura 14. Patrón de inhibición con panel de inhibidores clásicos de GSTs. Se estudió la inhibición de la reacción de conjugación de GSH y CDNB mediada por inhibidores convencionales y otros inhibidores. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes. Los valores de IC_{50} para cada ajuste están presentados en la Tabla 5.

En el caso de las drogas antihelmínticas, los fenoles halogenados (Bitionol, Closantel y Hexaclorofeno) fueron los que presentaron mayores valores de inhibición (Tabla 5). Estas drogas son utilizadas principalmente para combatir al trematodo *F. hepatica*, mientras que el grupo de los benzimidazoles son las drogas utilizadas para combatir la parasitosis causada por *E. granulosus* (Fairweather & Boray 1999; Brunetti et al. 2016). A modo de ejemplo se muestran las gráficas de las IC_{50} para para los fenoles halogenados (Figura 15).

Tabla 5. Valores de IC₅₀ para las distintas drogas antihelmínticas. Se compara el valor de las IC₅₀ entre las dos GSTs pertenecientes a *E. granulosus* caracterizadas hasta el momento (EgGST2-3r y EgGST1r).

Drogas antihelmínticas	IC ₅₀ (μM)	
	EgGST2-3r	EgGST1r ^a
Praziquantel	NI	-
Benzimidazoles:		
Albendazol	256	160
Fenbendazol	61.4	>50
Mebendazol	>200	>50
Fenoles halogenados:		
Rafoxanida	226	39
Closantel	32	>50
Hexaclorofeno	12	4.07
Bitionol	4.5	126

a(Harispe et al. 2010)

NI indica que no presento inhibición en las condiciones ensayadas.

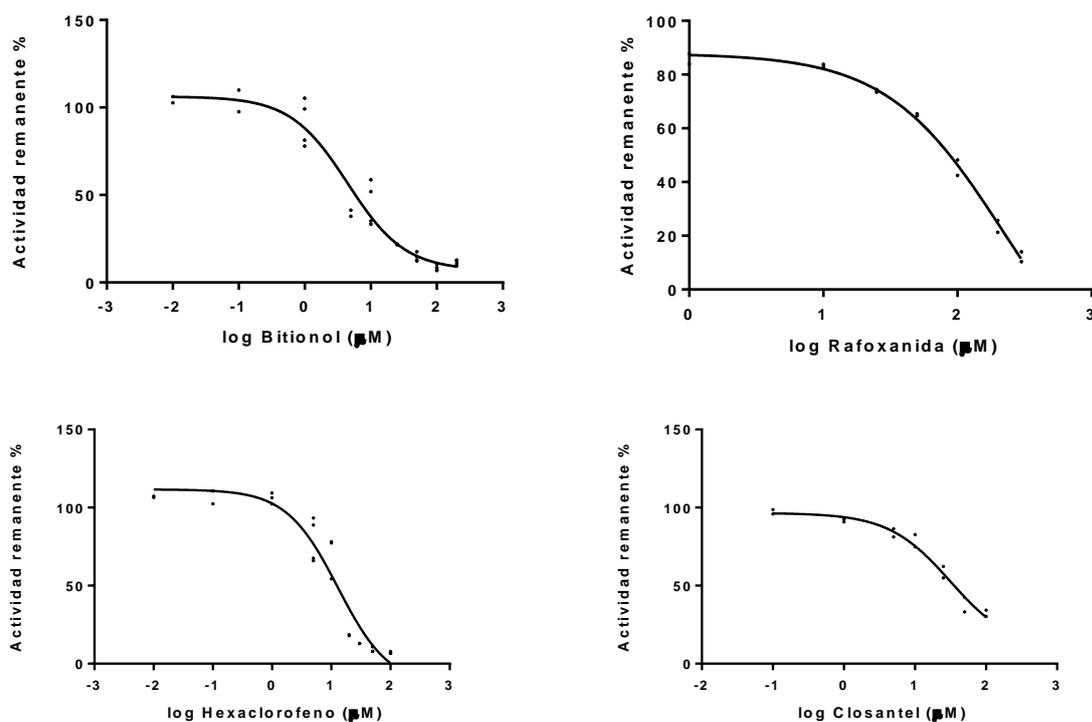


Figura 15. Patrón de inhibición con panel de drogas antihelmínticas. Se estudió la inhibición de la reacción de conjugación de GSH y CDNB mediada por drogas antihelmínticas. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes para el grupo de los fenoles halogenados.

3.4 Otras actividades catalíticas

3.4.1 Actividades específicas de clase Omega: Dehidroascorbato reductasa y tiorredoxina transferasa

Se alinearon las secuencias de distintas GSTs de clase Omega (*Clonorchis sinensis* omega GST1 y GST2; *S. mansoni* omega GST y *F. hepatica* omega GST) con respecto a la secuencia de EgGST3, mediante PSI-BLAST, utilizando el algoritmo BLOSUM62 (Bawono & Heringa 2014). Los residuos conservados de las GSTs de clase Omega: Cys (n), Lys (n + 27), Val (n + 40), Glu (n + 53) y Ser (n + 54) (Brock et al. 2013), se resaltan en la Figura 16. De los cinco aminoácidos conservados entre GSTs de clase Omega, dos se encuentran presentes en la secuencia de EgGST3. Siguiendo el alineamiento obtenido el residuo conservado de Lys (n + 27) y el de Val (n + 40) se encuentran desfasado en la secuencia de EgGST3, mientras que el residuo conservado de Ser (n +54) se encuentra sustituido por Ala.

Las enzimas con actividad dehidroascorbato reductasa catalizan la reducción del dehidroascorbato a ascorbato acoplada a la oxidación del glutatión. Mientras que la actividad tioltransferasa estaría involucrada en reacciones de glutationilación y deglutationilación de proteínas. Estas reacciones son importantes para la protección de las proteínas en condiciones de estrés oxidativo, así como para la regulación de su función (Townsend D. M., 2007). Ambas actividades son características de las GSTs de clase Omega, y teniendo en cuenta la presencia de los residuos claves para la catálisis en la secuencia de EgGST3, sería importante realizar ambos ensayos en el heterodímero.

En las condiciones ensayadas, el heterodímero no presentó actividad dehidroascorbato reductasa ni actividad tiol transferasa. Ambos resultados son coherentes entre sí, ya que el mismo residuo está involucrado en ambas actividades (Cys) (Kim et al. 2016; Schmuck et al. 2005).

3.4.2 Actividad específica de clase Sigma: Prostaglandina sintasa

Se alinearon las secuencias de distintas GSTs de clase Sigma (*Homo sapiens* PGDS y *S. mansoni* sigma GST), con respecto a la secuencia de EgGST2, mediante PSI-BLAST, utilizando el algoritmo BLOSUM62 (Bawono & Heringa 2014). Los residuos involucrados en la unión al GSH (Tyr, Trp, Lys, Ser, Asp) y a la PGH2 (Arg, Gly, Glu) de las enzimas de clase Sigma (Angelucci et al. 2005) se resaltan en la Figura 17.

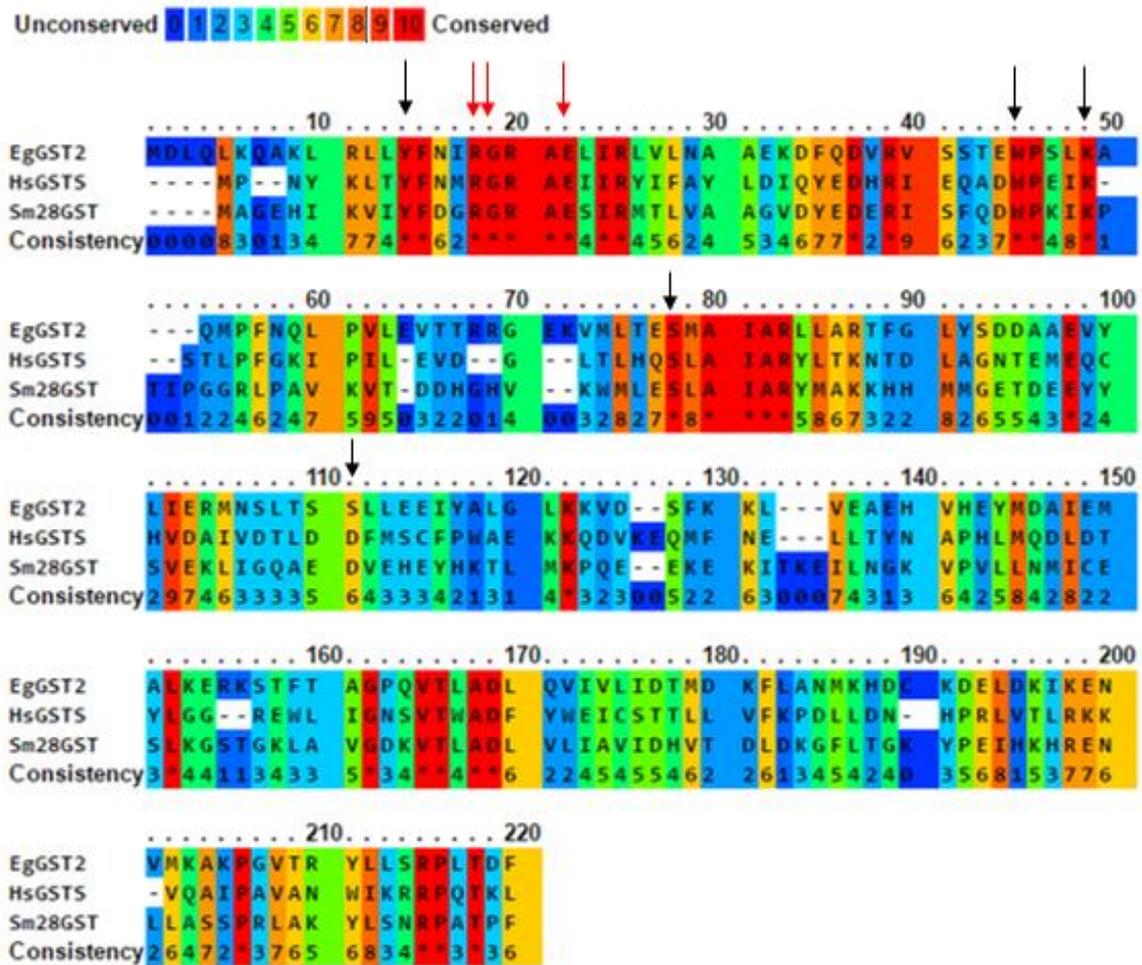


Figura 17. Análisis de secuencia de GSTs de clase Sigma. Comparación de la estructura primaria de EgGST2 con otras GSTs de clase Sigma. Los residuos involucrados en la unión a GSH y a PGH2 se indican con una flecha de color negro y rojo, respectivamente. HsGST5, *Homo sapiens* PGDS (AAH20734); Sm28GST, *S. mansoni* sigma GST (P09792). Las secuencias fueron extraídas de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Teniendo en cuenta la presencia de los residuos claves para la actividad prostaglandina sintasa en la secuencia de EgGST2, sería importante realizar este ensayo en el heterodímero. La detección de la actividad prostaglandina sintasa se realizó mediante espectrometría de masas, identificando los picos correspondientes a las prostaglandinas (Figura 18). Se observó que en las condiciones del ensayo no se detectó la formación de prostaglandinas. Las transiciones que se observan aparecen de igual medida en los controles negativos sin heterodímero y sin COX-2. Debido a que en los controles negativos aparecen las señales al tiempo en que las prostaglandinas deberían salir, esto podría ser un subproducto no enzimático o algún contaminante en el material de vidrio, impidiéndonos obtener

conclusiones confiables. Incluso más, la falta de un control positivo en este ensayo, dificulta la extracción de conclusiones. Dicho control serviría para asegurarnos que la reacción y la etapa de extracción ocurran de forma correcta. Además, otra limitante del ensayo fue la poca disponibilidad de la enzima COX-2. Es de suma importancia repetir este experimento en condiciones correctas, con los controles pertinentes, dado que las enzimas de clase Sigma de otros parásitos han mostrado esta actividad (LaCourse et al. 2012). Pero debido a la falta de reactivos y tiempo, no formará parte de este trabajo.

