

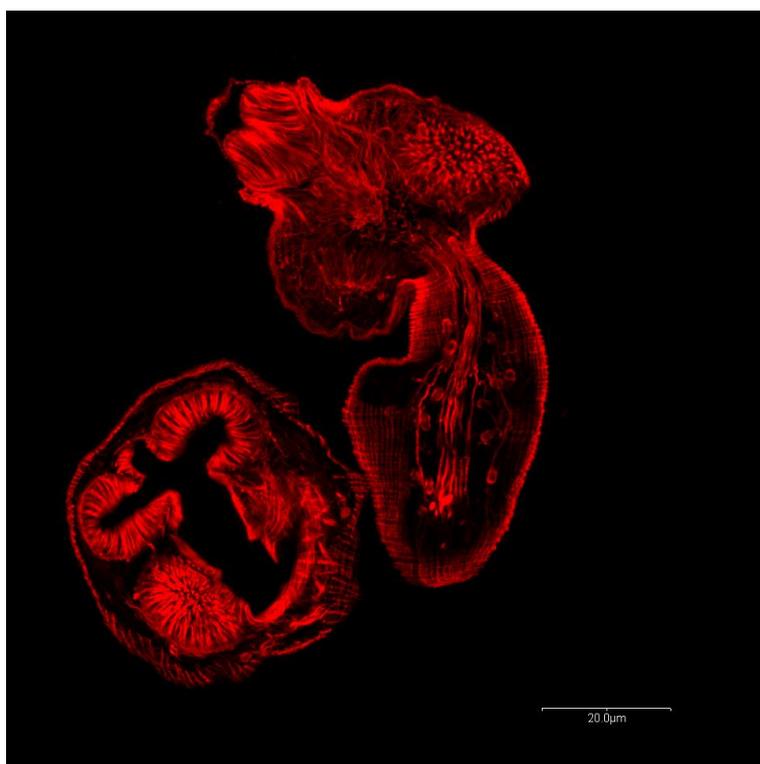
Estudio de la distribución de las glutatión transferasas en *Echinococcus granulosus* y caracterización de una nueva enzima heterodimérica

Tesis para acceder al título de Magister en Ciencias Biológicas, orientación
Bioquímica

Lic. Silvana La Rocca

Orientadora: Dra. Verónica Fernández

2014



En la portada se presenta una imagen obtenida en este trabajo, correspondiente a una microscopía confocal de dos protoesclólices de *Echinococcus granulosus*, en los que se observan los filamentos de actina por tinción con faloidina marcada.

Agradecimientos

La realización de esta tesis implicó un gran esfuerzo, dedicación y mucho trabajo, que hoy están dando sus frutos. Pasaron momentos buenos, en los que todo parecía encaminarse, y de los otros, en los que las complicaciones aparecían una tras otra. En los buenos momentos y en los no tan buenos, hubo gente que me acompañó y sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

Primeramente agradecer a Verónica Fernández por permitirme formar parte de su grupo de trabajo. Por aceptarme desde el comienzo para poder realizar mi Trabajo Especial para la Licenciatura en Bioquímica y luego como estudiante de Maestría, dándome la posibilidad de realizar esta tesis.

Quisiera agradecer a los miembros del tribunal, Beatriz Álvarez, Alejandra Kun y Henrique Ferreira, por aceptar formar parte del mismo, con el trabajo, la dedicación y el tiempo que eso implica. De una u otra forma, los tres contribuyeron de manera importante a mi formación y colaboraron en varias oportunidades con nuestro grupo, aportando ideas, sugerencias y poniéndose a nuestra disposición para lo que necesitáramos.

Gracias a PEDECIBA por financiar parte de los materiales utilizados en este trabajo, en particular los que fueron empleados en la pasantía realizada en el Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Dicha pasantía fue realizada con la orientación de la Dra. Alejandra Kun, a quien agradezco por haberme recibido y por su dedicación para que el trabajo saliera de la mejor manera posible. A AMSUD-PASTEUR por financiar la pasantía realizada en el Laboratorio de Genómica Estructural y Funcional del Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul, a Henrique Ferreira por abrirme las puertas de su laboratorio y a Thiely Ott y su familia por recibirme en su casa durante mi estadía en Porto Alegre. Gracias a la Comisión Académica de Posgrado por otorgarme una Beca de Finalización de Estudios de Posgrado y a CSIC por financiar proyectos en los que se incluye parte del trabajo realizado para esta tesis. Gracias a Paula Tucci por ayudarme en los ensayos de renaturalización de la proteína EgGST3 de cuerpos de inclusión, a Andrés Iriarte y Héctor Musto por su colaboración en los estudios filogenéticos y de análisis de secuencia de EgGST3 y a Gualberto González por proporcionarme los sueros de pacientes con infecciones por *E. granulosus* utilizados en este trabajo.

Gracias a la gente de la Cátedra de Inmunología por dejarme formar parte de la misma durante este tiempo. Principalmente a Paula Arbildi, con quien compartimos las idas y vueltas de las glutatión transferasas, y que fue un gran apoyo durante la realización de este trabajo, contribuyendo con ideas, comentarios y soluciones para los problemas que fueron

apareciendo en el camino. Agradecer también a la gente de “la casita de adelante”, especialmente a Cecilia, Gustavo, Sylvia, Ana y Florencia, por recibirme y darme una mano siempre, pero sobre todo cuando las cosas no salían como esperaba. Y a todos aquellos que colaboraron con una sugerencia, un protocolo o un reactivo “salvador”, o simplemente me prestaron su oído.

Finalmente, y más que importante, el agradecimiento a mi familia por estar incondicionalmente conmigo en todo momento, por apoyarme en todas mis decisiones y darme para adelante cuando se presentan obstáculos, tratando de superarlos. Sin ellos, este trabajo no hubiera sido posible. A mis amigas, gracias por acompañarme, nos veamos mucho o poco, siempre están ahí para apoyarme.

A todos, ¡muchas gracias!

Resumen

Las glutatión transferasas (GSTs) son una superfamilia de proteínas multifuncionales involucradas en la detoxificación celular de componentes exógenos y endógenos. Estas enzimas adquieren gran relevancia en los helmintos parásitos, ya que constituyen un importante mecanismo de detoxificación y protección en condiciones de estrés oxidativo, y contribuyen a la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Hasta el momento, se identificaron dos GSTs en *E. granulosus*: EgGST1 de clase Mu y EgGST2 de clase Sigma. En este trabajo se presentan estudios de otra GST parasitaria, EgGST3. Si bien filogenéticamente EgGST3 no pudo ser incluida en ninguna de las clases de GSTs citosólicas descritas hasta el momento, el análisis de los residuos conservados indica que su sitio activo se parece al de la clase Omega. Esto sugiere que EgGST3 podría presentar algunas de las actividades propias de esta clase, las cuales podrían ser importantes para la protección frente a especies oxidantes.

Por otra parte, se muestra la detección *in vivo* en protoescolices (PEs) de una enzima parasitaria heterodimérica formada por EgGST2 y EgGST3 (EgGST2-3). La enzima recombinante mostró actividad glutatión transferasa frente a varios sustratos modelo de las GSTs, incluyendo un producto secundario de la peroxidación lipídica. Sería importante determinar si presenta otras actividades que podrían ser relevantes para *E. granulosus* en el contexto de una infección, por ejemplo, actividad prostaglandina sintasa y/o tioltransferasa.

Se analizó la localización de las tres EgGSTs tanto en parásitos invaginados como evaginados mediante inmunomicroscopía confocal. Se encontraron distribuciones diferentes para cada una de ellas, que podrían corresponderse con diferentes roles de cada enzima en el parásito. En particular, se observó que las tres subunidades se encuentran en la región más externa del organismo, el tegumento, aunque EgGST1 y EgGST3 se distribuyen además en todo el parénquima del parásito. Además, las tres subunidades fueron halladas en productos de excreción-secreción de PEs, a pesar de que sólo EgGST1 fue detectada en líquido hidático.

Finalmente, se encontraron anticuerpos específicos para EgGST2 y/o EgGST3 en los sueros de pacientes infectados por *E. granulosus*, indicando una interacción directa entre estas enzimas y el sistema inmune del hospedero intermediario. De esta forma, sus actividades podrían afectar directa o indirectamente la respuesta inmune del hospedero y los mecanismos de evasión de la misma por parte del parásito.

En suma, los resultados obtenidos indican que EgGST3 y la enzima heterodimérica EgGST2-3 podrían contribuir a la supervivencia del parásito en su hospedero a través de diferentes mecanismos. Esto implicaría además que estas enzimas podrían ser consideradas como posibles blancos de nuevas drogas antihelmínticas o candidatas para el desarrollo de vacunas, como se ha observado con otras GSTs de helmintos parásitos.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BCIP	fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo
BSA	Seroalbúmina bovina
BSP	Bromosulfoftaleína
cADN	ADN copia
CDNB	1- cloro-2,4-dinitrobenceno
CHAPS	3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano
CHEA	Comisión Honoraria de Experimentación Animal
DCNB	1,2-dicloro-4-nitrobenceno
DMF	Dimetilformamida
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter)-N,N, N', N'-tetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPNP	1,2-epoxi-3-(4'-nitro-fenoxi)propano
E/S	Excreción/Secreción
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación transferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
Ig	Inmunoglobulina
IL-1	Interleuquina 1
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB		Luria Bertani
LH		Líquido hidático
MAPEG	Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism	
mARN		ARN mensajero
NBT		Azul de nitrotetrazolio
PBS		Buffer Fosfato Salino
PCR		Reacción en Cadena de la Polimerasa
pI		Punto isoeléctrico
PIPES		Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
PM		Peso molecular
PGs		Prostaglandinas
PGD2		Prostaglandina D2
PGE2		Prostaglandina E2
PGH2		Prostaglandina H2
PGJ2		Prostaglandina J2
PEs		Protoescolíces
PVD		Fluoruro de polivinilideno
rEgGST3		EgGST3 recombinante
RNasa		Ribonucleasa
SDS		Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	
tARNs		ARN de transferencia
TCA		Ácido tricloroacético
TMB		3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α		Factor de necrosis tumoral alfa
UTR		Región no traducida

Índice

Agradecimientos	i
Resumen.....	iii
Lista de abreviaturas	iv
Índice	vi
Capítulo 1. Introducción general.....	8
1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> y la echinococosis quística.....	8
1.1.1. Infecciones por <i>Echinococcus granulosus</i>	8
1.1.2. Estructura del quiste hidático	10
1.1.3. Morfología de los protoescolices	14
1.2. Glutación transferasas.....	17
1.2.1. Reacciones catalizadas por las glutación transferasas	18
1.2.2. Estructura y mecanismo catalítico	21
1.2.3. Glutación transferasas de helmintos parásitos	23
1.2.3. Glutación transferasas de <i>E. granulosus</i>	29
1.3. Hipótesis de trabajo	30
1.4. Objetivos general y específico.....	30
1.4.1. Objetivo general.....	30
1.4.2. Objetivos específicos.....	30
Capítulo 2. Materiales y métodos	32
2.1. Materiales	32
2.1.1. Reactivos	32
2.1.2. Material parasitario.....	32
2.1.3. Cepas bacterianas y medios de cultivo	32
2.1.4. Plásmidos	32
2.1.5. Cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR	33
2.2. Métodos	33
2.2.1. Análisis bioinformático de EgGST3.....	33
2.2.2. Técnicas moleculares aplicadas a ácidos nucleicos.....	34
2.2.3. Expresión y purificación de rEgGST2-3.....	38
2.2.4. Preparación y purificación de antisueros policlonales específicos para las EgGSTs .	38
2.2.5. Técnicas bioquímicas aplicadas al estudio de proteínas.....	40
2.2.6. Localización de EgGSTs en protoescolices por inmunofluorescencia	44

2.2.7. Cultivo de protoescolices y obtención de productos de excreción-secreción.....	45
Capítulo 3. Clasificación de EgGST3	46
3.1. Resultados	46
3.1.1. Homología de secuencia	46
3.1.2. Análisis filogenético.....	47
3.1.3. Residuos conservados	49
3.2. Discusión	51
Capítulo 4. Expresión de EgGST3 recombinante	56
4.1. Resultados	56
4.1.1. Expresión de EgGST3 recombinante	56
4.1.2. Cambios en las condiciones de inducción de la expresión	57
4.1.3. Cambio en la cepa hospedadora	58
4.1.4. Cambios en las condiciones de lisis celular	59
4.1.5. Cambio en el vector de expresión.....	61
4.1.6. Renaturalización de la proteína de cuerpos de inclusión	62
4.2.7. Detección de EgGST3 en PEs	62
4.3. Discusión	65
Capítulo 5. Caracterización de una GST parasitaria heterodimérica	75
5.1. Resultados	75
5.1.1. Detección de un heterodímero de GST en protoescolices.....	75
5.1.2. Expresión del heterodímero EgGST2-3 recombinante.....	77
5.1.3. Caracterización bioquímica de rEgGST2-3	78
5.1.4. Presencia de anticuerpos anti-EgGST2-3 en sueros de pacientes.	79
5.2. Discusión	81
Capítulo 6. Localización de las EgGSTs	92
6.1. Resultados	92
6.1.1. Detección de EgGSTs en diferentes materiales parasitarios.....	92
6.1.2. Identificación de EgGSTs en productos de excreción-secreción.....	92
6.1.3. Localización de las EgGSTs en protoescoléx.....	94
6.3. Discusión	111
Capítulo 7. Discusión general	123
Conclusiones	128
Referencias bibliográficas	129
Anexo	140

Capítulo 1. Introducción general

1.1. *Echinococcus granulosus* y la echinococosis quística

1.1.1. Infecciones por *Echinococcus granulosus*

La equinococosis quística es una enfermedad causada por el cestodo parásito *Echinococcus granulosus*. Esta enfermedad está distribuida en todo el mundo, encontrándose regiones endémicas principalmente en el sur de América del Sur, la costa del Mediterráneo, el suroeste de Asia y el norte de África, entre otros (Budke C. M. y col., 2006; WHO, 2014). En América del Sur, el parásito está presente en todos los países, observándose mayor prevalencia en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Perú y Uruguay (WHO, 2011).