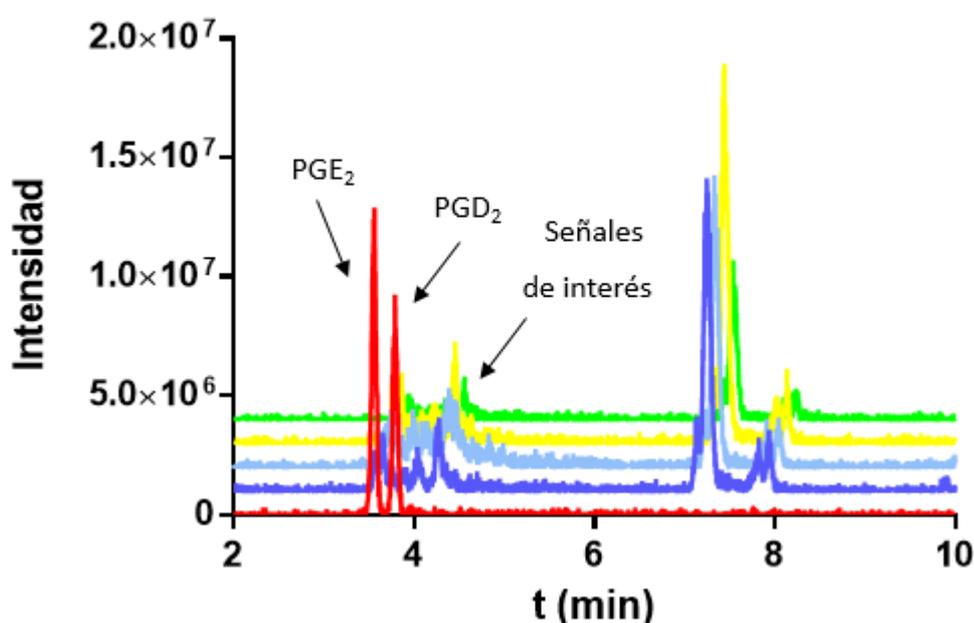


Figura 18. Actividad prostaglandina sintasa de EgGST2-3r. Las diferentes corridas se muestran en colores. Rojo: estándar interno. Azul: [EgGST2-3r]= 100 µg. Celeste: [EgGST2-3r]= 10 µg. Amarillo control negativo sin EgGST2-3r. Verde: control negativo sin COX-2. Los picos señalados corresponden a las transiciones del estándar interno de PGE₂ y PGD₂, respectivamente.

3.4.3 Actividad Glutatión peroxidasa

Por otro lado se evaluó la actividad peroxidasa dependiente de glutatión. Esta actividad es fisiológicamente relevante al inactivar radicales libres derivados del oxígeno. Está reportado que *E. granulosus* posee escasos sistemas de detoxificación frente a las especies reactivas del oxígeno, por lo que contar con un set de enzimas capaces de neutralizar las mismas supondría una ventaja frente a la supervivencia en el ambiente hostil del hospedero (Salinas 2013; Matoušková et al. 2016).

En primera instancia se evaluó esta actividad en las condiciones reportadas anteriormente (Harispe et al. 2010). Sin embargo, no detectando esta actividad para EgGST2-3r. Se repitió el ensayo, aumentando la concentración de la proteína, se observó que la enzima presenta baja actividad peroxidasa ($0.072 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), pero la misma aumenta de forma directamente proporcional con la concentración de proteína (Figura 19).

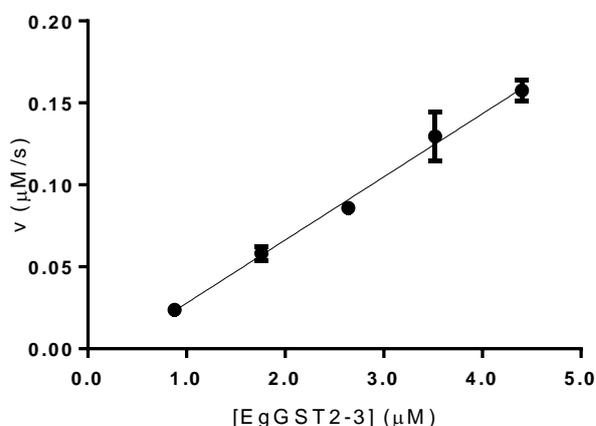


Figura 19. Velocidad en función de la concentración de EgGST2-3r. Se determinó la velocidad a distintas concentraciones de EgGST2-3r.

Continuando con el estudio cinético, como el heterodímero es una enzima bisustrática si trabajamos con uno de los sustratos saturado y variamos la concentración del otro, obtenemos cinéticas michaelianas típicas (Figura 20) (Marangoni 2003). Para el caso del GSH se utilizó un rango de 0 a 5 mM, donde ensayaron tres concentraciones distintas de hidropéroxido de cumeno (0.5, 1.2, 3 mM). Mientras que para el hidropéroxido de cumeno se utilizó un rango de 0 a 3 mM, se probaron 4 concentraciones distintas de GSH (0.5, 1, 3, 5 mM). Para todos los ensayos se utilizó una concentración fija de proteína de $3.0 \mu\text{M}$.

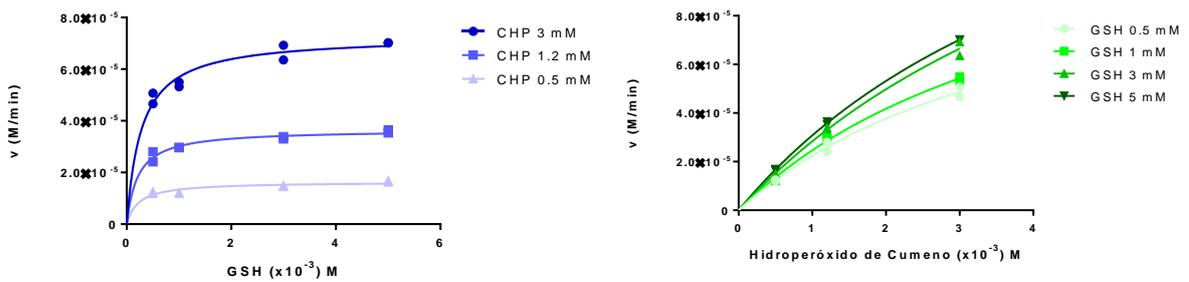


Figura 20. Ajuste de la velocidad en función de la concentración de sustrato. Se muestra la dependencia con la concentración de GSH e hidroperóxido de cumeno. Se determinaron las velocidades iniciales para cada par de concentraciones de GSH e hidroperóxido de cumeno. Se muestran los gráficos de los ajustes de los datos a la ecuación clásica de Michaelis Menten.

En las condiciones de ensayo solo se logró la saturación con GSH, por lo que los valores de los parámetros cinéticos que se desprenden de los gráficos dependen de la concentración del hidroperóxido de cumeno. Teniendo en cuenta estos resultado, se decidió utilizar una aproximación en la cual se satura uno de los sustratos mientras que el otro se mantiene en concentraciones pequeñas para hallar la relación de los parámetros cinéticos: k_{cat}/K_M (Danielson & Mannervik 1985). De esta forma al variar las concentraciones de hidroperóxido de cumeno manteniendo al GSH en una concentración de 3.0 mM (saturado), de la pendiente de la gráfica, se obtiene la relación $k_{cat}/K_M = 0.39 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (Figura 21), la cual se relaciona con la especificidad de la enzima por su sustrato.

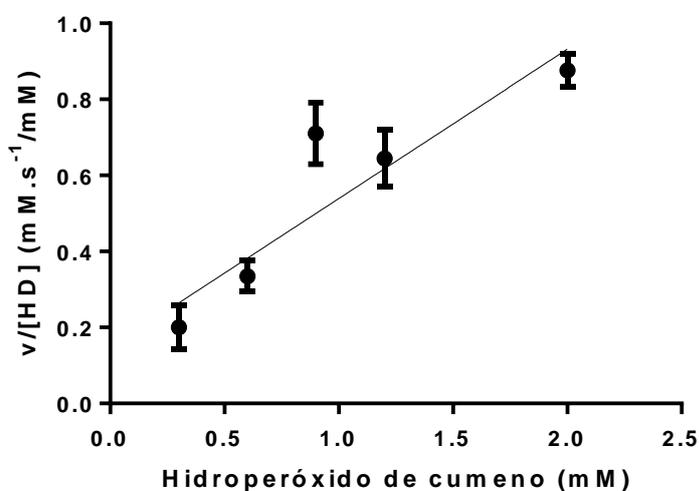


Figura 21. Determinación de los parámetros cinéticos. Se graficó la velocidad enzimática sobre la concentración de enzima, en función de la concentración de hidroperóxido de cumeno a una concentración fija de GSH (3.0 mM).

3.5 Actividades no catalíticas: Ligandina

Las GSTs están involucradas en el transporte de una gran variedad de compuestos exógenos y endógenos, con diversas afinidades (Plancarte et al. 2014). Esta actividad denominada actividad ligandina puede secuestrar sustancias tóxicas, reduciendo efectivamente su concentración en la célula o transportar sustancias requeridas fisiológicamente.

La actividad ligandina se detecta gracias a que la enzima posee residuos aromáticos que fluorescen al ser excitados a 280 nm, y estos pueden ser *quencheados* por distintos compuestos. Se siguieron los cambios en la intensidad de fluorescencia de la enzima durante el agregado de estos compuestos para determinar la actividad ligandina de los mismos (Plancarte et al. 2014). Se midió la actividad ligandina frente a distintos sustratos (bilirrubina, ácido quenodesoxicólico, *trans,trans*-2,4-decadienal) y drogas antihelmínticas (benzimidazoles y fenoles halogenados). Se graficó $1 - \left(\frac{F}{F_0}\right)$ vs [*ligando*] para diferentes ligandos (Figuras 22-23) y del ajuste de estos gráficos se hallaron las constantes de disociación para cada compuesto (Tabla 6).

Tabla 6. Constantes de unión en equilibrio de EgGST2-3r.

Ligando	K _D (μM)
Sustratos	
<i>trans,trans</i> -2,4-decadienal	95.4
Ác. Quenodesoxicólico	ND
Bilirrubina	41.7
Drogas antihelmínticas	
Benzimidazoles:	
Albendazol	ND
Fenbendazol	793
Mebendazol	124
Fenoles halogenados:	
Rafoxanida	5.56
Closantel	21.5
Hexaclorofeno	15.6
Bitionol	10.6

ND indica que no se detectó actividad en las condiciones ensayadas.

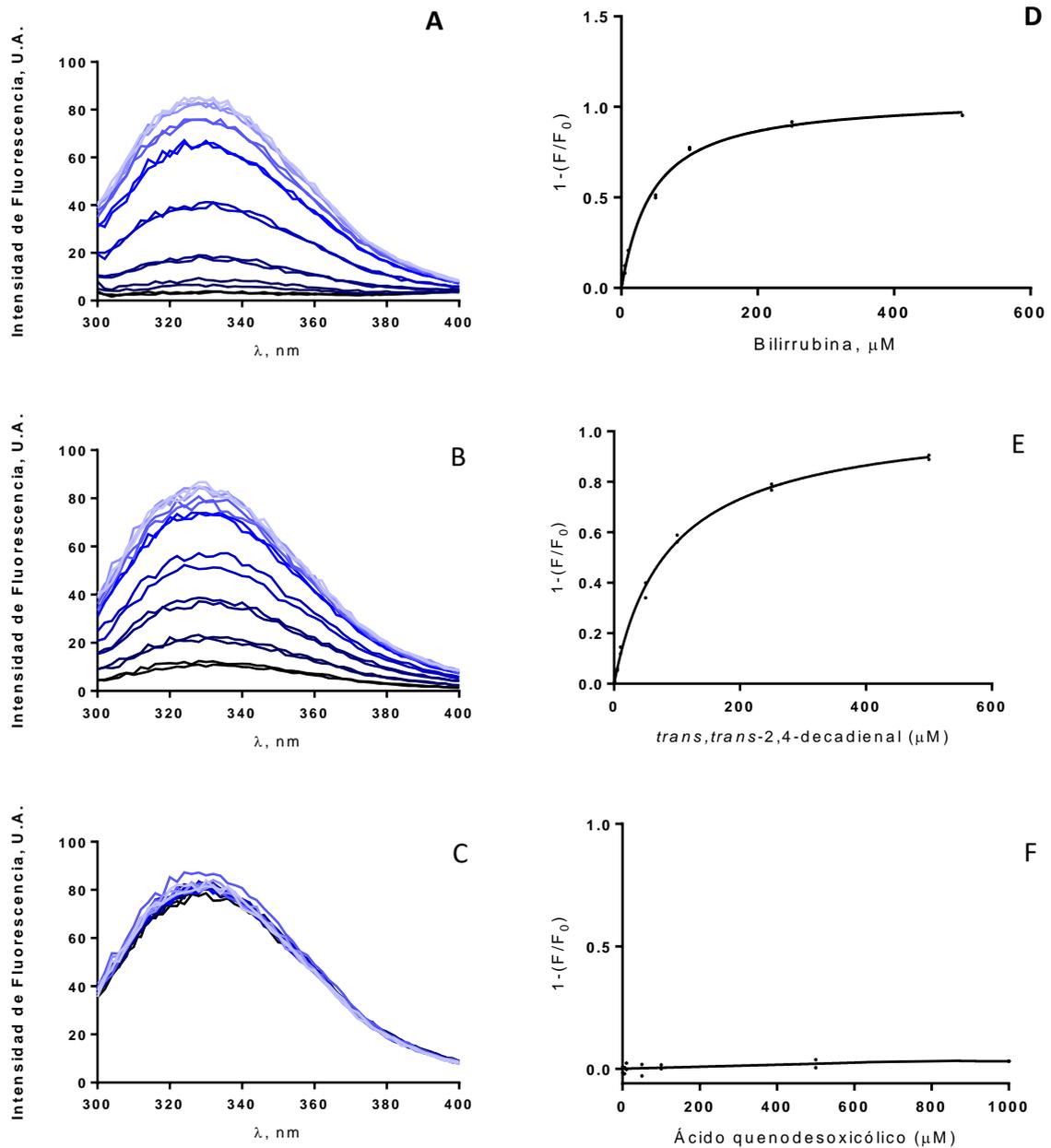


Figura 22. Determinación de la constante de unión en equilibrio de EgGST2-3r para inhibidores. Se siguió los cambios en al fluorescencia de los residuos aromáticos de la enzima. La longitud de onda de excitación fue 280 nm y de emisión 340 nm. En A-C se representan los espectros de fluorescencia y en D-F se representa el ajuste a la ecuación expresada en materiales y métodos.

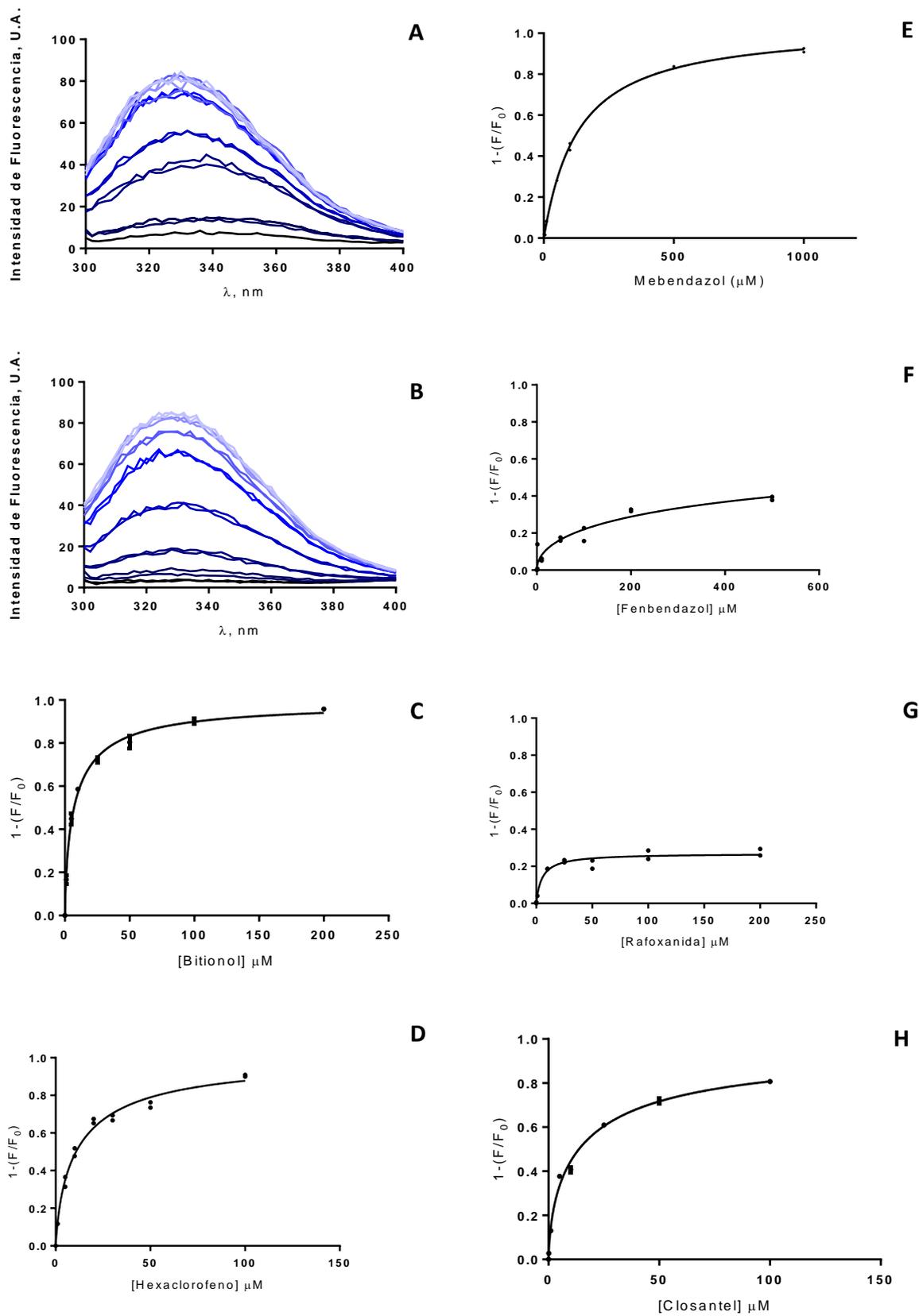


Figura 23. Determinación de la constante de unión en equilibrio de EgGST2-3r para drogas antihelmínticas. Se siguió los cambios en al fluorescencia de los residuos aromáticos de la enzima. La longitud de onda de excitación fue 280 nm y de emisión 340 nm. En A-B se representan los espectros de fluorescencia del MBZ y la Rafoxanida

respectivamente, a modo de ejemplo y en C-H se representa el ajuste a la ecuación expresada en materiales y métodos.

El panel de ligandos utilizados presenta la capacidad de ser tóxicos para el parásito dependiendo de su concentración y la mayoría de ellos parecen ser capaces de unirse a la enzima. Los fenoles halogenado fueron los ligandos con menor K_D . Siendo la Rafoxanida la que mostro el menor valor de K_D . Si bien este compuesto se une a la enzima, probablemente esta unión no ocurra en el sitio activo, ya que anteriormente hemos observado que no es eficiente en la inhibición de la actividad canónica de la EgGST2-3r. Estos dos resultados en su conjunto sugieren que el heterodímero posee actividad ligandina independiente de la actividad glutatión transferasa.

3.6 Expresión de EgGST homodiméricas recombinantes en levaduras

La expresión de los homodímeros recombinantes (EgGST1-1r, EgGST2-2r y EgGST3-3r) se realizó mediante la transformación de células de *S. cerevisiae* de la cepa w303 α (his 3, ura 3, trp 1, leu 2, ade 2) con las construcciones recombinantes fabricadas por Gen Scrip en pYES2.

3.6.1 Expresión y purificación de EgGST3-3r

Para la expresión de la proteína recombinante EgGST3-3, en primer lugar se realizó la inducción de la proteína con galactosa a distintos tiempos (0 a 24 hs) en un volumen de 50 mL de SC-U. Cada dos horas se extrajo una alícuota del cultivo y se analizó la expresión de la proteína en el precipitado celular en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE). La presencia de la proteína se verificó por Western blot empleando un suero policlonal específico para EgGST3 (Figura 24). Se observa una banda correspondiente al dímero de EgGST3 a las 8 hs y “overnight” (o/n).