El ciclo de vida de *E. granulosus* involucra dos hospederos, uno definitivo y otro intermediario. El parásito adulto se desarrolla en el intestino delgado del hospedero definitivo, que generalmente es el perro (Figura 1). Los huevos producidos por el parásito son liberados en las heces del hospedero definitivo, para luego ser ingeridos por un hospedero intermediario, que puede incluir herbívoros, roedores o humanos, a través del contacto directo con perros infectados, o de agua y alimentos contaminados. 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 pulmones, aunque también pueden establecerse en los riñones, bazo, corazón y huesos. Allí, se desarrollan los denominados quistes hidáticos o metacestodos, estructuras llenas de líquido y rodeadas por una pared, en las que se desarrollarán los protoescólices (PEs). Cuando un perro u otro hospedero definitivo ingiere vísceras de animales infectados conteniendo quistes, se liberan los PEs que se convierten en parásitos adultos, fijándose a la mucosa del intestino y continuando el ciclo (Thompson R. C. A., 1995).

En humanos, las infecciones por *E. granulosus* son causa de morbilidad, e incluso pueden ocasionar la muerte si no se administra un tratamiento adecuado (WHO, 2001). En las primeras etapas de la infección en los hospederos intermediarios, los pequeños quistes aumentan su tamaño sin consecuencias patológicas, por lo que son asintomáticas. Esto dificulta el diagnóstico, el cual requiere tomografías computadas o ultrasonidos, y una confirmación de laboratorio a través de métodos serológicos. 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

1.1.2. Estructura del quiste hidático

El quiste hidático o metacestodo se desarrolla en diversos órganos del hospedero intermediario una vez que este ingirió los huevos y las oncosferas se dispersaron en el interior del organismo. El quiste hidático está delimitado por una pared que se organiza en dos capas, la más externa es la denominada capa laminar y la que da hacia el interior del quiste es la capa germinativa (Figura 2) (Morseth D. J., 1967). El metacestodo está rodeado además por lo que se conoce como capa adventicia, formada por tejido conectivo del hospedero.

A partir de la capa germinativa, por gemación de la misma, se originan las vesículas prolíferas, dentro de las cuales se desarrollarán los PEs, los cuales permanecerán unidos a ella durante su maduración (Galindo M. y col., 2002) (Figura 2). Dichas vesículas se encuentran rodeadas por fluido denominado líquido hidático (LH), que contendrá los productos secretados por las células de la capa germinativa y por los PEs así como diversas moléculas provenientes del hospedero (Monteiro K. M. y col., 2010).

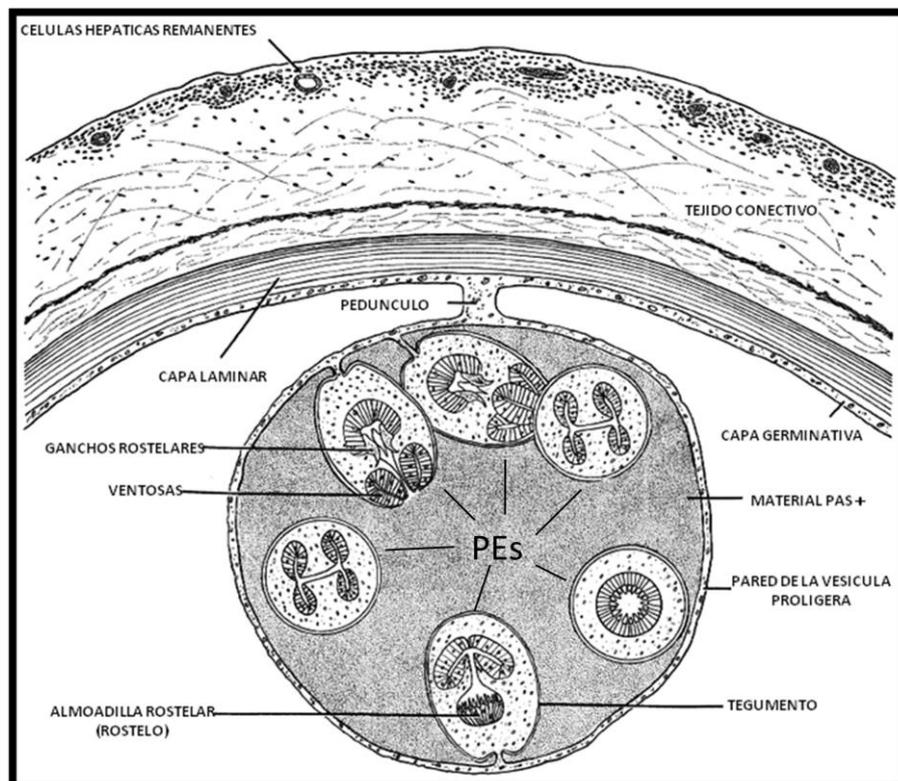


Figura 2. Esquema de la distribución de las diferentes estructuras que conforman el quiste hidático. Tomado y traducido de D. Morseth, 1967.

1.1.2.1. Capa germinativa

La estructura de la capa germinativa es continua con, y por lo tanto muy similar a, la de las vesículas prolíferas y al tegumento de los PEs (Morseth D. J., 1967). Dicha estructura está formada por un conjunto de células derivadas del parásito que dan lugar a un sincitio, así como

células musculares y depósitos de glucógeno. Además, desde la porción basal de la capa germinativa se extienden numerosas proyecciones similares a dedos que penetran en la capa laminar (Morseth D. J., 1967).

Se han realizado estudios a nivel proteómico de la capa germinativa con el objetivo de identificar diferentes proteínas parasitarias que formarían parte de esta estructura (Monteiro K. M. y col., 2010). Se identificaron proteínas involucradas en el metabolismo del parásito (citrato sintasa, fructosa bifosfato aldolasa, lactato deshidrogenasa, etc), así como antígenos parasitarios (AgB, EgTeg, EgTPx, paramiosina) y proteínas que presentan roles en la inmunomodulación de la respuesta del hospedero. Se identificaron además numerosas proteínas del hospedero entre ellas, proteínas del sistema complemento, algunas cadenas de las inmunoglobulinas y proteasas (Monteiro K. M. y col., 2010).

1.1.2.2. Capa laminar

La capa laminar está formada por un conjunto de fibras ricas en carbohidratos, secretadas por las células de la capa germinativa (Diaz A. y col., 2011b). Dichas fibras adoptan diferentes grados de compactación, dando lugar a varias regiones que se observan como láminas concéntricas. Durante el desarrollo del quiste, se van generando nuevas láminas en el interior del mismo, desplazando a las ya existentes hacia el exterior y permitiendo así el crecimiento del metacestodo (Diaz A. y col., 2011b).

Se ha descrito que las fibras que conforman la capa laminar están constituidas por proteínas altamente glicosiladas de la familia de las mucinas, en particular O-glicoproteínas, conteniendo galactosa, N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina (Diaz A. y col., 2011b). Se han identificado además gránulos electrón-densos que estarían compuestos de sales de calcio del inositol hexafosfato, cuya función es aún desconocida. De hecho, no se han detectado depósitos de este compuesto en las especies cercanamente relacionadas *E. multilocularis* y *E. vogeli* (Diaz A. y col., 2011b).

La capa laminar sería importante para mantener la integridad del quiste, permitiendo al mismo tiempo el pasaje de nutrientes y productos de desecho (Diaz A. y col., 2011a). Además, dada su ubicación en la región más externa del quiste, en contacto directo con el hospedero, actuaría protegiendo a las células de la capa germinativa del ataque del sistema inmune de éste. En este sentido, la capa laminar establece diversas interacciones con componentes del sistema inmune del hospedero, lo que le permitiría cumplir un rol regulador de la respuesta generada frente al parásito (Diaz A. y col., 2011a). Por ejemplo, se ha observado que, si bien sobre los gránulos de inositol hexafosfato se pueden depositar los componentes iniciales de la cascada del complemento, dicho sistema no se activa significativamente en la superficie de la

capa laminar. Esto parecería deberse al depósito de factores inhibidores del complemento secretados por el hospedero hacia sus fluidos extracelulares. Estos inhibidores, en particular el factor H, depositados en la capa laminar producen la inactivación del C3b generado para producir iC3b. Así, se impide el depósito de los componentes más tardíos en la activación del complemento, y además el iC3b podría actuar, como se ha observado en otros sistemas, condicionando a las células dendríticas hacia fenotipos tolerogénicos (Díaz A. y col., 2011a).

La capa laminar interactúa también con otros componentes solubles producidos por el hospedero (Díaz A. y col., 2011a). Un ejemplo son los anticuerpos, los cuales podrían ser tanto naturales como generados durante la infección a través de respuestas T-independientes frente a la porción glucídica de las mucinas. De todas formas, no se puede descartar que parte de estos anticuerpos puedan estar unidos a la capa laminar a través de su porción Fc. Asimismo, se ha descrito la interacción de la capa laminar con componentes celulares del sistema inmune, por ejemplo a través de la adhesión de leucocitos a su superficie (Díaz A. y col., 2011a).

Por último, el crecimiento del quiste implica un desprendimiento de material desde las capas más externas de la capa laminar, de forma que sus componentes se liberan y entran en contacto directo con los tejidos del hospedero (Díaz A. y col., 2011a).

1.1.2.3. Líquido hidático

El líquido hidático contiene, como se mencionó al inicio de este capítulo, los productos de excreción-secreción de la capa germinativa del quiste y de los PEs que se desarrollan en el interior de éste, así como abundantes proteínas del hospedero (Monteiro K. M. y col., 2010). Las moléculas producidas y liberadas por el parásito cumplirían importantes roles en diversos mecanismos involucrados en su establecimiento y sobrevivencia en el hospedero, así como en la interacción con el sistema inmune de éste (Virginio V. G. y col., 2012).

El AgB es la principal proteína parasitaria secretada (Siracusano A. y col., 2012). Es una lipoproteína multimérica de entre 120 y 160kDa, cuyas funciones no se conocen completamente hasta el momento, aunque se ha propuesto su actuación en diferentes mecanismos de modulación de la respuesta inmune del hospedero, así como en la unión de lípidos y en la inhibición de proteasas (Monteiro K. M. y col., 2012). De todas formas, se han descrito diferencias en los patrones de expresión de las subunidades que componen el AgB entre las distintas cepas así como también a lo largo del ciclo de vida. Dichas subunidades difieren en sus propiedades físicas e inmunológicas así como en las relacionadas a la unión de los lípidos. El AgB estaría codificado por una familia multigénica, y el cambio de expresión de

una subunidad por otra podría ser uno de los mecanismos utilizados por el parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero (Siracusano A. y col., 2012).