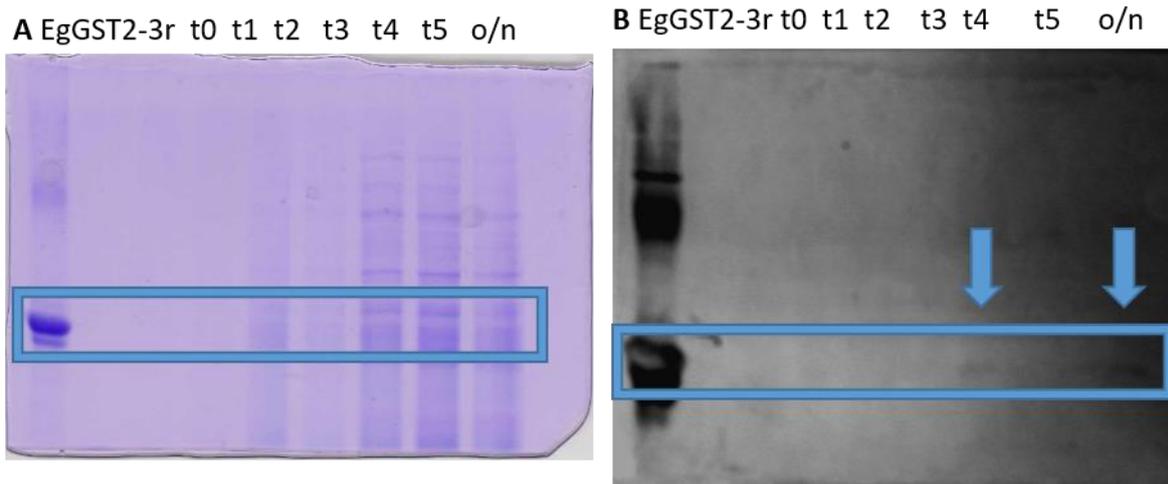


Figura 24. Expresión de EgGST3-3r. A-Electroforesis de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) de la inducción de la expresión de la proteína a distintos tiempos de incubación. B- La presencia de la proteína se verificó mediante Western blot con sueros específicos para la EgGST3-3. Se resaltan las bandas correspondientes a la proteína a t4=8 hs y al o/n.

A partir de estos resultados, se concluyó que la proteína se expresa en este modelo eucariota. Se procedió a analizar la fracción soluble y la insoluble. Para esto se realizó la extracción de las proteínas en Breaking buffer (buffer fosfato 0.5 M pH 7.4, PMSF 1 mM, glicerol 5 %, EDTA 1mM). Se consideró como 1 vol = masa del precipitado, y se agregaron 4 volúmenes de perlas de zirconia. Se agitó en vortex durante 60 segundos seguido por enfriamiento en hielo durante dos minutos. Esto se repitió cinco veces, luego se observaron las células al microscopio, donde se espera una completa disrupción de las mismas. A continuación se realizó un SDS-PAGE seguido por Western blot, donde se identificó la presencia de la proteína en ambas fracciones (Figura 25). Es lógico pensar que la presencia de esta proteína en la fracción insoluble se deba principalmente a problemas en la lisis celular, al no observarse una disrupción total de las células tras la ruptura mecánica con las perlas de zirconia. Sin embargo no se detectó la proteína en la fracción de elución tras una purificación por columna de Ni-Agarosa.

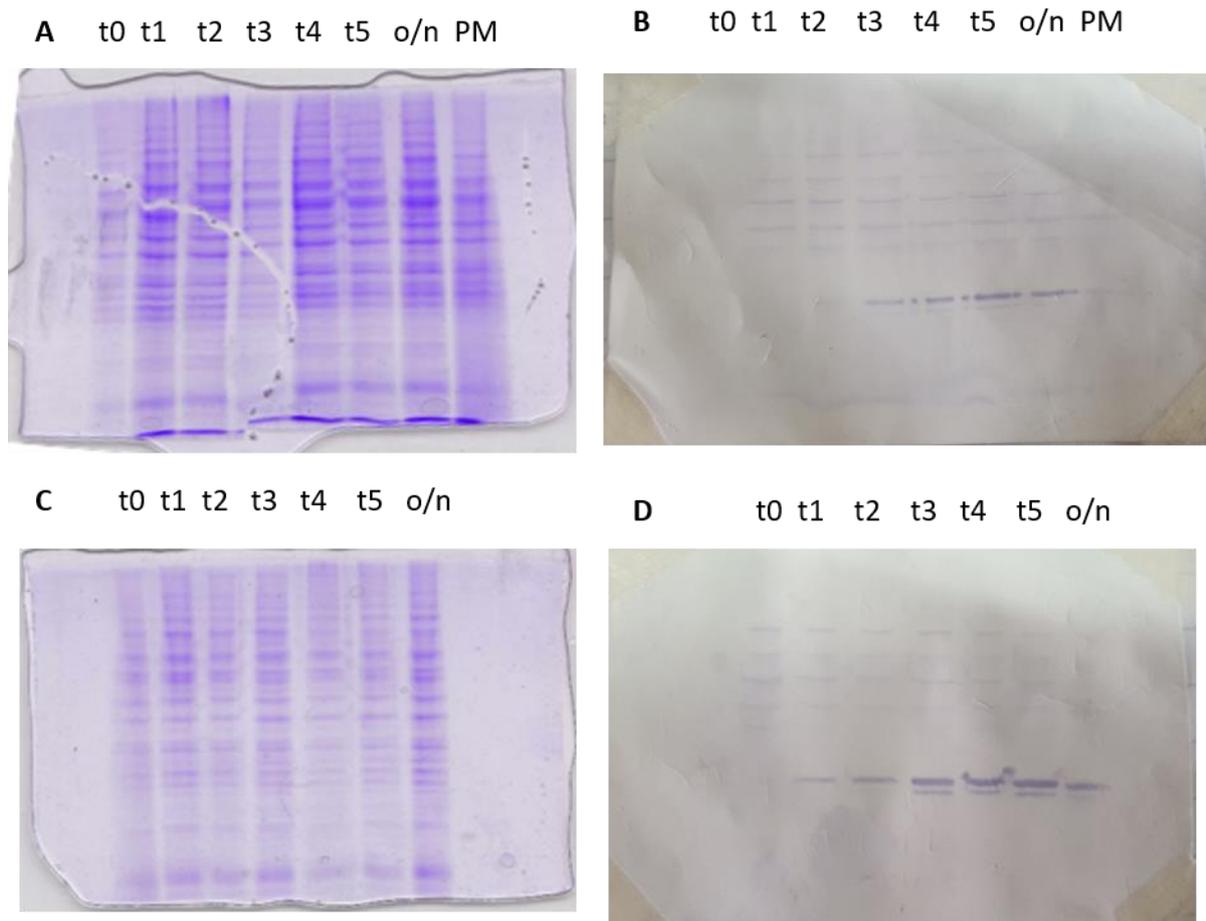


Figura 25. Expresión de EgGST3-3r. Electroforesis de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) de la inducción de la expresión de la proteína a distintos tiempos de incubación para la fracción soluble A y la fracción insoluble C. La presencia de la proteína se verificó mediante Western blot con sueros específicos para la EgGST3-3 en la fracción soluble B y la insoluble D.

A partir de estos resultados, se realizó una prueba de escalado (500 mL SC-U), eligiéndose el mejor tiempo de inducción ($t_4 = 8$ hs). Se utilizó el mismo procedimiento de extracción, con la excepción de que parte del precipitado resultante de la extracción primaria fue sonificado (power 40, timer 10, pulse 30 %) con el objetivo de obtener una ruptura completa de las células. Luego, se realizó una electroforesis SDS-PAGE seguido por su respectivo Western blot. En la Figura 26 se observa la banda correspondiente a la enzima tanto en la fracción sonicada como la no sonicada. Esto sugiere que la extracción primaria no es completamente efectiva.

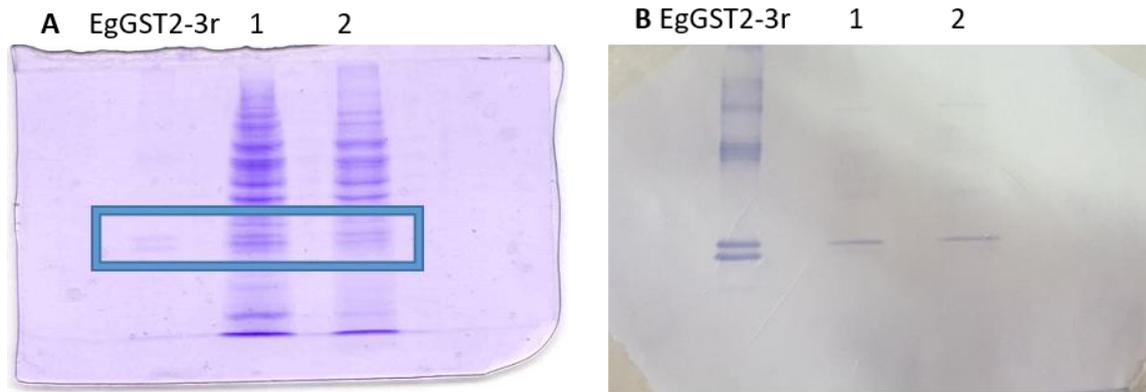


Figura 26. Expresión de EgGST3-3r utilizando diferentes condiciones de lisis. A-B Representa el SDS-PAGE y el correspondiente Western blot respectivamente. Carril 1: proteína de la fracción soluble sin sonicar, Carril 2: proteína de la fracción soluble después del sonicado del precipitado de la fracción primaria.

A continuación, se realizó una etapa de purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-Agarosa. La Figura 27A muestra un gel SDS-PAGE donde se observan las distintas fracciones obtenidas durante la purificación. Debido a que la proteína se hallaba poco representada en el total de la fracción no se observaron diferencias entre lo que se introdujo en la columna y el percolado. En el eluido fue identificada la proteína por Western blot (Figura 27B). De estos resultados también se concluye que la etapa de sonicado no es relevante desde un punto de producción, ya que en el eluido del sonicado (carril E') la intensidad de la banda observada es despreciable.

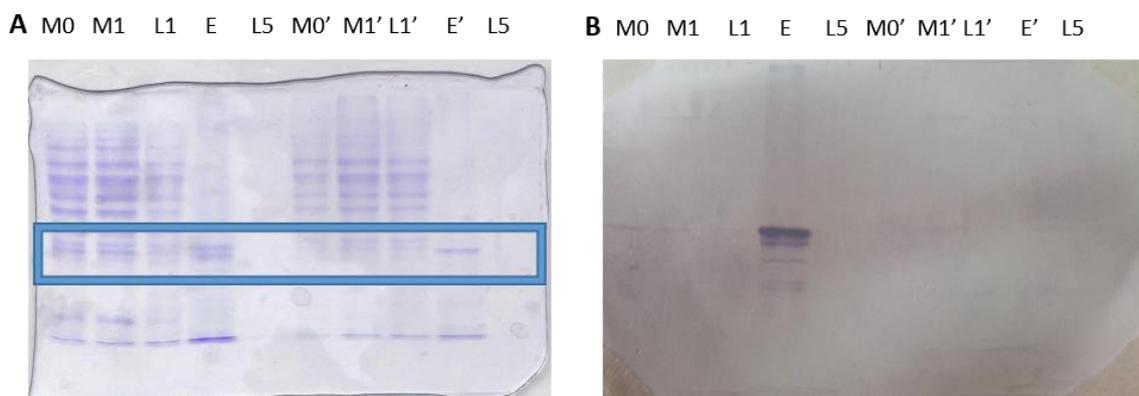


Figura 27. Purificación de EgGST3-3r. A-B Representa el SDS-PAGE y el correspondiente Western blot respectivamente. Carril: 1-5 muestra sin sonicar. M0 muestra antes sembrar la columna, M1 proteínas no retenidas por la columna, L1 primer lavado, E eluido, L5 ultimo lavado, 6-10 muestra luego de ser sonicada.

Como siguiente paso se realizó un nuevo escalado de la producción realizando cuatro cultivos de 500 mL de SC-U. Se empleó el proceso de extracción y purificación descrito anteriormente (sin el paso de sonicación). El rendimiento de esta producción fue de 0.32 µg/mL de cultivo

de EgGST3-3r. La proteína purificada no presentó actividad de conjugación de GSH a CDNB (actividad canónica). Teniendo en cuenta que esta enzima presenta homología filogenética en la región N-terminal con los residuos catalíticos de la clase Omega (Iriarte et al. 2012), y que GSTs pertenecientes a esta clase poseen escasa o nula actividad contra el CDNB (Whitbread et al. 2005), estos resultados eran esperables. El bajo rendimiento de la producción para esta enzima no nos permitió obtener cantidades suficientes para realizar ensayos bioquímicos frente a otros sustratos característicos de la clase Omega (DHA y HED).

3.6.2 Optimización de las condiciones de lisis celular

Un elemento importante para la expresión de proteínas recombinantes solubles es el proceso de lisis celular. Teniendo en cuenta los bajos rendimientos en el proceso de extracción se decidió optimizar las condiciones de lisis celular. En la producción se cambió el breaking buffer utilizado, por uno compuesto por: 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.6 M NaCl, 10 % sacarosa, 5 mM beta-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 1mM EDTA (Xiao 2014). Este buffer fue testado en cuatro protocolos distintos de extracción esquematizados en la Figura 28.

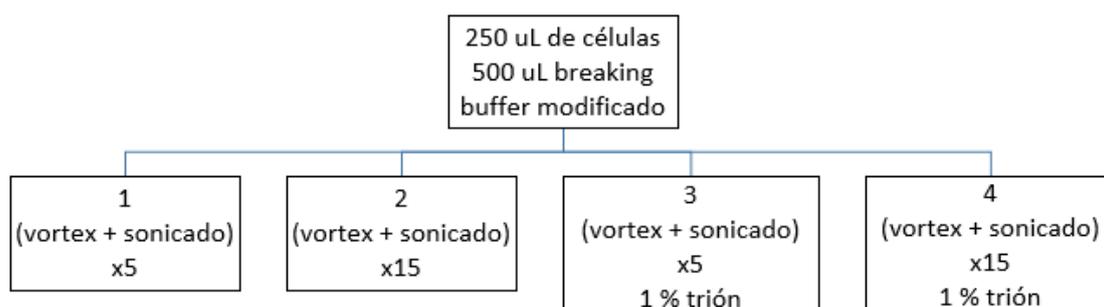


Figura 28. Esquema de los distintos protocolos de extracción utilizados. Protocolo 1: cuenta con 5 ciclos de vortex durante 60 segundos seguido por enfriamiento en hielo durante dos minutos y sonicado. Protocolo 2 cuenta con 15 ciclos de vortex durante 60 segundos seguido por enfriamiento en hielo durante dos minutos y sonicado. Protocolo 3: ídem del protocolo 1 pero la muestra además de presentar el Breaking Buffer también se encuentra en 1 % tritón. Protocolo 4: ídem del protocolo 2 pero la muestra además de presentar el Breaking Buffer también se encuentra en 1 % tritón.

La fracción soluble e insoluble obtenida de cada una de estas producciones fue analizada por Western blot para evidenciar la presencia de la proteína recombinante (Figura 29). En la Figura 29A se observan las fracciones solubles y en la Figura 29B se observan las fracciones insolubles. A partir de los resultados obtenidos se concluyó que el protocolo de extracción 2 fue el más eficiente. Se realizó el escalado de la producción y posterior extracción de la

proteína recombinante según el protocolo N° 2. A pesar de la utilización de estas nuevas condiciones el rendimiento fue menor al esperado, limitando la cantidad de ensayos que se pudieron realizar.

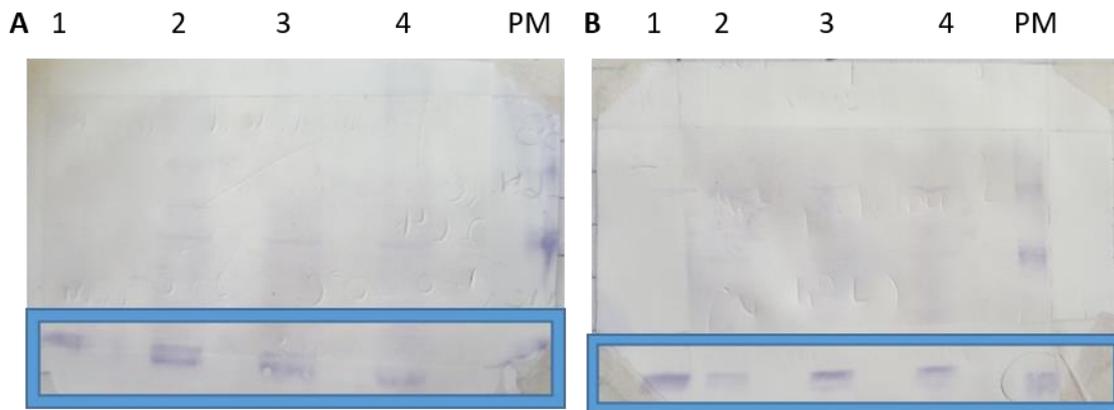


Figura 29. Western blot de las distintas condiciones de lisis celular. A-B Representa el Western blot de la fracción soluble y la insoluble respectivamente. Cada carril corresponde a los 4 protocolos de lisis celular.

3.6.3 Expresión de EgGST1-1r y EgGST2-2r

Se realizó la transformación de células de *S. cerevisiae* con las construcciones para las proteínas recombinantes EgGST1-1r y EgGST2-2r en pYES2. Se procedió a realizar una producción de ambas proteínas siguiendo el mismo protocolo descrito para la EGST3-3r. En la Figura 30 se muestra la electroforesis de las proteínas a distintos tiempo de inducción y los Western blots de las mismas, donde se identificó la presencia de las proteínas recombinantes.

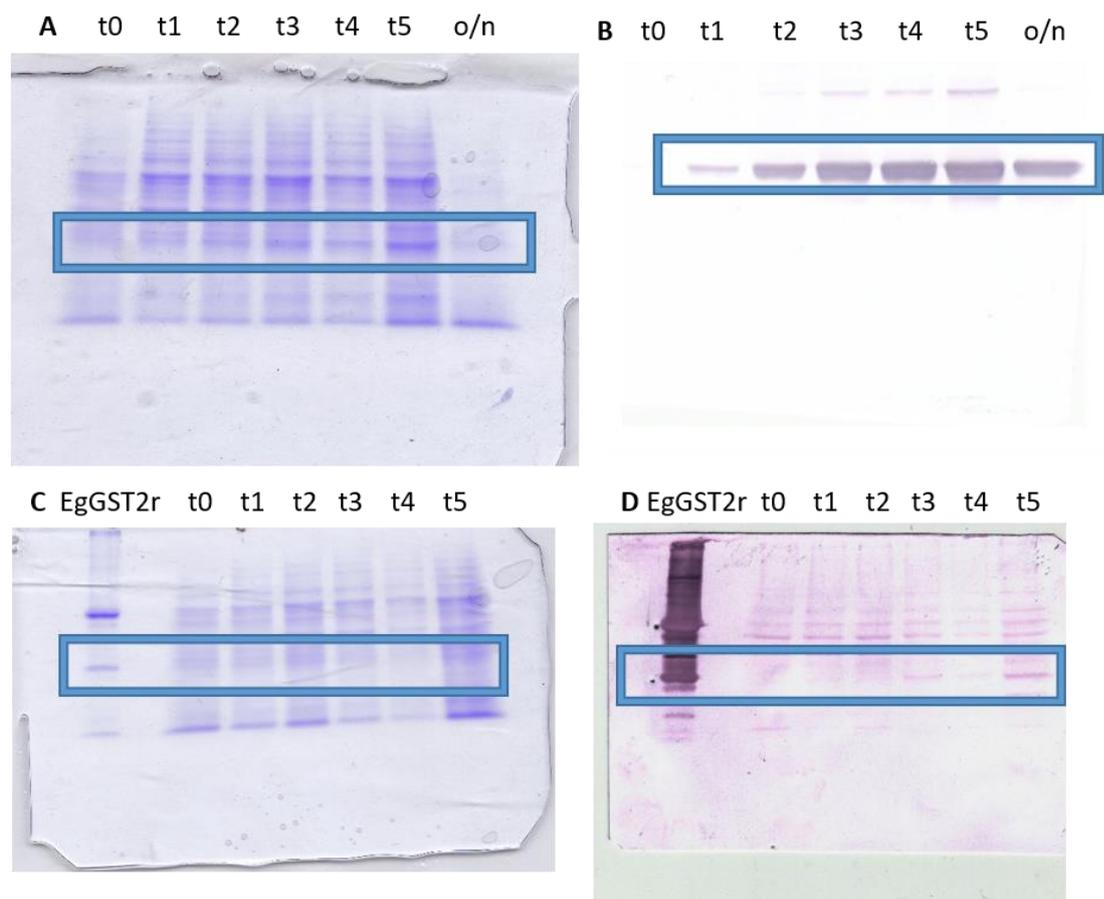


Figura 30. Expresión de EgGST1-1r y EgGST2-2r. A y C Electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de la inducción de la expresión de la proteína a distintos tiempos de incubación para EgGST1-1r y EgGST2-2r respectivamente. B y D La presencia de la proteína se verificó mediante Western blot con sueros específicos para EgGST1-1r y EgGST2-2r respectivamente. Se resaltan las bandas correspondientes a la proteína.

En la Figura 30B se observa claramente una banda correspondiente a EgGST1-1r a partir de las 2 hs (t1). Por otro lado, en la producción de EgGST2-2r (Figura 30C-D), se aprecia la banda de interés a partir de las 6 hs. (t3, t4, t5). Teniendo en cuenta el bajo rendimiento de la producción de EgGST2-2r, se decidió no continuar con dicha proteína, y se trabajó únicamente con la EgGST1-1r. Esta mostro una eficiencia de producción aceptable, por lo que se decidió realiza el escalado a volúmenes mayores (200 mL x4), agregando una etapa de cambio de buffer (fosfato de potasio 10 mM pH 6.5). Este cambio se realizó luego de la purificación por cromatografía de afinidad en columna de Ni-Agarosa. A partir de esta última producción se obtuvo un rendimiento bajo de tan solo 10 μg de proteína, permitiendo únicamente medir la actividad contra el sustrato universal, obteniéndose un valor de actividad específica de 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Con el objetivo de mejorar la eficiencia, en producciones posteriores se utilizó el reactivo Y-PER (yeast protein extraction reagent, Pierce, Rockford, IL) específico para

extracción de proteínas de levaduras, llegando a obtener 500 µg de proteína recombinante pura a partir de 600 mL de cultivo celular.