Por otra parte, el Ag5 es una glicoproteína parasitaria de aproximadamente 400kDa presente en altas concentraciones en el líquido hidático (Siracusano A. y col., 2012). El análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras revela la presencia de dos subunidades de 55 y 65kDa, y en condiciones reductoras se observan dos subunidades de 38-39 y 22-24 kDa. Su función es casi completamente desconocida, pero los niveles en que se produce en el parásito sugieren que tendría importantes roles en la infección.

En estudios realizados mediante estrategias proteómicas se han identificado además en líquido hidático otras proteínas relacionadas con diferentes procesos celulares (Monteiro K. M. y col., 2010; Aziz A. y col., 2011). En este sentido, se detectaron proteínas del citoesqueleto como la actina, chaperonas, histonas, enzimas antioxidantes como la tiorredoxina peroxidasa, proteínas involucradas en el metabolismo, como la fructosa-bifosfato aldolasa, enolasa, entre otras. Se encontraron además algunas diferencias en las proteínas detectadas y en la abundancia de las mismas en líquido hidático proveniente de quistes de diferentes hospederos.

Estudiar la composición del líquido hidático resulta difícil por la complejidad de las muestras, en particular, porque presentan altas concentraciones de moléculas del hospedero, obstaculizando la detección de los antígenos parasitarios minoritarios (Monteiro K. M. y col., 2010). Es por esto que se han estudiado las diferentes proteínas presentes en productos de excreción-secreción de PEs *in vitro*, identificándose nuevas proteínas no detectadas hasta el momento en líquido hidático (Virginio V. G. y col., 2012). Entre ellas se encuentran algunas enzimas involucradas en rutas metabólicas del parásito como la fosfoglicerato quinasa y la fosfoglicerato mutasa, antígenos parasitarios como P-29, EG19 y EgCaBP II y la proteasa calpaína (Virginio V. G. y col., 2012).

Entre las numerosas proteínas del hospedero presentes en el líquido hidático, se han encontrado principalmente albúmina, transferrina y hemoglobina, así como inmunoglobulinas y proteínas del sistema del complemento, entre otras (Aziz A. y col., 2011). Se ha propuesto que el parásito de alguna manera adsorbe proteínas de su hospedero con el fin de utilizarlas como nutrientes, para enmascarar sus antígenos y/o inhibir mecanismos efectores del sistema inmune del hospedero (Aziz A. y col., 2011).

Un aspecto importante que vale la pena mencionar, es que los componentes parasitarios presentes en el líquido hidático, y en particular los antígenos B y 5, son los más utilizados para el diagnóstico de echinococcosis quística (Siracusano A. y col., 2012). En este sentido, se han desarrollado técnicas para la detección tanto de anticuerpos específicos contra

ellos, como de antígenos presentes en el suero de los pacientes (Zhang W. y col., 2012). Así, se han optimizado técnicas de inmunolectroforesis, ELISA y *Western-blot* para detectar anticuerpos de isotipo IgG específicos, por ejemplo, para el líquido hidático total o para el AgB nativo o sus subunidades recombinantes. Asimismo, mediante la metodología de ELISA sándwich se puede revelar la presencia de ciertos antígenos parasitarios en sueros de pacientes (Zhang W. y col., 2012). Por otra parte, se ha observado que la detección simultánea por técnicas de ELISA de estos antígenos parasitarios y de los anticuerpos específicos para los mismos puede mejorar la sensibilidad para el diagnóstico de echinococcosis quística.

1.1.3. Morfología de los protoescolices

Como se mencionó anteriormente, *E. granulosus* presenta un ciclo de vida complejo, y para completarlo, su organismo dispone de diversas estructuras con características particulares que posibilitarán el desarrollo y la supervivencia de los diferentes estadios del parásito. En este sentido, el PE presenta una estructura denominada escólex en la que se encuentran los diferentes órganos que el parásito utilizará para fijarse a las mucosas del intestino de su hospedero, es decir, el rostelo donde se ubican los ganchos, y las ventosas. Abarca además la agrupación ganglionar principal del sistema nervioso del parásito, de la cual parten nervios motores hacia los músculos de los diferentes órganos de fijación. En las primeras etapas de su desarrollo, el PE se encuentra en un estado invaginado en el que el escólex se localiza en el interior del organismo. Los PEs invaginados presentan una forma esférica u ovalada, y se encuentran delimitados por una delgada lámina que correspondería al tegumento (Figura 2). En algunos de ellos se puede observar además una prolongación de dicho tegumento denominada pedúnculo, que lo mantiene unido a la membrana de las vesículas prolíferas (Galindo M. y col., 2002). Cuando el PE es ingerido por el hospedero definitivo se dará una maduración hacia la forma adulta del parásito, que implica, entre otras cosas, un proceso de evaginación, en el que el escólex pasa a estar expuesto al exterior del parásito. Este proceso ha sido estudiado con más detalle en la especie cercanamente relacionada *E. multilocularis* (Marchiondo A. A. y Andersen F. L., 1984). Cuando el parásito se encuentra invaginado presenta un canal que desemboca en un orificio en la región anterior del parásito, por el que el escólex saldrá luego al exterior. En esta etapa, los ganchos se encuentran dispuestos de forma que las cuchillas se orientan hacia la región anterior, mientras que las estructuras a través de las cuales se anclan al rostelo, las asas y las guardas, se encuentran dirigidas hacia la región posterior y lateral respectivamente. El proceso de evaginación comienza con un ensanchamiento lateral del orificio y del canal de salida para permitir el pasaje en primer lugar de las ventosas y luego el rostelo con los ganchos. De esta

forma, el PE evaginado presenta en su región anterior el escólex y hacia la región posterior se encuentran el cuello y el cuerpo (Figura 3). Todo el organismo en su región más externa, exhibe una cubierta protectora o tegumento que le permite además, tomar diversos nutrientes de su hospedero. Esto resulta particularmente importante dada la carencia de tubo digestivo de este parásito. El tegumento se organiza en forma de sincicio, generado por extensiones citoplasmáticas de células cuya región perinuclear se ubica en el parénquima. A lo largo de todo el organismo el tegumento presenta proyecciones denominadas microtriquias, que se encuentran más desarrolladas en la región del escólex, y que aumentan el área superficial a través de la cual se absorben los nutrientes. La lámina basal localizada por debajo del tegumento actuaría dando soporte a la estructura del mismo.

En el escólex se encuentran primeramente los ganchos, que durante la evaginación sufren una reorganización de forma que se disponen en dos coronas, una superior y otra inferior. Se ha propuesto que los ganchos de cada corona cumplirían funciones ligeramente diferentes, considerando sus diferentes morfologías y tamaños (Antoniou M. y Tselentis Y., 1993). En este sentido, se ha descrito que la corona superior presenta ganchos más largos y con mayor capacidad de movimiento mientras que los de la corona inferior son más cortos y están más firmemente anclados al rostelo. En conjunto, los ganchos le permitirían a los PEs desplazarse entre las vellosidades del intestino del hospedero definitivo en busca del mejor lugar para anclarse. Una vez que se desarrolló el parásito adulto, los ganchos lo mantendrán fijo a las mucosas del intestino (Antoniou M. y Tselentis Y., 1993).

Como se mencionó anteriormente, los ganchos se encuentran anclados al rostelo. Se ha propuesto que la región inmediatamente por debajo del tegumento del rostelo estaría relacionada con mecanismos de secreción, aunque no se han detectado hasta el momento células o vesículas secretoras que permitan confirmar esta hipótesis (Galindo M. y col., 2008). Si bien en esta región no se distinguen fibras musculares, las mismas comienzan a aparecer a medida que nos desplazamos hacia la región posterior del rostelo. Dichas fibras contribuirían a los movimientos de extensión-retracción de los ganchos que permiten la fijación del parásito. La región del rostelo que se encuentra entre las ventosas, es muy rica en células y presenta numerosas fibras musculares tanto longitudinales como transversales en las cercanías de los ganchos y del tegumento (Berenguer J. G., 2007).

Avanzando en el escólex encontramos luego las ventosas (Figura 3). Estas estructuras contribuirán posteriormente a la fijación del parásito al intestino mediante succión. Para esto, disponen de un conjunto de fibras musculares tanto longitudinales como transversales (radiales y circulares) ancladas a la lámina basal que permiten, mediante su contracción y relajación, la generación de vacío (Berenguer J. G., 2007).

Por otra parte, el cuerpo representa aproximadamente el 50-60% de la longitud total del organismo (Figura 3) y está formado por diferentes tipos celulares que estarían asociados a diferentes funciones. En este sentido, se pueden identificar en el parénquima ductos colectores con sus células flamígeras asociadas, lo que constituye el sistema excretor u osmorregulador del parásito (Morseth D. J., 1967), así como numerosos corpúsculos calcáreos y las células que los originan (Galindo M. y col., 2008). Estos corpúsculos constituyen estructuras mineralizadas que han sido identificadas en diferentes cestodos, y se les han asignado diversas funciones (Vargas-Parada L. y Laclette J. P., 1999). Podrían estar implicados en la deposición de los excesos de calcio, protegiendo así al organismo de la calcificación. También se los han propuesto como reservorios de fosfato o del carbonato necesario para neutralizar los ácidos generados por el metabolismo parasitario o la acidez del estómago del hospedero (Vargas-Parada L. y Laclette J. P., 1999).

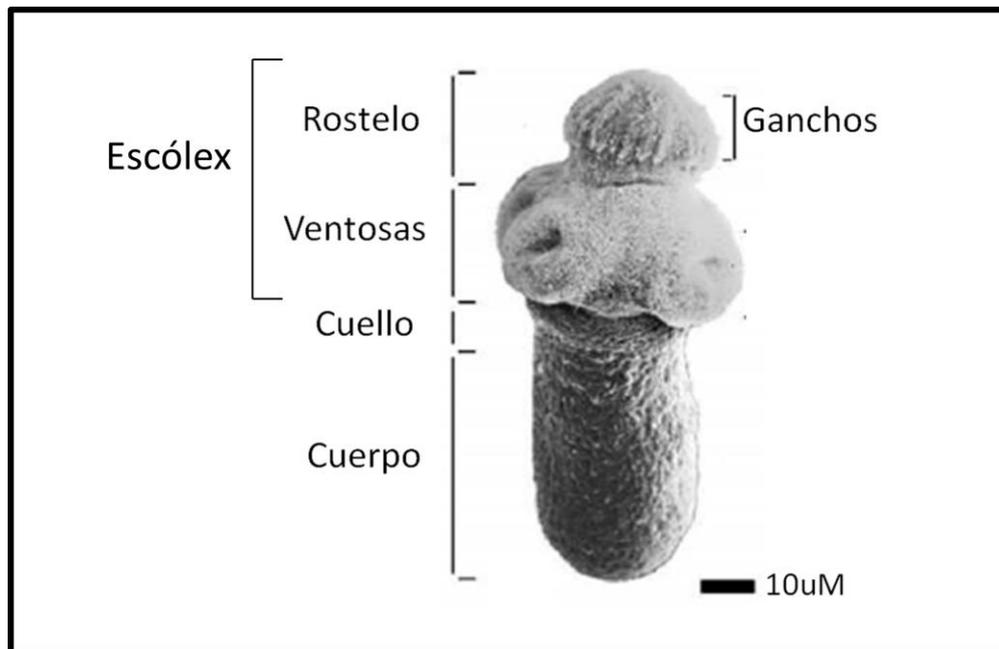


Figura 3. Estructura del PE de *E. granulosus* en estado evaginado. Se muestra un PE visualizado por microscopía electrónica de barrido. Se identifican las diferentes regiones que constituyen la estructura del parásito. Imagen tomada y modificada de Galindo y cols. (2008).

El cuerpo está conectado al escólex a través del cuello (Figura 3). Este constituye una articulación que permite al parásito realizar movimientos ascendentes y descendentes, pendulares y de rotación del cuerpo respecto al escólex, lo cuales serían importantes para la fijación del parásito a las mucosas del intestino de su hospedador (Galindo M. y col., 2008).

El parásito presenta además un importante sistema muscular responsable de la gran motilidad que presentan los cestodos en los diferentes estadios de su ciclo. El mismo está

constituido por una capa de fibras musculares subtegumentaria, y una capa doble de fibras transversales y longitudinales que divide el parénquima en dos regiones, una cortical y una medular. Se observan además fibras más débiles que conectan las capas mencionadas anteriormente.

El PE evaginado dentro del intestino del hospedero definitivo, continuará su maduración hacia el parásito adulto, en el que el cuerpo pasa a estar dividido en segmentos denominados proglótides. En *E. granulosus* adulto se observan tres proglótides, una inmadura contigua al cuello, una sexualmente madura en el que ovario y testículos están ya bien desarrollados, y finalmente, una grávida conteniendo los huevos. La última proglótide, al desprenderse del parásito, saldrá con las heces del hospedero definitivo, de forma que los huevos son liberados y pueden ser ingeridos por un hospedero intermediario, en el que se desarrollarán los quistes hidáticos, completando así el ciclo.

De esta forma, *E. granulosus* y los cestodos parásitos en general presentan ciertas características morfológicas que les permiten llevar a cabo las diferentes funciones necesarias para su ingreso, establecimiento y sobrevivencia en el hospedero.

1.2. Glutación transferasas

Las enzimas glutatión transferasas (GSTs) (E.C. 2.5.1.18) son una superfamilia de proteínas multifuncionales con roles fundamentales en la detoxificación celular de un amplio rango de componentes exógenos y endógenos. Las GSTs catalizan la conjugación de un nucleófilo celular, el glutatión (γ -glutamil-cisteinil-glicina) (GSH), a una amplia variedad de compuestos electrófilos hidrofóbicos, en general promoviendo su inactivación, degradación y/o excreción. Es decir, una vez conjugadas al GSH, las moléculas lipofílicas reactivas disminuyen su reactividad y se convierten en sustancias más polares, facilitando su eliminación (Hayes y col., 2005).

Las GSTs pueden dividirse en al menos cuatro familias en función de sus relaciones filogenéticas: las GSTs citosólicas, las mitocondriales (también denominadas clase kappa), las microsomales (“Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism”, MAPEG) y la familia de las proteínas bacterianas de resistencia a fosfomicina (Board P. G. y Menon D., 2013). Las cuatro familias comparten la capacidad de conjugar glutatión a diferentes sustratos, pero presentan importantes diferencias, por ejemplo, a nivel de su estructura, distribución y localización. Teniendo en cuenta que este trabajo se centra en las glutatión transferasas citosólicas de *E. granulosus*, continuaremos la descripción exclusivamente de esta familia.

En la actualidad hay numerosos estudios acerca de las GSTs citosólicas, los cuales comenzaron originariamente con las enzimas de mamíferos para luego extenderse a otros organismos. Estas proteínas están ampliamente distribuidas y se considera que están presentes en todos los organismos aeróbicos (da Fonseca R. R. y col., 2010). Existen varias clases de GSTs citosólicas siendo las más extendidas la Alfa, Mu, Pi, Sigma, Omega, Zeta y Theta. Estas siete clases están presentes en mamíferos, aunque no todas ellas han sido detectadas en otros organismos. Por ejemplo, en los insectos se han identificado GSTs de clase Sigma, Theta, Zeta y Omega, mientras que en aves la única clase que no está representada es la Pi (da Fonseca R. R. y col., 2010). En otros organismos se encuentran además de clase Beta, Delta, Epsilon, Lambda, Phi, Tau y "U". Por otra parte, un mismo organismo puede expresar varias GSTs de diferentes clases, e incluso varias isoformas por clase. Así, se identificaron GSTs humanas de las siete clases mencionadas, encontrándose más de una isoforma de las clases Mu, Alfa, Omega y Theta (Hayes J. D. y col., 2005). Además, algunas de las isoformas de clase Mu y Alfa pueden formar enzimas heterodiméricas restringidas a una misma clase, aumentando así la diversidad de GSTs producidas.

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 J. D. y col., 2005).

1.2.1. Reacciones catalizadas por las glutatión transferasas

Como ya se ha comentado, las GSTs catalizan la conjugación de glutatión a diferentes compuestos. Éstos se caracterizan por presentar un centro electrofílico, por lo que existe una gran variedad de posibles sustratos para estas enzimas (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). Entre los sustratos descritos para las GSTs podemos encontrar productos generados como consecuencia del estrés oxidativo, así como xenobióticos, por ejemplo, compuestos carcinógenos, pesticidas, drogas utilizadas en tratamientos médicos, etc. (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). Uno de estos sustratos, comúnmente utilizado para la determinación de la actividad glutatión transferasa, es el 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) (Figura 4). En general, los productos de las reacciones de conjugación de glutatión son menos tóxicos que los compuestos originales, y al ser más polares, se pueden eliminar más fácilmente. Asimismo, la incorporación de glutatión a ciertos compuestos puede dar lugar a moléculas más nocivas para las células (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995).

Por otra parte, algunas GSTs presentan actividad peroxidasa dependiente de GSH (Hayes J. D. y col., 2005) (Figura 5). Esta actividad permite la inactivación de peróxidos lipídicos que pueden ser generados por la exposición celular a especies oxidantes. A su vez, estos peróxidos

pueden dar lugar a otras moléculas altamente reactivas, productos secundarios de la peroxidación de lípidos de membrana, que pueden ser inactivadas por la actividad glutatión transferasa de las GSTs.

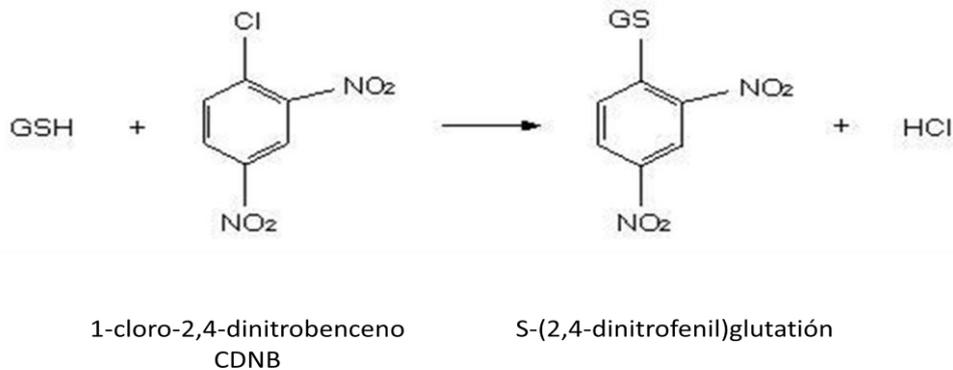


Figura 4. Reacción de conjugación de glutatión al sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) catalizada por las GSTs.

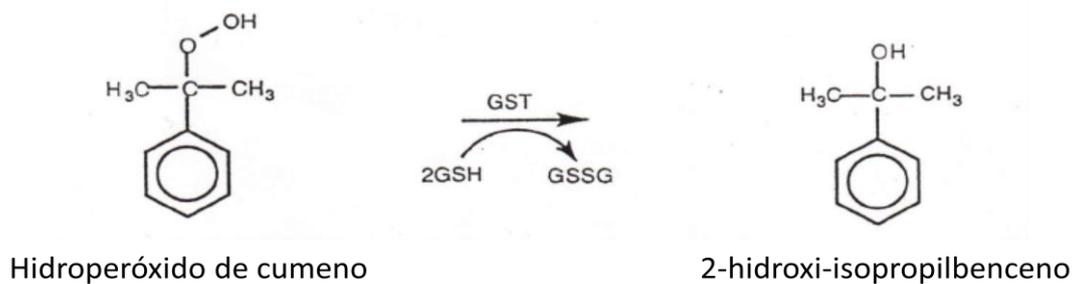


Figura 5. Reacción de reducción de un peróxido orgánico (hidroperóxido de cumeno) catalizada por GSTs.

Se han descrito además otras funciones de las GSTs relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo. En particular, se han identificado GSTs que podrían estar involucradas en la glutatiónilación reversible de proteínas, es decir, en la formación de disulfuros mixtos entre el glutatión y residuos de cisteína de ciertas proteínas (Board P. G. y Menon D., 2013). 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 D. M., 2007). Asimismo, la incorporación de glutatión podría producir cambios estructurales en la proteína, que podrían ser importantes tanto para la regulación de su actividad como para su localización subcelular. En este sentido, se ha descrito que una GST de clase Pi humana es capaz de incorporar glutatión, entre otras, a una proteína de la familia de las peroxirredoxinas, activándola (Townsend D. M. y col., 2009). Ésta participará así en la regulación de los niveles

una inhibición de la actividad catalítica, por lo que podría funcionar como un mecanismo de regulación de la actividad de las GSTs.

Por otra parte, se ha descrito que ciertas GSTs podrían regular diferentes vías de señalización celular, a través de la interacción con quinasas (Board P. G. y Menon D., 2013). En particular, se ha propuesto que, mediante esta interacción, la GSTP podría regular señales de supervivencia celular o apoptosis frente a determinados estímulos. Además, se ha relacionado esta actividad con la resistencia al tratamiento con drogas de ciertos tumores que sobreexpresan la GSTP. Asimismo, se ha descrito también la participación de GSTs de clase Mu y Alfa en procesos regulatorios de este tipo (Board P. G. y Menon D., 2013).

Finalmente, algunas GSTs estarían involucradas en la formación y regulación de canales iónicos (Board P. G. y Menon D., 2013). Se ha descrito que ciertas enzimas humanas de clase Omega, Mu y Alfa regularían, por un mecanismo aún desconocido, la actividad de receptores de rionodina (RyR), que constituyen canales de calcio que dependen de la unión de determinados ligandos para su activación. Estos canales participan en la regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante la liberación de éste frente a determinados estímulos. Por otra parte, las proteínas denominadas CLIC, Canales Intracelulares de Cloruro, son GSTs de clase Omega. Los roles de estas proteínas no se conocen en profundidad, pero se ha observado que se pueden introducir en la membrana formando canales iónicos (Board P. G. y Menon D., 2013).

1.2.2. Estructura y mecanismo catalítico

La estructura tridimensional de las GSTs citosólicas parece estar conservada entre todas las proteínas de la familia (Hayes J. D. y col., 2005). Éstas son enzimas diméricas, formando homo- o heterodímeros con subunidades de la misma clase. Cada subunidad puede ser dividida en dos dominios. El dominio N-terminal, compuesto tanto por hélices α como por hebras β ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), presenta similitud con el dominio tiorredoxina, y contiene el sitio de unión para el glutatión (sitio G). Mientras tanto, el dominio C-terminal, menos conservado, está formado exclusivamente por hélices α y contiene el sitio de unión para el sustrato hidrofóbico (sitio H). La mayor variabilidad en este dominio con respecto al N-terminal se ha relacionado con la amplia variedad de sustratos que las GSTs citosólicas pueden utilizar así como con las diferencias encontradas en la especificidad de sustratos entre las clases (Frova C., 2006).

A pesar de que todas las GSTs citosólicas comparten un plegamiento y una estructura tridimensional similar, existen diferencias entre las clases que determinarán características particulares a nivel de la catálisis para cada una de ellas. En particular, el tipo de residuos que participan en la unión del glutatión y su localización en la proteína plegada afectará el

mecanismo catalítico de estas enzimas. Este hecho ha llevado a proponer una nueva clasificación de las GSTs citosólicas en función del residuo catalítico que presenten (Atkinson H. J. y Babbitt P. C., 2009). La misma plantea que las GSTs de clases Alfa, Mu, Pi y Sigma presentan más similitudes entre ellas que con el resto de las GSTs, por lo que podrían agruparse, dando lugar a lo que denominan las Y-GSTs. Este término deriva de que todas las GSTs que componen el grupo requieren la interacción de un residuo conservado de tirosina con el glutatión en su mecanismo catalítico (Atkinson H. J. y Babbitt P. C., 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, en lugar de una tirosina, una serina (clases Theta y Zeta) o cisteína (clase Omega) (Atkinson H. J. y Babbitt P. C., 2009).

Las Y-GSTs presentan en el final de la primera hebra β un residuo de tirosina cuyo grupo hidroxilo actuaría como dador de enlace de hidrógeno al átomo de azufre del GSH, disminuyendo su pKa de forma que el tiolato esté disponible al pH de la célula. Éste será responsable de realizar un ataque nucleofílico sobre el sustrato electrofílico (Frova C., 2006). Se han estudiado los residuos involucrados en la catálisis en algunas clases de GSTs. En este sentido, se ha descrito que en las GSTs de clase Sigma serían importantes, además de la tirosina (posición n), los residuos de ácido glutámico ($n + 8$), arginina ($n + 11$) y ácido aspártico ($n + 22$) (Angelucci F. y col., 2005). Estos tres residuos formarían una red de interacciones que permitirían la correcta colocación de la arginina en dirección perpendicular al anillo aromático de la tirosina catalítica.