4 DISCUSIÓN

En helmintos parásitos, las GSTs representan una de las principales clases de enzimas detoxificantes, identificándose hasta el momento cinco clases diferentes: Mu, Pi, Sigma, Omega y Zeta (Torres-Rivera & Landa 2008; Cwiklinski et al. 2015). Debido a la baja actividad CYP que poseen los helmintos, se cree que estos organismos dependen principalmente de reacciones de reducción e hidrólisis como reacciones de fase I. Las GSTs son las principales enzimas de detoxificación de fase II (Brophy et al. 2012; Matoušková et al. 2016). Son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos, protegiendo de esta forma al organismo (Torres-Rivera & Landa 2008). Por estos motivos, varias GSTs de helmintos, especialmente de trematodos y nematodos, han sido caracterizadas profundamente a nivel molecular y bioquímico (Torres-Rivera & Landa 2008). Normalmente los organismos expresan más de una clase de GSTs. Esto les permite complementar las funciones, ampliando el espectro de actividades con el fin de protegerse a sí mismo. Hasta el momento, se han detectado GSTs heterodiméricas en mamíferos, las cuales están formadas por subunidades de la misma clase, en particular Alfa y Mu (Hayes & Pulford 1995). Las primeras GSTs identificadas fueron clasificadas, entre otros criterios, por los sustratos que eran capaces de utilizar. En mamíferos cada una de las clases de GSTs cataliza un conjunto determinado de reacciones y utiliza sólo ciertos sustratos. En general las GSTs pueden ser clasificadas según el tipo de sustratos modelo que utilizan. Sin embargo, este criterio no puede ser extrapolado a otros organismos, dificultando su clasificación. Entre ellos en los helmintos parásitos, algunas GSTs presentan actividades solapantes frente a distintos sustratos marcadores de cada clase (Torres-Rivera & Landa 2008). Por ejemplo este hecho ya ha sido reportado para la EgGST1r, la cual presenta actividad glutatión transferasa frente al sustrato BSP característico de la clase Mu y el ácido etacrínico de la clase Pi, así como actividad GSH peroxidasa frente al hidroperóxido de cumeno característico de la clase Alfa (Harispe et al. 2010).

Se observó que la EgGST2-3r presentó actividad GST frente al sustrato universal CDNB, al DCNB (característico de la clase Mu), y también presentó actividad frente al *trans, trans*-2,4-decadienal, producto secundario de la peroxidación lipídica (Salvatore et al. 1995; Torres-Rivera & Landa 2008). Esta última actividad podría ser relevante ya que la respuesta inmune

del hospedero implica la producción de diversas especies oxidantes que podrían iniciar un proceso de peroxidación en las membranas de las células del parásito. Pudiendo esta actividad ser importante en el contexto de un infección. Se ha reportado que distintas GST parasitarias exhiben esta actividad (Torres-Rivera & Landa 2008). En suma, al comparar el perfil de sustratos con el reportado para EgGST1r, se observa que ambas presentan actividades diferentes. Logrando de esta manera al cumplir roles ligeramente diferentes en el parásito, desarrollar una mejor adaptación a la vida en el hospedero.

Por otro lado, EgGST2-3r presento al igual que otras GST de cestodos (EgGST1r y Ts26GST), una mayor especificidad frente al GSH con respecto al CDNB (Tabla 7). Esto se observa al comparar las k_{cat}/K_M de cada enzima con cada sustrato. Los valores para esta relación son mayores para el GSH con respecto al CDNB. El valor de k_{cat}/K_M representa la constante aparente de orden dos, que se relaciona con las propiedades de la enzima libre y el sustrato libre (Dixon & Webb 1979). Esto se asemeja a la eficiencia catalítica y a la especificidad de la enzima por el sustrato. Además, la k_{cat} tanto del heterodímero como de las otras GST de cestodos se encuentran en el mismo orden. Sin embargo, la relación k_{cat}/K_M (CDNB) para el heterodímero, es un orden menor que para las otras GSTs reportadas. Pudiendo ser esta actividad no la principal, pero formar parte de un set de respaldo.

Tabla 7. Constantes cinéticas. Comparación de las constantes cinéticas halladas para GST de *E. granulosus*, *E. multilocularis* (EMGST1) y *T. solium* (Ts26GST).

	K_M (mM)		k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})/ K_M (CDNB) (mM)	k_{cat} (s^{-1})/ K_M (GSH) (mM)
	CDNB	GSH			
EgGST2-3r	3.7	0.39	1.7	0.46	4.4
EgGST1r^a	0.80	0.50	2.0	2.5	4.0
EMGST1^b	0.32	-	3.3	10	-
Ts26GST^b	2.0	0.90	4.3	2.2	4.8

a(Harispe et al. 2010) b(Torres-Rivera & Landa 2008).

Continuando con la caracterización clásica de las GST se realizó el perfil de inhibidores. Se ha reportado que la unión de diversos compuestos y algunas drogas antihelmínticas a GSTs parasitarias produce una inhibición de la actividad enzimática (Brophy et al. 1989). La quimioterapia, si bien no es completamente eficiente, constituye un tratamiento prometedor

para el control de la hidatidosis. Esta terapia podría disminuir el tamaño del quiste previo a la intervención quirúrgica, o incluso evitar la cirugía. También podría evitar el desarrollo de una infección secundaria luego de la siembra accidental del PEs tras la cirugía. En este trabajo se analizó la inhibición de EgGST2-3r por diversos compuestos y algunas drogas antihelmínticas disponibles. Dentro de los compuestos estudiados, el Cibacron Blue y el ácido elálgico, fueron los que produjeron una mayor inhibición de la actividad enzimática. Por otro lado dentro de los antihelmínticos, los fenoles halogenados fueron los responsables de inhibir en mayor medida a la GST. Esto concuerda con lo observado para otras GSTs de helmintos, las cuales suelen resultar más sensibles al Bitionol y al Hexaclorofeno que al resto de los antihelmínticos (Torres-Rivera & Landa 2008). Por otro lado dentro de los benzimidazoles el mejor inhibidor fue el Fenbendazol, a pesar de no ser el utilizado habitualmente en el tratamiento de la equinocosis quística (Brunetti et al. 2016; Higueta et al. 2016). Teniendo en cuenta los bajos valores de inhibición de EgGST2-3r obtenidos para los benzimidazoles, de todas formas otros trabajos han demostrado que tanto el Albendazol como el Mebendazol son capaces de reducir o inhibir la actividad GST del pool de enzimas de *E. granulosus*, alterando su metabolismo (Adnani Sadati et al. 2016; Matoušková et al. 2016). Actualmente ambas drogas son utilizadas para el tratamiento de esta parasitosis, tanto en el hospedero definitivo, como en el humano (Brunetti et al. 2016). Una ventaja de poseer dos enzimas con paneles de inhibidores distintos sería tener más herramientas para la supervivencia al enfrentarse a drogas distintas. Más aun teniendo en cuenta que ambas enzimas presentan actividades similares y redundantes. Es decir, mientras que una droga como la Rafoxanida posee un bajo IC₅₀ para la EgGST1r, necesita una mayor concentración para inhibir al heterodímero. Lo opuesto ocurre con el Fenbendazol, Closantel y Bitionol, que a una menor concentración logran inhibir al heterodímero.

En helmintos parásitos, hasta el momento no se han reportado GSTs heterodiméricas, siendo la EgGST2-3r la primer enzima de este tipo en ser expresada y caracterizada. Cada subunidad que compone a la GST contiene un sitio activo, por lo que el heterodímero presenta dos sitios catalíticos diferentes. Esto sugeriría que el heterodímero podría actuar sobre los mismos sustratos utilizados por los homodímeros con los que comparte subunidades (EgGST2-2 y EgGST3-3). Si este fuera el caso, podríamos tener a más de una enzima actuando simultáneamente sobre el mismo sustrato. Otro aspecto a tener en cuenta es que cada uno

de los homodímeros y el heterodímero podrían presentar una afinidad y eficiencia catalítica diferente frente a un determinado sustrato. A su vez, cada enzima tendría una sensibilidad distinta frente a la inhibición por diferentes compuestos con los que se encuentre el parásito y por el producto de la reacción que cataliza. En este sentido, se ha propuesto que una de las ventajas de la formación de enzimas heterodiméricas es que los productos de las reacciones catalizadas por una de las subunidades pueden ser secuestrados por la otra subunidad, de forma de impedir la inhibición de la enzima por el producto (Hayes & Pulford 1995). Sin embargo, existe la posibilidad de que, si bien EgGST2-3 tiene dos sitios activos diferentes, los mismos no sean exactamente iguales a los encontrados en los correspondientes homodímeros. Las interacciones entre las subunidades podrían dar lugar a estructuras proteicas diferentes, afectando así la arquitectura de los sitios activos y repercutiendo en la especificidad de sustratos de la enzima. Así, EgGST2-3 podría utilizar sustratos diferentes a los de los homodímeros, por lo que sería relevante la expresión de las tres enzimas en forma simultánea en una determinada región del parásito para actuar sobre un rango más amplio de sustratos (La-Rocca 2014). Es por esto que se ensayaron las actividades características de la clase Omega y la clase Sigma, a las cuales el heterodímero presenta similitud de secuencia (Iriarte et al. 2012). La actividad dehidroascorbato reductasa, una actividad clásica de la clase Omega, sería importante para la regeneración del ascorbato. En presencia de compuestos oxidantes, el ascorbato se convierte en monodehidroascorbato que, si no es reducido rápidamente, se convierte en dehidroascorbato (Dixon D. P. y col., 2011). El ascorbato es un importante antioxidante para los mamíferos y las plantas. Aunque no hay información sobre la utilización de este compuesto por parte de los helmintos, se ha propuesto que GSTs de *S. mansoni* podría utilizar el ascorbato proveniente de su hospedero (Girardini J. y col., 2002). Esto contribuiría a la protección del parásito frente al estrés oxidativo. De esta forma, adquiere importancia para el parásito la regeneración del ascorbato, y por lo tanto, la actividad dehidroascorbato reductasa de enzimas como las GSTs. Por otro lado la actividad tiol transferasa se caracteriza por la formación de disulfuros mixtos entre las proteínas y el GSH, protegiéndolas de esta manera de modificaciones por moléculas oxidantes, evitando una posible pérdida de su función (Townsend 2007). En suma, ambas actividades brindarían estrategias importantes en la protección del parásito frente al estrés oxidativo. Sin embargo el heterodímero no presentó ninguna de las dos actividades características de la clase Omega.