En el caso de las S/C-GSTs, existen diferencias según sea la serina o la cisteína el residuo catalítico. La serina presente en las GSTs de clase Theta cumpliría un rol similar al de la tirosina de las Y-GSTs (Frova C., 2006). Mientras tanto, la cisteína de la clase Omega formaría un disulfuro mixto con el glutatión, lo que posibilitaría su transferencia en una reacción similar a la catalizada por las glutarredoxinas. Se ha obtenido la estructura cristalográfica de una GST de clase Omega humana, HsGSTO1, lo que ha permitido identificar algunos residuos que participarían en la unión del glutatión y que serían importantes para la catálisis (Board P. G. y col., 2000). Además de la cisteína se encontraron en HsGSTO1 una lisina (K59), una valina (V72), un glutamato (E85) y una serina (S86) que estarían en contacto con el glutatión. Estos residuos se encuentran conservados en numerosas GSTs de esta clase (Brock J. y col., 2013), dando lugar al consenso C (n), K ($n + 27$), V ($n + 40$), E ($n + 53$) y S ($n + 54$).

Se identificaron además, otros residuos que forman parte del sitio G de HsGSTO1, aunque no estarían en contacto directo con el GSH. En este sentido, se ha descrito que un residuo de prolina en la posición adyacente a la cisteína catalítica ($n + 1$) es necesaria para el correcto posicionamiento del glutatión en el sitio activo (Kortemme T. y Creighton T. E., 1995).

Los residuos F34, R37, L56, L71 y P73 también forman parte del sitio G, y se encuentran conservados en las GSTs de clase Omega, o son sustituidos conservativamente (Brock J. y col., 2013). Se ha propuesto que la F34 podría participar en la unión mediante enlace de hidrógeno de una segunda molécula de GSH, que realizaría un ataque nucleofílico sobre el disulfuro mixto para regenerar la enzima (Brock J. y col., 2013). Este mecanismo sería importante para la actividad tioltransferasa de la enzima, pero no se tiene tanta información acerca del funcionamiento de HsGSTO1 como glutatión transferasa. En particular, se desconocen los residuos que estarían involucrados en la estabilización del tiolato del glutatión para su transferencia al sustrato electrofílico (Board P. G. y col., 2000).

Por otra parte, no hay información acerca de los residuos aminoacídicos de HsGSTO1 involucrados en la unión del segundo sustrato. Sin embargo, se ha descrito en la estructura de la proteína una cavidad que constituiría el sitio H (Board P. G. y col., 2000). La misma está próxima al sitio G, y está formada tanto por residuos del dominio N-terminal como del C-terminal.

1.2.3. Glutatión transferasas de helmintos parásitos

Históricamente se ha planteado que los helmintos presentan escasos sistemas detoxificantes (Precious W. Y. y Barrett J., 1989). Entre estos sistemas, uno de los más relevantes es el de los citocromos P450, considerados ausentes en los helmintos por muchos años. Sin embargo, más recientemente se han encontrado evidencias de que estos organismos podrían expresar enzimas relacionadas con los citocromos P450 (Saeed H. M. y col., 2002; Lindblom T. H. y Dodd A. K., 2006). Además, se han detectado diversos sistemas enzimáticos que podrían contribuir a la detoxificación de especies oxidantes. Así, se identificaron en el transcriptoma de *E. granulosus* peroxirredoxinas, glutatión peroxidases, tioredoxinas, entre otros sistemas antioxidantes (Parkinson J. y col., 2012).

En este contexto, se ha propuesto que las GSTs serían particularmente importantes para los helmintos parásitos ya que constituirían uno de los principales sistemas capaces de inactivar compuestos potencialmente nocivos (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008) (Figura 7). Dichos compuestos incluyen no sólo aquellos generados como consecuencia del propio metabolismo del parásito sino también los producidos por las células del sistema inmune del hospedero. Además, se ha relacionado a las GSTs parasitarias con la producción de compuestos inmunomoduladores como las prostaglandinas, lo que le permitiría a los parásitos influir sobre la respuesta inmune del hospedero para así poder establecerse y sobrevivir en él (Sommer A. y col., 2003). Asimismo, se ha planteado que podrían estar vinculadas con la

inactivación de drogas antihelmínticas, lo que podría repercutir en la resistencia de los parásitos a dichos compuestos (Arbildi P., La Rocca S., Fernández, V., 2011).

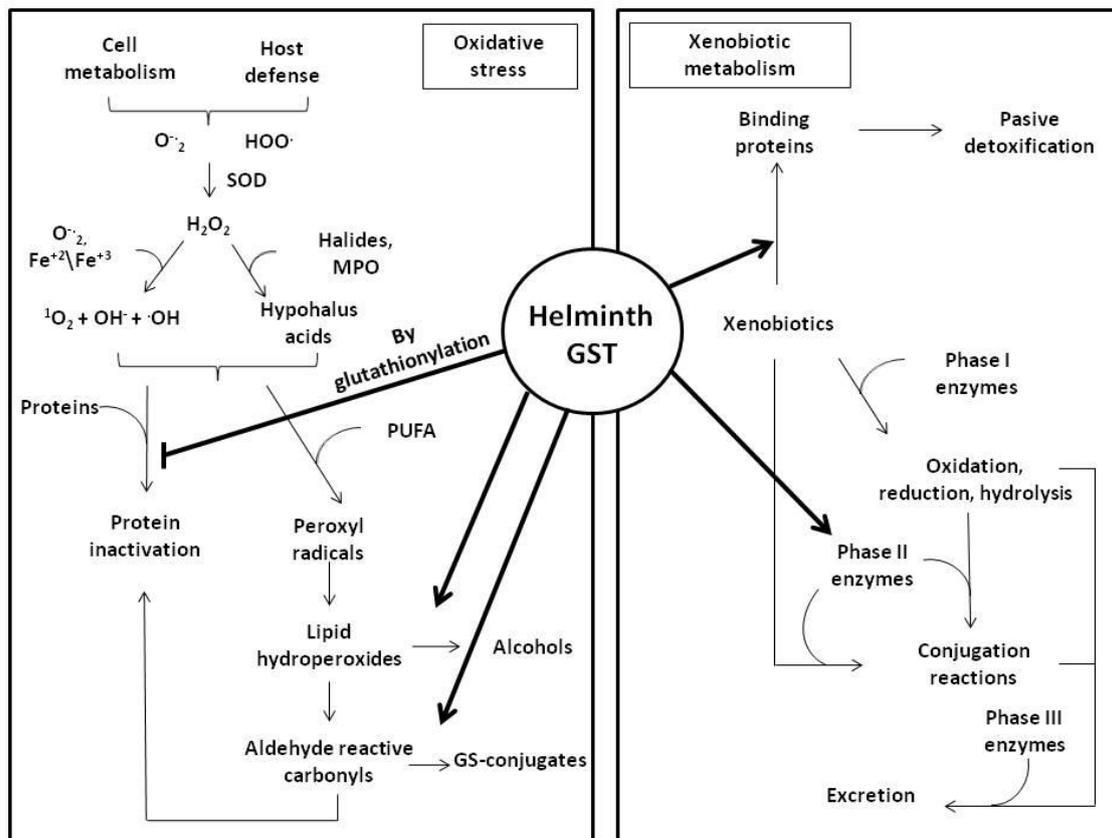


Figura 7. Mecanismos de detoxificación en los que participan las glutatión transferasas parasitarias. Tomado de Arbildi y cols. (2011).

1.2.3.1. Funciones detoxificantes de las GSTs

Los compuestos oxidantes a los que están expuestos los parásitos pueden iniciar un proceso de peroxidación de los lípidos de membrana, en el que se producen moléculas altamente reactivas tales como hidroperóxidos de fosfolípidos o ácidos grasos. Además, dichos productos primarios pueden romperse para dar nuevas moléculas tóxicas, entre ellas los 2-alquenal y los 4-hidroxi-2-alquenal, como el *trans*-2-nonenal, el *trans-trans*-2,4-decadienal y el 4-hidroxi-2-nonenal. Este último es particularmente relevante ya que participa en mecanismos de señalización celular, principalmente vinculados a la proliferación y diferenciación celular, así como a la apoptosis (Awasthi Y. C. y col., 2008). Todos estos compuestos pueden generar un daño en las células del parásito, y dado que los helmintos poseen escasos sistemas de detoxificación (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008), las GSTs adquieren gran relevancia en la inactivación de dichas moléculas. En mamíferos, las GSTs de clase Alfa participarían en la

detoxificación de los productos primarios y secundarios de la peroxidación lipídica, y en la regulación de los niveles de 4-hidroxi-2-nonenal (Hayes J. D. y col., 2005). Mientras la actividad peroxidasa dependiente de glutatión permitiría la inactivación de los peróxidos orgánicos, los productos secundarios serían conjugados a glutatión a través de la actividad glutatión transferasa de las GSTs (Sharma R. y col., 2004) (Figura 7). A pesar de que no se han detectado GSTs de clase Alfa en helmintos, se han identificado GSTs de otras clases que presentan algunas de sus actividades, y que por lo tanto podrían cumplir esta función detoxificante. En este sentido, se han identificado GSTs parasitarias capaces de conjugarse a GSH a productos secundarios de la peroxidación de lípidos, tanto en plathelminths, entre ellos *Echinococcus multilocularis* y *E. granulosus*, *Taenia solium* y *Moniezia expansa*, como en los nematodos *Onchocerca volvulus* y *Ascaris suum* (Brophy P. M. y col., 1989; Liebau E. y col., 1996a; Liebau E. y col., 1996b; Liebau E. y col., 1997; Vibanco-Perez N. y col., 2002; Harispe L. y col., 2010).

Por otra parte, las GSTs pueden presentar otras actividades que les permiten proteger a las células en condiciones de estrés oxidativo. Las GSTs de clase Omega podrían participar en la glutationilación de proteínas a través de su actividad tioltransferasa (Whitbread A. K. y col., 2005) (Figura 7). Se han identificado varias GSTs de clase Omega en helmintos parásitos como *O. volvulus* (OvGST3), *Fasciola hepatica* y *Schistosoma mansoni* (SmGSTO) (Girardini J. y col., 2002; Chemale G. y col., 2006; Liebau E. y col., 2008). Se ha sugerido que tanto OvGST3 como SmGSTO mediante su actividad tioltransferasa, podrían estar involucradas en la glutationilación/deglutinationilación de proteínas (Liebau E. y col., 2008; Girardini J. y col., 2002). Es importante mencionar además que la expresión de algunas GSTs parasitarias es inducida en presencia de compuestos oxidantes. Por ejemplo, los niveles de expresión basal de OvGST3 son bajos en comparación con las otras GSTs de *O. volvulus* (Liebau E. y col., 2000). Sin embargo, la exposición del parásito a condiciones de estrés oxidativo aumenta la expresión de OvGST3 pero no de OvGST1 y 2. De esta forma, las GSTs de clase Omega contribuirían también a la respuesta del parásito frente al estrés oxidativo y nitrosativo inducido por el sistema inmune del hospedero.

Dada la actividad de las GSTs frente a diferentes compuestos xenobióticos, en los parásitos podrían estar involucradas en la detoxificación de drogas antihelmínticas (Figura 7). Dicha función podría pensarse que se debe a la conjugación de la droga al GSH, aunque hasta el momento esta actividad no ha sido descrita (Cvilink V. y col., 2009). De todas formas, esta posibilidad no puede descartarse. Se ha reportado que las GSTs de *S. mansoni* participan en la inactivación del diclorvos, una droga utilizada en el tratamiento de las infecciones por este parásito (O'Leary K. A. y Tracy J. W., 1991). Este compuesto es demetilado en una reacción que

requiere actividad glutatión transferasa en la que se forma S-metilglutatión, resultando en la pérdida de actividad antihelmíntica del diclorvos (O'Leary K. A. y Tracy J. W., 1991).

Por otra parte, los antihelmínticos podrían ser inactivados por la unión simple a las GSTs parasitarias, sin ser sustratos de alguna actividad enzimática. Se ha descrito la interacción de estas enzimas con diferentes drogas antihelmínticas (Brophy P. M. y col., 1989; McTigue M. A. y col., 1995). Por ejemplo, una GST de *Schistosoma japonicum* puede unir el praziquantel, lo que provoca además la inhibición de dicha enzima (McTigue M. A. y col., 1995). Este mecanismo de detoxificación “pasiva” también funcionaría para la inactivación de compuestos generados *in vivo* durante la infección debido al metabolismo del parásito (Arbildi P., La Rocca S., Fernández, V., 2011). Por ejemplo, las formas adultas de los nematodos *Ancylostoma caninum* y *Haemonchus contortus* se encuentran en sangre, en donde lisan los glóbulos rojos y degradan la hemoglobina (van Rossum A. J. y col., 2004; Zhan B. y col., 2005). Esto le permite al parásito incorporar grupos hemo, que no puede sintetizar. Sin embargo, estos grupos pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS), potencialmente tóxicas. Se ha descrito una clase particular de GSTs presentes en los nematodos (clase Nu) es capaz de unir los grupos hemo con alta afinidad, inhibiendo su toxicidad y facilitando su transporte (van Rossum A. J. y col., 2004; Zhan B. y col., 2005). Esta función sería particularmente importante ya que no se han identificado proteínas transportadoras de grupos hemo en helmintos (Perally S. y col., 2008).

Además, las GSTs de helmintos parásitos podrían unir otros compuestos producidos por el hospedero, por ejemplo, hormonas. En este sentido, se ha descrito la unión de la testosterona a una GST de clase Sigma de *Schistosoma haematobium*, Sh28GST (Remoue F. y col., 2002). Se han observado diferencias en la prevalencia y en la intensidad de las infecciones por parásitos entre machos y hembras de diferentes especies de hospederos (Klein S. L., 2004). Las mismas han sido relacionadas en parte con las diferentes hormonas sexuales predominantes en cada uno de ellos, y se ha propuesto la participación de las GSTs parasitarias, a través de la unión de las hormonas, en diversos mecanismos que darían lugar a dichas diferencias (Remoue F. y col., 2002). De esta forma, las GSTs podrían estar involucradas, a través de la unión de las hormonas sexuales, en mecanismos que hagan al parásito más vulnerable o más resistente frente a la respuesta inmune del hospedero.

1.2.3.2. Roles de las GSTs en la inmunomodulación

A lo largo de la evolución, los parásitos han adquirido diversos mecanismos que les permiten sobrevivir y reproducirse en su hospedero para así continuar su ciclo de vida. En este contexto, han desarrollado estrategias para alterar de diferentes formas la respuesta inmune del hospedero (Siracusano A. y col., 2008). Así, los parásitos producen un conjunto de

proteínas de superficie o secretadas, que cumplirían diversas funciones en la interface hospedero-parásito. Entre estas proteínas se encontrarían las GSTs parasitarias (Arbildi P., La Rocca S., Fernández, V., 2011).

Se ha descrito la interacción de algunas GSTs de helmintos con células del sistema inmune del hospedero. En este sentido, se observó la activación de células dendríticas por una GST de clase Sigma de *F. hepatica*, FhGST-S1 (Dowling D. J. y col., 2010). Las células dendríticas así activadas no estimulan el desarrollo de una respuesta Th2, característica de las infecciones por helmintos parásitos, pero sí disminuyen el desarrollo de una respuesta Th17, promotora de severas inflamaciones. Si bien no se ha confirmado si la actividad enzimática de FhGST-S1 es importante para la activación de las células dendríticas, se ha observado que otra GST del mismo parásito pero de clase Mu, no produce este fenotipo de células dendríticas (Dowling D. J. y col., 2010). Esto hace pensar que alguna actividad de FhGST-S1 es necesaria para causar este efecto. Esta enzima presenta actividad glutatión transferasa frente al sustrato universal CDNB y al ácido etacrínico, así como frente a productos secundarios de la peroxidación lipídica, y tiene actividad peroxidasa frente a peróxidos lipídicos (LaCourse E. J. y col., 2012). Además, FhGST-S1 presenta actividad prostaglandina sintasa, produciendo predominantemente PGD2 y en menor medida PGE2. La síntesis de PGD2 por GSTs parasitarias ha sido descrita también en otros helmintos como *S. mansoni*, *O. volvulus* y *Oesophagostomum dentatum* (Herve M. y col., 2003; Sommer A. y col., 2003; Joachim A. y Ruttkowski B., 2011). Mientras tanto, se ha observado la producción de PGE2 por varios parásitos (Belley A. y Chadee K., 1995), aunque la relación entre dicha prostaglandina y las GSTs ha sido poco estudiada. En este sentido, se identificó en el nematodo *Ascaridia galli* una GST también de clase Sigma que convierte PGH2 en PGE2. Así, la producción de prostaglandinas es una de las actividades características de las GSTs de clase Sigma parasitarias, y ha sido relacionada con la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Arbildi P., La Rocca S., Fernández, V., 2011). La PGD2 está involucrada en diferentes procesos fisiológicos, entre ellos el desarrollo y la regulación de la respuesta inmune (Sandig H. y col., 2007). Esta prostaglandina es producida por macrófagos, mastocitos y células dendríticas, y 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. Por un lado, la PGD2 afecta procesos como la vasodilatación y permeabilidad vascular, así como la regulación de la temperatura corporal (Arbildi P., La Rocca S., Fernández, V., 2011). Además, la PGD2 puede alterar tanto positiva como negativamente la activación y migración de células del sistema inmune, así como la producción de citoquinas (Sandig H. y col., 2007). Así, puede estimular el reclutamiento de eosinófilos y basófilos. En bajas concentraciones, del orden de nanomolar, la

PGD2 estimula el reclutamiento de linfocitos Th2 y la producción de citoquinas por parte de estos, así como la inhibición de la expresión de citoquinas Th1. Este hecho podría ser relevante teniendo en cuenta que las respuestas inmunes contra helmintos son predominantemente de tipo Th2, y se caracterizan por eosinofilia y producción de anticuerpos incapaces de fijar complemento (Gause W. C. y col., 2003). La síntesis de PGD2 por parte de las GSTs parasitarias podría así estar involucrada en la polarización de la respuesta inmune del hospedero, permitiendo su establecimiento y sobrevivencia. De todas formas, se debe tener en cuenta que cuando la concentración de PGD2 aumenta en el orden de micromolar, los efectos son diferentes, estimulando por ejemplo, la apoptosis de los linfocitos (Sandig H. y col., 2007). Se debe considerar asimismo, los efectos sobre el sistema inmune de los metabolitos derivados de la PGD2, como la PGJ2. Además, la producción de altas concentraciones de PGJ2 puede disminuir la producción de citoquinas como TNF- α e IL-1 β por parte de los macrófagos así como la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible.

Los posibles roles de la PGD2 en el contexto de una infección por helmintos han sido estudiados en el trematodo *S. mansoni*. Se ha observado que durante la penetración en la piel de su hospedero, el parásito secreta Sm28GST, una GST de clase Sigma que cataliza la producción de PGD2. Esta prostaglandina inhibe la migración de las células de Langerhans hacia los ganglios linfáticos, afectando así el desarrollo de la respuesta inmune (Herve M. y col., 2003).

Mientras tanto, no se conoce hasta el momento la importancia de la PGE2 en la modulación de la respuesta inmune por parte de los parásitos. De todas formas, en mamíferos, esta prostaglandina ha sido relacionada con la inhibición de la producción de citoquinas características de las respuestas de tipo Th1 (Belley A. y Chadee K., 1995). Además, inhibe la proliferación de los macrófagos y la producción de especies reactivas del oxígeno y de IL-1. La PGE2 también actúa sobre los linfocitos B, inhibiendo su proliferación y la producción de anticuerpos. Así, se ha propuesto que la PGE2 podría contribuir al establecimiento de una respuesta predominantemente de tipo Th2 frente a los helmintos (Belley A. y Chadee K., 1995).

Además de la producción de prostaglandinas por parte de los parásitos, estas GST pueden estimular la síntesis y liberación de estos compuestos por las células del sistema inmune del hospedero (Belley A. y Chadee K., 1995). En este sentido, se ha descrito que FhGST-S1 induce la producción de prostaglandinas por células dendríticas y macrófagos (LaCourse E. J. y col., 2012).

De esta forma, la producción de prostaglandinas sería una función importante de las GSTs parasitarias, en particular las de clase Sigma. Los roles de estos compuestos en las

infecciones no se conocen en profundidad. Sin embargo, las prostaglandinas producidas por los parásitos o por las células del hospedero en respuesta al parásito, podrían contribuir a la modulación de la respuesta inmune. Además, se ha propuesto que las prostaglandinas podrían regular procesos que faciliten la entrada, migración y establecimiento del parásito en el hospedero (Belley A. y Chadee K., 1995).

1.2.3. Glutación transferasas de *E. granulosus*

Al igual que en otros cestodos, se ha detectado actividad GST tanto en la fracción citosólica de los PEs de *E. granulosus* (Morello A. y col., 1982) como en el parásito intacto (Repetto Y. A., J; Letelier, M.E and Morello A., 1986). Posteriormente, se obtuvo mediante cromatografía de afinidad al glutati6n de un extracto de PEs una fracci6n de 25kDa con actividad GST (Fernandez C. y Hormaeche C. E., 1994). La misma se debi6 a la presencia de una enzima, EgGST1, que presenta homologia con las GSTs de clase Mu (Fernandez V. y col., 2000).

En los 6ltimos a6os se han realizado importantes avances a nivel del estudio del genoma y el transcriptoma de *E. granulosus* (Fernandez C. y col., 2002; Parkinson J. y col., 2012; Tsai I. J. y col., 2013; Zheng H. y col., 2013). Tsai y cols. (2013) han reportado la presencia de numerosas GSTs citos6licas (adem6s de una GST microsomal) en el genoma de este y otros helmintos par6sitos. En este sentido, observ6 una expansi6n de los genes de GSTs de clase Mu, encontr6ndose en algunos organismos m6s de diez de 6stos. En el caso de *E. granulosus* identificaron cuatro de estos genes, siendo uno de ellos *EgGST1* (descrito por Fern6ndez V. y cols. en 2000), aunque plantean la posibilidad de que existan m6s. Adem6s, plantean la existencia de dos GSTs de clase Sigma en el genoma de este cestodo.

Mientras tanto, se distinguieron tres GSTs citos6licas y una microsomal en el transcriptoma de *E. granulosus* (Fernandez C. y col., 2002; Parkinson J. y col., 2012). Por un lado, se identific6 a EgGST1 entre los transcriptos obtenidos de PEs activados con pepsina (Parkinson J. y col., 2012). La caracterizaci6n bioquimica de la prote6na EgGST1 recombinante indica que esta enzima es capaz de conjugarse a algunos productos secundarios de la peroxidaci6n de l6pidos, en particular el *trans*-2-nonenal y el *trans-trans*-2,4-decadienal, y presenta actividad GSH peroxidasa frente a per6xidos org6nicos como el hidroper6xido de cumeno (Harispe L. y col., 2010). De esta forma, EgGST1 podr6a actuar como una enzima detoxificante para el par6sito en el contexto de una infecci6n.

Por otro lado, otras dos GSTs citos6licas fueron asignadas en principio a la clase Sigma, EgGST2 y EgGST3 (Parkinson J. y col., 2012). La primera fue identificada en el transcriptoma de PEs (Cluster EGC03317, localizaci6n CN650164). Una caracterizaci6n del gen as6 como de su secuencia aminoac6dica deducida, y la realizaci6n de estudios filogen6ticos confirmaron que

EgGST2 pertenece efectivamente a la clase Sigma (Iriarte A. y col., 2012; Arbildi P., 2013). Así, EgGST2 podría participar en la producción de compuestos inmunomoduladores como las prostaglandinas, como se ha descrito para otras GSTs parasitarias de esta clase.

Mientras tanto, EgGST3 fue detectada en el transcriptoma de capa germinativa de *E. granulosus* (Cluster EGC04109, localización CN651752). En el presente trabajo, nos centraremos principalmente en el estudio de EgGST3 y de una enzima heterodimérica compuesta por las subunidades EgGST2 y EgGST3.

1.3. Hipótesis de trabajo

Las GSTs de *E. granulosus*, pertenecientes a diferentes clases, pueden asociarse formando enzimas homo- o heterodiméricas ubicadas en regiones del parásito asociadas a la entrada y al establecimiento en el hospedero.

1.4. Objetivos general y específico

Con el fin de comprobar la validez de la hipótesis propuesta, nos planteamos los objetivos que se presentan a continuación.

1.4.1. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es contribuir a la comprensión de los posibles roles de las enzimas glutatión transferasas de *Echinococcus granulosus* en la biología de este cestodo así como en la infección por el mismo.