Esta ausencia puede deberse a que la subunidad EgGST3 *per se* no la posea, o que exista impedimentos estéricos o cambios conformacionales al generarse el heterodímero, que no permita el acercamiento del sustrato al sitio catalítico (residuo de Cys). Para abordar esto, sería pertinente estudiar esta actividad en el homodímero EgGST3-3, el cual posee en el sitio activo aminoácidos relacionados a las GST de clase Omega (Iriarte et al. 2012). Reportes anteriores de la estructura cristalográfica de una GST Omega humana (HsGSTO1), ha permitido identificar algunos residuos importantes para la catálisis (Board et al. 2000; Brock et al. 2013). Los resultados de la comparación de la secuencia entre distintas GSTs de clase Omega muestran una conservación parcial de la región conceso. De los cinco aminoácidos conservados entre GSTs de clase Omega, dos se encuentran presentes en la secuencia de EgGST3. Estos cambios en la secuencia podrían, al menos en parte, estar involucrados con la ausencia de las actividades catalíticas de la clase Omega en EgGST2-3r. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se han identificado GSTs de clase Omega en *E. granulosus*, y que EgGST3 presenta varios de los residuos catalíticos conservados de esta clase, se podría sugerir que el homodímero podría cumplir dichas funciones. Por otro lado, teniendo en cuenta que la subunidad EgGST2 y parte de la secuencia de EgGST3 presentan homología con la clase Sigma, el heterodímero podría adquirir, en teoría, también actividades características de esta clase (Iriarte et al. 2012). La producción de prostaglandinas es una de estas actividades características. La síntesis de prostaglandinas por parte de las GSTs parasitarias estaría involucrada en la polarización de la respuesta inmune del hospedero, permitiendo el establecimiento y la sobrevivencia del parásito (LaCourse et al. 2012; Dowling et al. 2010). Estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo comprueban que estos aminoácidos conservados están presentes en EgGST2 (Iriarte et al. 2012). En este trabajo se analizaron los residuos conservados involucrados en la unión al GSH y a la PGH₂ (Hervé et al. 2003). Dentro de estos residuos la EgGST2 conserva cuatro de los cinco aminoácidos relevantes para la unión a GSH y los tres residuos relevantes para la unión a PGH₂. Estos resultados sugieren que EgGST2 podría presentar la actividad prostaglandina sintasa, perdiendo esta actividad al asociarse con la subunidad EgGST3, a consecuencia, por ejemplo, de un impedimento estérico imposibilitando el acercamiento del sustrato al sitio activo.

Además, se ensayó la actividad peroxidasa dependiente de GSH. La EgGST2-3r presentó una actividad específica del orden descrito para otras GST de helmintos como EMGST1 de *E.*

multilocularis (Torres-Rivera & Landa 2008). Debido a los escasos sistemas de detoxificación que este parásito podría presentar, si bien la actividad específica presentada no es tan alta como la exhibida por EgGST1r (Harispe et al. 2010), poseer actividades redundantes podría ser relevante frente a la protección de radicales libres derivados del oxígeno. Además se halló el valor de la relación k_{cat}/K_M , sin embargo, no existen referencias para comparar estas constantes con otras GST de helmintos, ya que solo se reporta el valor de la actividad específica. De todas formas se puede comparar este valor con el descrito para otras enzimas metabólicas (Bar-Even et al. 2011). Teniendo en cuenta estos resultados el valor hallado para k_{cat}/K_M es tres órdenes menor al valor estándar reportado para la mayoría de las enzimas metabólicas, por lo que es probable que esta actividad represente un sistema de respaldo, para el set de enzimas ya existentes en el parásito (Bisio et al. 2015; Harispe et al. 2010), frente a la protección de especies reactivas del oxígeno.

Además de los ensayos realizados, se estudiaron actividades no catalíticas, como la capacidad ligandina de la enzima. La EgGST2-3r presentó actividad ligandina frente a la mayor parte del panel de moléculas empleadas. La habilidad de la enzima de unir una gran diversidad de compuestos, incluidas drogas antihelmínticas, le brindaría al parásito un mecanismo de protección, ya que estas drogas al ser secuestradas por la enzima pueden no llegar a su blanco de acción, y ser eliminadas, como un mecanismo de detoxificación pasiva (Plancarte et al. 2014). De esta manera, debería tenerse en cuenta esta actividad, para el futuro diseño de nuevos antihelmínticos, ya que éstos debido a la actividad ligandina de las GSTs pueden no llegar a su blanco de acción.

Resumiendo, las actividades que presenta EgGST2-3r son: (I) actividad frente a sustratos modelos de las glutatión transferasas, (II) actividad con productos secundarios de la peroxidación lipídica, (III) actividad ligandina frente a varios compuestos, principalmente drogas antihelmínticas, (IV) actividad peroxidasa (del orden de la descrita para otros helmintos parásitos como *E. multilocularis*). Estos resultados, sumados a los estudios de origen y clasificación de ambas subunidades sugieren que EgGST2-3 podría estar involucrada en la protección de parásito frente al estrés oxidativo, así como en mecanismos de detoxificación pasiva.

Por otro lado, la expresión de los homodímeros recombinantes forma parte de los objetivos de nuestro grupo de trabajo. La expresión de los mismos en sistemas procariotas forma parte de dos trabajos de Maestría del grupo (Arbildi 2013; La-Rocca 2014). Sin embargo, a pesar de que en ambos trabajos se ensayaron diversas condiciones de cultivo, protocolos de solubilización y purificación, ni EgGST2 ni EgGST3, pudieron ser producidas en forma soluble y activa. Es por esto que se decidió emplear un modelo eucariota para la expresión de EgGST2 y EgGST3. Entre estos sistemas, podemos encontrar varias levaduras, como *S. cerevisiae* y *Pichia pastoris*, así como células de mamífero y el sistema del baculovirus para la expresión en células de insectos (Brondyk 2009). Una de las principales ventajas de estos sistemas es que permiten la incorporación de diferentes modificaciones postraduccionales como la glicosilación. De todas formas, existen diferencias en las estructuras glucídicas incorporadas en cada uno de los sistemas, lo que puede afectar la estructura y función de la proteína. Por otro lado, los niveles de producción de la proteína recombinante por parte de los sistemas eucariotas varía de una proteína a otra, pero en general son menores que los obtenidos en *E. coli* (Romanos et al. 1992; Brondyk 2009). Además, la expresión de proteínas en estos sistemas implica una dedicación de tiempo mayor, son más costosos y en algunos casos presentan dificultades para optimizar la expresión a gran escala y poder obtener así cantidades significativas de proteína (Brondyk 2009). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo hasta el momento en el marco del Proyecto FCE_2_2011_1_6436, se decidió expresar los homodímeros recombinantes en *S. cerevisiae*. Se ensayaron distintas condiciones de expresión y purificación, sin embargo, durante la realización de esta Tesis de Maestría no fue posible llevar a cabo la optimización de la producción de estas proteínas. La producción de la EgGST2-2r en levaduras forma parte del proyecto de Tesis de Licenciatura en Bioquímica de un integrante de nuestro grupo. De no ser posible la producción de estas proteínas en el sistema actual, se podría utilizar fermentadores, generando de esta manera cultivos de mayor escala, y por consiguiente mayores concentraciones de las proteínas u otros sistemas; como *P. pastoris*. Sería de gran valor obtener los homodímeros recombinantes y así poder comparar sus actividades con el heterodímero. De esta manera se podría adjudicar las actividades a cada subunidad correspondiente o determinar si estas actividades son consecuencia de una sinergia entre ambas subunidades. Para algunas GSTs heterodiméricas de mamíferos se ha observado que

la actividad frente a un determinado sustrato presenta valores intermedios entre las actividades de los correspondientes homodímeros (Hayes & Pulford 1995). De esta manera contar con la caracterización del heterodímero a pesar de no contar con los homodímeros, nos permitió conocer en qué mecanismos podrían estar involucrados. Estos pueden ser la protección frente al estrés oxidativo (actividad peroxidasa) o mecanismos de detoxificación pasiva (actividad ligandina). A pesar de que restan varios aspectos de las EgGSTs por estudiar la importancia asignada a estas enzimas, hace que sean consideradas como posibles blancos de nuevas drogas antihelmínticas o candidatas para el desarrollo de vacunas.

5 REFERENCIAS

- Adler, V. et al., 1999. Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO Journal*, 18(5), p.1321.
- Adnani Sadati, S.J. et al., 2016. A Comparison between the Effects of Albendazole and Mebendazole on the Enzymatic Activity of Excretory / Secretory Products of *Echinococcus granulosus* Protoscoleces in Vitro. *Iranian journal of public health*, 45(2), pp.223–9.
- Angelucci, F. et al., 2005. Insights into the Catalytic Mechanism of Glutathione S-Transferase: The Lesson from *Schistosoma haematobium*. *Structure*, 13(9), pp.1241–1246.
- Anzenbacher, P. & Anzenbacherová, E., 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 58(5–6), pp.737–47.
- Arbildi, P., 2013. *Glutati3n transferasas en Echinococcus granulosus: Identificaci3n, estudios cin3ticos y de expresi3n*. (PEDECIBA 3rea Qu3mica), Facultad de Qu3mica (UdelaR).
- Ardelli, B.F., 2013. Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes. *Parasitology International*, 62(6), pp.639–646.
- Atkinson, H.J. & Babbitt, P.C., 2009. Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, 48(46), pp.11108–11116.
- Bar-Even, A. et al., 2011. The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry*, 50(21), pp.4402–4410.
- Barrett, J., 2009. Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology*, 136(12), pp.1633–42.
- Barrett, J., 1997. Helminth detoxification mechanisms. *Journal of helminthology*, 71(2), pp.85–9.
- Bawono, P. & Heringa, J., 2014. PRALINE: A Versatile Multiple Sequence Alignment Toolkit. In pp. 245–262.
- Bill, R.M., 2014. Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Frontiers in microbiology*, 5, p.85.
- Bisio, H. et al., 2015. A New Class of Thioredoxin-Related Protein Able to Bind Iron–Sulfur

- Clusters. *Antioxidants & Redox Signaling*, p.ars.2015.6377. Available at:
- Board, P.G. et al., 2000. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *The Journal of biological chemistry*, 275(32), pp.24798–806.
- Bolton, J.L. et al., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology*, 13(3), pp.135–60.
- Bolton, J.L. & Chang, M., 2001. Quinoids as reactive intermediates in estrogen carcinogenesis. *Advances in experimental medicine and biology*, 500, pp.497–507.
- Booth, J., Boyland, E. & Sims, P., 1961. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *The Biochemical journal*, 79(3), pp.516–24.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–54.
- Brock, J., Board, P.G. & Oakley, A.J., 2013. Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligandin site. *PloS one*, 8(4), p.e60324.
- Brondyk, W.H., 2009. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in enzymology*, 463, pp.131–47.
- Brophy, P.M., MacKintosh, N. & Morphew, R.M., 2012. Anthelmintic metabolism in parasitic helminths: proteomic insights. *Parasitology*, 139(9), pp.1205–17.
- Brophy, P.M., Southan, C. & Barrett, J., 1989. Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *The Biochemical journal*, 262(3), pp.939–46.
- Brunetti, E. et al., 2016. Update on Treatment for Cystic Echinococcosis of the Liver. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 8(3), pp.153–164.
- Brunetti, E., Kern, P. & Vuitton, D.A., 2010. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta tropica*, 114(1), pp.1–16.
- Burmeister, C. et al., 2008. Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*: protective effects of