1.4.2. Objetivos específicos

- **Análisis de la secuencia aminoacídica deducida de EgGST3, una glutatión transferasa de *E. granulosus*.** Determinar la identidad de secuencia con GSTs de diferentes clases, construir árboles filogenéticos y analizar los residuos conservados con el fin de agrupar a EgGST3 con alguna de las clases de enzimas citosólicas descritas previamente.
- **Expresión de EgGST3 recombinante (rEgGST3) y producción del antisuero específico.** Expresar rEgGST3 en *E. coli* y generar antisueros policlonales en ratones y conejos como herramienta para la identificación de esta subunidad.
- **Caracterización de una EgGST parasitaria heterodimérica (EgGST2-3).** Verificar la expresión de EgGST2-3 por parte del parásito mediante inmunoprecipitación. Posteriormente,

expresar la enzima recombinante (rEgGST2-3) en *E. coli* y estudiar su actividad frente a diferentes sustratos así como su sensibilidad a inhibidores.

- **Análisis de la presencia de anticuerpos específicos para EgGST2 y/o EgGST3 en sueros de pacientes con hidatidosis.** Por ELISA, determinar la presencia de anticuerpos específicos para dichas GSTs en sueros de pacientes con hidatidosis confirmada comparando con sueros de individuos no infectados.
- **Estudio de la localización de las EgGSTs en el parásito.** Analizar la presencia de las tres EgGSTs en PEs, en la capa germinativa de la pared del quiste, en líquido hidático y en productos de excreción-secreción del parásito. Además, determinar la distribución de estas proteínas en PEs mediante inmunofluorescencia.

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Aldrich, a menos que se especifique. Las enzimas de restricción fueron obtenidas de Fermentas y la ADN polimerasa de SBS Genetech. El vector pDrive y el kit para purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa fueron obtenidos de Qiagen y el vector pET5a de Novagen.

2.1.2. Material parasitario

Los PEs se obtuvieron de acuerdo a Baz y cols. (1995). Brevemente, los PEs fueron extraídos asépticamente de quistes hidáticos de origen bovino y lavados con PBS (NaCl 150 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.4) conteniendo 30 µg/mL de gentamicina. Se analizó la viabilidad por el método de exclusión de eosina. Si bien no disponemos de información sobre el genotipo de los parásitos utilizados, sabemos que de los quistes hidáticos fértiles que llegan a nuestro laboratorio, aproximadamente un 70% son G1, un 20% son G5, y el resto no son determinados con la metodología empleada para la identificación (Gustavo Mourglia, comunicación personal).

2.1.3. Cepas bacterianas y medios de cultivo

La producción de ADN plasmídico se realizó transformando *Escherichia coli* de la cepa XL-1 Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'[proAB+ lacIq lacZ ΔM15 Tn10(tetr)]) (Stratagene). Las proteínas recombinantes fueron expresadas en la cepa BL21[DE3] (hsdS gal[λcIts857 ind1 S am7 nin5 lacUV5-T7 gene 1]) (Stratagene).

El medio de cultivo utilizado fue LB (triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1 %) y LB-agar 1.5 % en presencia o ausencia de antibiótico según corresponda. Las cepas bacterianas se conservaron en LB-glicerol 50 % a -70°C.

2.1.4. Plásmidos

En este trabajo se utilizaron dos vectores diferentes. Primeramente la región codificante de EgGST3 fue clonada en el vector pDrive (Qiagen), que confiere resistencia a la kanamicina en una concentración de 50 µg/mL. Luego el fragmento fue subclonado en el vector pET5a (Novagen), que confiere resistencia a la ampicilina en una concentración de 200 µg/mL.

2.1.5. Cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR

Para la amplificación por PCR de la región codificante de EgGST3 se utilizaron los cebadores específicos que se describen en la Tabla 1.

Cebador	Secuencia	Sitio de corte para enzimas de restricción
FwEgGST3	5'-CATATGGCAAGACTGGAGGATT-3'	<i>NdeI</i>
RvEgGST3	5'-AAGCTTAACCCTATATCTTTGTCCAAC-3'	<i>HindIII</i>

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la región codificante de EgGST3. Se indica para cada oligonucleótido, su secuencia y el sitio de corte para la enzima de restricción.

2.2. Métodos

2.2.1. Análisis bioinformático de EgGST3

2.2.1.1. Obtención de secuencias de GSTs

La secuencia de la región codificante de *EgGST3* se obtuvo a partir del transcriptoma de *E. granulosus* (www.nematodes.org/NeglectedGenomes/Lopho/LophDB.php) (Fernandez C. y col., 2002), de igual forma que la de *EgGST2* (Arbildi P., 2013). La misma se confirmó por secuenciación directa del producto de PCR (Servicio de Secuenciación, UBM, Instituto Pasteur de Montevideo), observándose una coincidencia del 100% con la secuencia obtenida del transcriptoma. Las secuencias aminoacídicas de las EgGSTs fueron deducidas a partir de los correspondientes mARN.

Las secuencias de las GSTs de *E. multilocularis* (EmGSTs) fueron identificadas en el genoma de este organismo (www.sanger.ac.uk/Projects/Echinococcus) por BLAST a partir de las correspondientes EgGSTs. El resto de las secuencias proteicas empleadas en este trabajo fueron obtenidas del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.1.2. Alineamientos de secuencias y reconstrucciones filogenéticas

Los alineamientos fueron construidos con el programa ClustalX 2.0.9 (Thompson J. D. y col., 1997). El porcentaje de identidad de *EgGST3* con las diferentes secuencias fue determinado con BioEdit (Hall T. A., 1999). El árbol filogenético fue construido con el método Neighbor-Joining implementado en el programa MEGA 4.0 (Larkin M. A. y col., 2007; Tamura K. y col., 2007).

Posteriormente, se realizó un nuevo estudio en el que se emplearon los programas ProbCons (Do C. B. y col., 2005) y Mr. Bayes 3.1.2 (Ronquist F. y Huelsenbeck J. P., 2003) para la construcción de los alineamientos y los árboles filogenéticos respectivamente.

2.2.1.3. Análisis de secuencia

Se analizó el uso de codones en los genes EgGST1 y EgGST3 utilizando el programa codonw 1.4.4 disponible en <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::codonw>.

El programa DiANNA 1.1 (Ferre F. y Clote P., 2006) fue utilizado para la predicción del estado de oxidación de los residuos de cisteína de EgGST3.

Se utilizó el programa EnsembleGly (Caragea C. y col., 2007) para la búsqueda de posibles sitios de N- y O- glicosilación en EgGST3. Además, los programas NetPhos 2.0 y GPS 2.1 (Blom N. y col., 1999; Xue Y. y col., 2008), fueron empleados para buscar posibles sitios fosforilados, tanto por serin como por treonin y tirosinquinasa.

Para predecir si las EgGSTs presentan un péptido señal para su secreción se utilizó el programa SignalP 4.1 (Petersen T. N. y col., 2011).

Finalmente, se analizó la localización subcelular de las EgGSTs utilizando el programa YLoc (Briesemeister S. y col., 2010a; Briesemeister S. y col., 2010b).

2.2.2. Técnicas moleculares aplicadas a ácidos nucleicos

2.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La región codificante de EgGST3 fue amplificada utilizando como molde cDNA previamente sintetizado a partir de ARN de PEs. Los cebadores utilizados (Tabla 5.1) fueron diseñados en base a la secuencia CN651752 reportada en el transcriptoma de *E. granulosus* (<http://www.nematodes.org/NeglectedGenomes/Lopho/LophDB.php>). La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400, utilizando el siguiente programa: en primer lugar, la mezcla de reacción se mantuvo durante 3 minutos a 95°C; luego se repitió 25 veces un ciclo que comprendió 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de hibridación (54°C) y un minuto a 72°C; finalmente hubo un período de extensión de 15 minutos a 72°C.

El volumen final de la reacción fue de 20 µL conteniendo: buffer de reacción (SBS Genetech), dNTPs cada uno en una concentración final de 0.25 mM, 1 U de la enzima Taq polimerasa (SBS Genetech) y cada cebador en concentración final de 0.25 µM. En la mezcla de reacción se incluyó además 2 µL de un colorante (PCR Dye, SBS Genetech) que posteriormente permitió la visualización del avance de la corrida electroforética en geles de agarosa.

2.2.2.2. Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon en TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM) en porcentajes que dependen de las muestras a analizar, conteniendo bromuro de etidio en una concentración final de 0.5 mg/mL. El ADN se visualizó por exposición del gel a luz UV.

Cada muestra se cargó en el gel en buffer de carga (glicerol 50%, EDTA 0.2 M pH 8.3, azul de bromofenol 0.05%).

2.2.2.3. Precipitación del ADN con sales y alcohol

Se utilizaron diferentes sales y alcoholes dependiendo del objetivo de la precipitación. Las mezclas de ligación se precipitaron con acetato de amonio en una concentración final de 1 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Para otros fines, el ADN se precipitó con acetato de sodio 1 M o el cloruro de litio 8 M, utilizándose de cada uno de ellos 1/3 y 1/20 respectivamente del volumen a precipitar. Además, en algunos casos se utilizó isopropanol en lugar de etanol en un volumen igual al que se va a precipitar. La mezcla del ADN junto con la sal y el alcohol se dejó a -70 °C por 30 minutos y luego se centrifugó 15 minutos a 12000 g. El sedimento se lavó con etanol 70% y se dejó secar unos minutos a 37 °C. Se resuspendió en agua miliQ estéril.

2.2.2.4. Purificación de ADN de geles de agarosa

En este punto se utilizó un kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se cortó el gel conteniendo el ADN a purificar y se pesó. Luego, se fundió la agarosa a 50°C en presencia de buffer QG. Se agregó isopropanol y se pasó la muestra a la columna de purificación. Se centrifugó la muestra en la columna por 1 minuto a 12000 g. Se lavó la columna con un buffer de lavado y se dejó reposar de 2 a 5 minutos. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se descartó el contenido del tubo de recolección y se realizó una nueva centrifugación. Se eluyó con 30 µL del buffer EB, se dejó un minuto y se volvió a centrifugar.

El fragmento purificado se chequeó en un gel de agarosa y su concentración se estimó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular de concentración conocida.

2.2.2.5. Preparación de células electrocompetentes

La transformación de *E. coli* se realizó por electroporación, y las células a transformar fueron previamente tratadas para hacerlas competentes. En este sentido, se inoculó 500 mL de medio LB con un cultivo nocturno de 10 mL de dichas células. Se dejó crecer a 37°C con agitación, hasta que la absorbancia a 600 nm fue aproximadamente 0.6. El cultivo se centrifugó por 15 minutos a 4000 g, a una temperatura de 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en 250 mL de agua miliQ estéril muy fría y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento se resuspendió en 125 mL de glicerol 10% en agua, muy frío. Se realizó otra centrifugación y el sedimento se resuspendió esta vez en 10 mL de glicerol 10%

frío. Tras una nueva centrifugación, el sedimento se resuspendió en 1.5 mL de glicerol 10% frío. Las células así obtenidas fueron alicuotadas de a 40 μ L y se guardaron a -70 $^{\circ}$ C hasta su uso.

2.2.2.6. Transformación de células competentes por electroporación

Una alícuota de la mezcla de ligación previamente precipitada con acetato de amonio y etanol absoluto se mezcló con 40 μ L de células XL-1 electrocompetentes. Inmediatamente se pasó a una celda de electroporación fría. Se dio un pulso en un equipo MicroPulser (BioRad) utilizando el programa Ec2 y un voltaje de 2500 V. Se recuperaron las células con 500 μ L de LB-glucosa 20% a 37 $^{\circ}$ C por una hora. Se plaquearon luego en LB-agar con el antibiótico adecuado. Las placas se dejaron a 37 $^{\circ}$ C toda la noche.