- the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(2), pp.343–54.
- Chaurasia, M.K. et al., 2016. In-silico analysis and mRNA modulation of detoxification enzymes GST delta and kappa against various biotic and abiotic oxidative stressors. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, pp.353–363.
- Cvilink, V., Lamka, J. & Skálová, L., 2009. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug metabolism reviews*, 41(1), pp.8–26.
- Cwiklinski, K. et al., 2015. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome biology*, 16, p.71.
- Danielson, U.H. & Mannervik, B., 1985. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *The Biochemical journal*, 231(2), pp.263–267.
- Dixon & Webb, 1979. *Enzymes*.
- Dowling, D.J. et al., 2010. Major secretory antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infection and Immunity*, 78(2), pp.793–801.
- Eckert, J. et al., 2001. WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. *World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties)*.
- Eckert, J. & Deplazes, P., 2004. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical microbiology reviews*, 17(1), pp.107–35.
- Fabrini, R. et al., 2009. Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination. *Biochemistry*, 48(43), pp.10473–82.
- Fairweather, I. & Boray, J.C., 1999. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 158(2), pp.81–112.
- Fedajko, B. & Mazerska, Z., 2011. [UDP-glucuronyltransferases in detoxification and activation

- metabolism of endogenous compounds and xenobiotics]. *Postepy biochemii*, 57(1), pp.49–62.
- Fernández, C. & Hormaeche, C.E., 1994. Isolation and biochemical characterisation of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *International journal for parasitology*, 24(7), pp.1063–6.
- Fernández, V. et al., 2000. *Echinococcus granulosus*: molecular cloning and phylogenetic analysis of an inducible glutathione S-transferase. *Experimental parasitology*, 96(3), pp.190–4.
- da Fonseca, R.R. et al., 2010. Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), p.281.
- Fretland, A.J. & Omiecinski, C.J., 2000. Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chemico-biological interactions*, 129(1–2), pp.41–59.
- Frova, C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular Engineering*, 23(4), pp.149–169.
- Gelperin, D.M. et al., 2005. Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes & development*, 19(23), pp.2816–26.
- Girardini, J. et al., 2002. Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), pp.5512–5521.
- Glatt, H., 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-biological interactions*, 129(1–2), pp.141–70.
- Grant, D.M., 2008. Structures of human arylamine N-acetyltransferases. *Current drug metabolism*, 9(6), pp.465–70.
- Greenberg, R.M., 2013. ABC multidrug transporters in schistosomes and other parasitic flatworms. *Parasitology international*, 62(6), pp.647–53.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic

- step in mercapturic acid formation. *The Journal of biological chemistry*, 249(22), pp.7130–9.
- Harispe, L. et al., 2010. Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*. *Acta tropica*, 114(1), pp.31–6.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U. & Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45, pp.51–88.
- Hayes, J.D. & Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 30(6), pp.445–600.
- Hervé, M. et al., 2003. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *European journal of immunology*, 33(10), pp.2764–72.
- Higgins, L.G. & Hayes, J.D., 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug metabolism reviews*, 43(2), pp.92–137.
- Higuita, A. et al., 2016. Cystic Echinococcosis. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), pp.518–23.
- Ioannides, C. & Lewis, D.F. V, 2004. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Current topics in medicinal chemistry*, 4(16), pp.1767–88.
- Iriarte, A. et al., 2012. Identification of novel glutathione transferases in *Echinococcus granulosus*. An evolutionary perspective. *Acta Tropica*, 123(3), pp.208–216.
- Kampkötter, A. et al., 2003. Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Onchocerca volvulus* (Ov-GST-3): A parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 325(1), pp.25–37.
- Kawai, S., Hashimoto, W. & Murata, K., 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs*, 1(6),

pp.395–403.

- Kim, J.-G. et al., 2016. Clonorchis sinensis omega-class glutathione transferases play major roles in the protection of the reproductive system during maturation and the response to oxidative stress. *Parasites & vectors*, 9(1), p.337.
- LaCourse, E.J. et al., 2012. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(5), p.e1666.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5.
- Laing, R. et al., 2015. The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International journal for parasitology*, 45(4), pp.243–51.
- La-Rocca, S., 2014. *Estudio de la distribución de las glutatión transferasas en Echinococcus granulosus y caracterización de una nueva enzima heterodimérica*. Universidad de la República.Facultad de Ciencias.
- Liebau, E., Wildenburg, G., et al., 1996. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 80(1), pp.27–39.
- Liebau, E. et al., 2000. Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 109(2), pp.101–110.
- Liebau, E., Müller, V., et al., 1996. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 77(1), pp.49–56.
- Liebau, E. et al., 1997. Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*. *The Biochemical journal*, 324 (Pt 2, pp.659–66.
- Liebau, E. et al., 2008. The secretory omega-class glutathione transferase OvGST3 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus*. *FEBS Journal*, 275(13), pp.3438–3453.
- Lincke, C.R. et al., 1992. The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning

- and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *Journal of molecular biology*, 228(2), pp.701–11.
- Lindsay, J. et al., 2008. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Current drug metabolism*, 9(2), pp.99–105.
- Mannervik, B. et al., 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, pp.1–8.
- Marangoni, A.G., 2003. Two substrate reactions. In *Enzyme Kinetics*. pp. 90–101.
- Matoušková, P. et al., 2016. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*, 32(6), pp.481–491.
- McTigue, M.A., Williams, D.R. & Tainer, J.A., 1995. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *Journal of molecular biology*, 246(1), pp.21–7.
- Meech, R. et al., 2012. The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & therapeutics*, 134(2), pp.200–18.
- Menon, D. & Board, P.G., 2013. A Role for Glutathione Transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the Glutathionylation Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), pp.25769–25779.
- Morello, A., Repetto, Y. & Atias, A., 1982. Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 72(3), pp.449–52.
- Morisseau, C. & Hammock, B.D., 2008. Gerry Brooks and epoxide hydrolases: four decades to a pharmaceutical. *Pest management science*, 64(6), pp.594–609.
- Morphew, R.M. et al., 2012. Proteomics and in silico approaches to extend understanding of the glutathione transferase superfamily of the tropical liver fluke *Fasciola gigantica*. *Journal of proteome research*, 11(12), pp.5876–89.
- Motulsky, H., y Christopoulos, A., 2004. Fitting models to biological data using linear and

nonlinear regression : a practical guide to curve fitting. *Oxford University Press*.

Nicolao, M.C. et al., 2014. P-glycoprotein expression and pharmacological modulation in larval stages of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology international*, 63(1), pp.1–8.

Oakley, A., 2011. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), pp.138–151.

Oselin, K. & Anier, K., 2007. Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: a mechanism for possible drug interactions. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35(9), pp.1452–4.

Parker, J.L. & Newstead, S., 2014. Method to increase the yield of eukaryotic membrane protein expression in *Saccharomyces cerevisiae* for structural and functional studies. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 23(9), pp.1309–14.

Paul, P. et al., 2012. Recent advances in sulfotransferase enzyme activity assays. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(6), pp.1491–500.

Penning, T.M., 2015. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chemico-biological interactions*, 234, pp.236–46.

Perbandt, M. et al., 2015. High resolution structures of *Plasmodium falciparum* GST complexes provide novel insights into the dimer–tetramer transition and a novel ligand-binding site. *Journal of Structural Biology*, 191(3), pp.365–375.

Plancarte, a. et al., 2014. Evaluation of the non-catalytic binding function of Ts26GST a glutathione transferase isoform of *Taenia solium*. *Experimental Parasitology*, 138(1), pp.63–70.

Precious, W.Y. & Barrett, J., 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology today (Personal ed.)*, 5(5), pp.156–60.

Repetto, Y. et al., 1986. Glutathione S-transferase activity in intact protoscolices of *Echinococcus granulosus*. *Biochemical Society Transactions*, 14(1).

Romanos, M.A., Scorer, C.A. & Clare, J.J., 1992. Foreign gene expression in yeast: a review.

Yeast (Chichester, England), 8(6), pp.423–88.

Rushmore, T.H. & Kong, A.-N.T., 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Current drug metabolism*, 3(5), pp.481–90.

Saeed, H.M. et al., 2002. Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms. *FEBS Letters*, 519(1), pp.205–209.

Salinas, G., 2013. An update on redox biology of parasites. *Antioxidants & redox signaling*, 19(7), pp.661–4.

Salvatore, L. et al., 1995. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 69(2), pp.281–8.

Savioli, L. et al., 2011. Report of the WHO Informal Working Group on cystic and alveolar echinococcosis. *World Health Organization*, (22–23 June).

Schmuck, E.M. et al., 2005. Characterization of the monomethylarsonate reductase and dehydroascorbate reductase activities of Omega class glutathione transferase variants: implications for arsenic metabolism and the age-at-onset of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Pharmacogenetics and genomics*, 15(7), pp.493–501.

Schuler, M.A., 2011. P450s in plant-insect interactions. *Biochimica et biophysica acta*, 1814(1), pp.36–45.

Sommer, A. et al., 2003. A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2. *Infection and immunity*, 71(6), pp.3603–6.

Thompson, R.C.A. & Lymbery, A.J., 1995. *Echinococcus and Hydatid Disease*, Wallingford, Oxon, UK.

Torres-Rivera, A. & Landa, A., 2008. Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica*, 105(2), pp.99–112.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76(9), pp.4350–4.

Townsend, D.M., 2007. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Molecular interventions*, 7(6), pp.313–24.

Tsai, I.J. et al., 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*, 496(7443), pp.57–63.

Vasiliou, V., Ross, D. & Nebert, D.W., 2006. Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Human genomics*, 2(5), pp.329–35.

Vatsis, K.P. et al., 1995. Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics*, 5(1), pp.1–17.

Vibanco-Pérez, N. et al., 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitology research*, 88(5), pp.398–404.

Wang, Y. et al., 2014. Quantitative evaluation of colloidal stability of antibody solutions using PEG-induced liquid-liquid phase separation. *Molecular pharmaceuticals*, 11(5), pp.1391–402.

Whitbread, A.K. et al., 2005. Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, pp.78–99.

Xiao, W., 2014. *Yeast Protocols* Second Edi., Totowa, New Jersey: Human Press. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0799-1>.

Xu, C., Li, C.Y.-T. & Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research*, 28(3), pp.249–68.

Yang, H.L. et al., 2009. Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(11), pp.993–1001.

Young, C.L. & Robinson, A.S., 2014. Protein folding and secretion: mechanistic insights advancing recombinant protein production in *S. cerevisiae*. *Current opinion in biotechnology*, 30, pp.168–77.