2.2.2.7. Extracción de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron utilizando el protocolo de Lisis Alcalina (Sambrook J. y Russel D. W., 2001). Brevemente, se preparó un cultivo nocturno de 3 mL conteniendo el antibiótico adecuado, y se centrifugó durante 30 segundos a 1 minuto a 12000g. El pellet celular se resuspendió en 100 μ L de solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl pH8, 10 mM EDTA pH 8) con 3 μ L de RNasa 10 mg/mL (Fermentas). Se añadieron 200 μ L de solución II (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 150 μ L de solución III (60 mL acetato de potasio 5 M, 11,5 mL ácido acético glacial, 28,5 mL de agua), se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo con 800 μ L de etanol absoluto. Se mezcló por inversión y se centrifugó 5 minutos a 12000 rpm. Se lavó con etanol 70% y se dejó secar. El ADN plasmídico se resuspendió en 50 μ L de agua y se dejó una hora a temperatura ambiente. Se guardó a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

2.2.2.8. Clonado en el vector pDrive

Para el clonado en el vector T-A (pDrive, Qiagen) se utilizaron 50 ng de plásmido, 50 ng de producto de PCR (relación vector: inserto aproximadamente 1:5) y 5 μ L de la mezcla de ligación (Qiagen PCR Cloning Kit) en un volumen final de 10 μ L. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C. Posteriormente, se transformaron bacterias *E. coli* XL-1 por electroporación (ver 2.2.2.5), que se plaquearon luego en medio selectivo. Las colonias obtenidas se crecieron en cultivos nocturnos de 3 mL para amplificar y extraer los ADN plásmidos.

2.2.2.9. Digestiones de ADN con enzimas de restricción

Se confirmó la presencia de clones recombinantes analizando la liberación del inserto luego de una digestión con la enzima *HindIII* (Fermentas). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL conteniendo 2 μL de buffer de reacción (Fermentas), 5 U de *HindIII* y 5 μL de plásmido, durante 3 horas a 37°C. Aquellas construcciones que liberaron un fragmento de aproximadamente 700 pb contenían el inserto en la posición adecuada para su posterior subclonado direccional en el vector de expresión pET5a.

El fragmento de ADN conteniendo la región codificante de EgGST3, se liberó del plásmido recombinante pDrive-EgGST3 digiriendo con las enzimas *BamHI* y *NdeI* (Fermentas). En primer lugar, se incubó la construcción pDrive-EgGST3 y el pET5a con la enzima *BamHI* durante 3 horas a 37°C. Posteriormente, el ADN tratado se precipitó con cloruro de litio como se describe en la sección 2.2.2.3, y se digirió con la enzima *NdeI* durante toda la noche a 37°C. Luego de inactivar la enzima durante 20 minutos a 65°C, el ADN se precipitó nuevamente con cloruro de litio.

2.2.2.10. Defosforilación de pET5a digerido

El plásmido linearizado en 2.2.2.8 fue defosforilado utilizando la enzima fosfatasa alcalina (SAP, Fermentas). La reacción se realizó durante 30 minutos a 37°C, en un volumen final de 50 μL conteniendo 5 μL de buffer (Fermentas) y 1 U de SAP. Luego se inactivó la enzima durante 15 minutos a 65°C.

2.2.2.11. Clonado en el vector de expresión pET5a

El vector pET5a y el fragmento de EgGST3 fueron purificados de un gel de agarosa como se describió en la sección 2.2.2.3. Para el clonado se utilizaron 20 ng de plásmido, 20 ng de inserto (relación vector: inserto aproximadamente 1:6) y 1 μL de T4 Ligasa (Fermentas) en un volumen final de 50 μL . La mezcla de reacción se mantuvo una hora a 22°C y luego se precipitó con LiCl y etanol absoluto. Se secó y luego se resuspendió en un volumen final de 15 μL de agua miliQ estéril. Se utilizaron 3 μL de esta preparación para transformar células de la cepa BL21[DE3] de *E. coli*, por electroporación (sección 2.2.2.5).

El ADN plasmídico de varias colonias obtenidas en medio selectivo, se analizó por digestión con la enzima *HindIII* y por PCR en busca de plásmidos recombinantes. Se confirmó por secuenciación (Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur de Montevideo).

2.2.3. Expresión y purificación de rEgGST2-3

2.2.3.1. Expresión de proteínas recombinantes

Para la expresión de rEgGST3 y rEgGST2-3 se siguió el protocolo utilizado previamente por Harispe y cols. (2010) para la expresión de EgGST1. Un cultivo nocturno de las células transformadas con los plásmidos correspondientes en 20 mL de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado (kanamicina 50 µg/mL y ampicilina 200 µg/mL para la expresión de rEgGST2-3, sólo ampicilina para la expresión de rEgGST3), se diluyó a un volumen final de 200 mL del mismo medio conteniendo además glucosa en una concentración de 1%. El cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0,6 a 600nm y se enfrió en hielo. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante el agregado de IPTG en una concentración final de 0.4 mM durante toda la noche a 20°C. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado durante 10 minutos a 5000 rpm, y el pellet celular fue resuspendido en buffer de lisis (1% Tritón X-100, 10 mM DTT en PBS). Se lisaron las células por sonicación durante 10 minutos al 40% de potencia, con la mitad del tiempo descansando. Se centrifugó nuevamente, esta vez durante 10 minutos a 12000 rpm y se continuó trabajando con la fracción soluble.

2.2.3.2. Purificación de rEgGST2-3

La purificación de rEgGST2-3 se realizó por afinidad de una cola de histidinas incorporada a EgGST2 a una resina de níquel-agarosa (Invitrogen). La resina equilibrada con buffer nativo (500 mM NaCl, 50 mM NaHPO₄ pH 8), se incubó con la fracción soluble obtenida en 2.2.3.1. Luego de lavar la columna con buffer nativo, las proteínas retenidas se eluyeron con imidazol 100mM en el mismo buffer. Se cuantificó la concentración proteica por el método de Bradford (Bradford M. M., 1976) y se conservó a 4°C hasta su uso.

2.2.4. Preparación y purificación de antisueros policlonales específicos para las EgGSTs

2.2.4.1. Obtención de las proteínas recombinantes

La producción de los anticuerpos policlonales específicos para las EgGSTs (tanto la preparación de la proteína recombinante como la inmunización de los animales) estuvo a cargo de la Dra. Verónica Fernández y la MSc. Paula Arbildi, que poseen acreditación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) para el trabajo con animales.

Considerando que tanto EgGST2 como EgGST3 recombinantes no fueron obtenidas en forma soluble, se utilizaron los correspondientes cuerpos de inclusión para la inmunización de los animales. Cada EgGST fue expresada como una fusión a una cola de histidinas siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.2.3.1. Para la purificación de los cuerpos de inclusión se

siguió el protocolo descrito por Schmidt y cols. (2005). Brevemente, las células inducidas fueron resuspendidas en una solución conteniendo 3% del detergente Nonidet40 en 10mM Tris-HCl pH 7.5 y 1mM EDTA. Se lisaron las células por sonicación al 50% de potencia, y se obtuvieron los cuerpos de inclusión centrifugando durante 15 minutos a 20000 g. Luego, se lavaron dos veces con agua y se volvieron a sonicar brevemente, colectándose por centrifugación. Los cuerpos de inclusión así obtenidos fueron utilizados para inmunizar ratones y conejos siguiendo los correspondientes protocolos aprobados por la CHEA que se presentan a continuación.

2.2.4.2. Inmunización de ratones

La obtención de antisueros específicos en ratones Balb/c hembras adultas vírgenes se realizó siguiendo el esquema de inmunización descrito en el protocolo N° 101900-000077-13. Brevemente, cada animal anestesiado con una mezcla de 20% de isofluorano en propilenglicol, fue inoculado con un volumen máximo de 0.2 mL de una mezcla conteniendo la proteína recombinante en PBS y adyuvante (1:1). Para todos los grupos experimentales se realizó una primera inmunización el día 0 y dos recuerdos (día 15 y día 30). A los 45 días de inicio del protocolo, se extrajo sangre por punción de la vena retro-orbital utilizando un capilar con heparina para facilitar la extracción. El suero que se obtuvo a partir de la sangre por coagulación de la misma y centrifugación, se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.2.4.3. Inmunización de conejos y tratamiento de los sueros

La inmunización de conejos New Zealand adultos vírgenes se realizó siguiendo lo descrito en el protocolo N° 101900-000697-12. Brevemente, para cada inoculación, el animal se tranquilizó inyectándole 5 mg/Kg de xilacina vía intramuscular. Los animales recibieron una primera inmunización con aproximadamente 1 mL de una emulsión conteniendo volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund y 300 μg de cada proteína en PBS. Se inyectó en 40 puntos (25 μL /punto) intradérmicamente a lo largo del lomo de cada conejo. A los 30 y 45 días se administró intramuscularmente en las patas traseras (0.5 mL por pata) con la emulsión conteniendo aprox. 150 μg de antígeno en PBS en adyuvante incompleto de Freund (1:1). Las muestras de sangre se obtuvieron al inicio del protocolo, antes de comenzar con las inmunizaciones (Día 0) y posteriormente, el conejo se sangró de la arteria central de la oreja, diez días después del último recuerdo (30 mL).

Las preparaciones utilizadas para inmunizar a los conejos posiblemente contenían, además de la rEgGST correspondiente, algunas proteínas bacterianas. De esta forma, cada suero contenía anticuerpos específicos para estas proteínas, además de los específicos para la

EgGST, por lo que fue necesario separarlos del suero. Para esto, en primer lugar se preparó una membrana de PVDF conteniendo proteínas de *E. coli*. Un cultivo nocturno bacteriano de la cepa BL21[DE3] fue centrifugado a 5000rpm y el pellet celular obtenido fue resuspendido en PBS-Tritón 1%- EDTA 5 mM. Se lisaron las células por sonicación a un 30% de potencia durante 10 minutos (50% del tiempo sonicando y el otro 50% descansando). Se centrifugó a 5000rpm y el sobrenadante fue incubado con un trozo de membrana de PVDF durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó con PBS-leche descremada 5% durante una hora a temperatura ambiente y se lavó con PBS-Tween 1%. Posteriormente se incubó la membrana con el antisuero correspondiente durante una hora a temperatura ambiente. Se recuperó el suero depletado y se centrifugó por 5 minutos a 500 rpm.

Se realizó una precipitación con sulfato de amonio para enriquecer en anticuerpos las fracciones obtenidas anteriormente. Los antisueros depletados fueron diluidos al medio en PBS y se agregó el volumen necesario de una solución saturada de sulfato de amonio para alcanzar una saturación del 45%. Cada mezcla se mantuvo en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 20 minutos a 4°C. El precipitado fue lavado con sulfato de amonio 45% y se volvió a centrifugar. Se resuspendió el pellet en el mismo volumen de PBS que el suero original y se centrifugó para remover cualquier material insoluble. Posteriormente se realizó una nueva precipitación con sulfato de amonio en las mismas condiciones que la anterior, pero en este caso con porcentaje de saturación final del 40% en las mismas condiciones que la anterior. El pellet final fue resuspendido en PBS y se dializó contra PBS para eliminar los restos de sulfato de amonio. Se cuantificaron las proteínas totales por el método de Bradford (Bradford M. M., 1976).

Vale la pena mencionar que tanto los anticuerpos de ratón como los de conejo solamente reconocen a la EgGST recombinante que fue utilizada para inmunizar al animal correspondiente y no a las otras EgGSTs por *Western-blot*.

2.2.5. Técnicas bioquímicas aplicadas al estudio de proteínas

2.2.5.1. ELISA

Se analizaron muestras de suero de pacientes con equinococosis quística en busca de anticuerpos capaces de reconocer a rEgGST2-3 mediante la técnica de ELISA. Se incluyeron como controles muestras de suero de individuos no infectados.

Las placas de ELISA (Greiner) fueron sensibilizadas con rEgGST2-3 en una concentración de 7 µg/mL durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las mismas fueron bloqueadas con PBS conteniendo Tween-20 0.05% y BSA 0.5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.05% y luego se sembraron las muestras en estudio

(dilución 1/100 PBS-Tween-20 0.05%-BSA 0.5%) por triplicado, incubándose durante toda la noche a 4°C. Nuevamente se lavó tres veces la placa con PBS-Tween, y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-Ig humana conjugado a peroxidasa, Dako), durante 1 hora a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween y finalmente uno con PBS. El revelado se realizó con el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametil-bencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno en amortiguador acetato de sodio (12 mL de tampón acetato de sodio [0.1 M, pH 5.5] + 0.2 mL de TMB [6mg/mL en dimetil sulfóxido] + 50 µL de H₂O₂ [1%]). La reacción se detuvo con el agregado de 50 µL por pocillo de ácido sulfúrico 2 N. La detección se realizó midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (MCC/340, MultiSkán).

2.2.5.2. Electroforesis y western-blot

SDS-PAGE unidimensional

Las electroforesis SDS-PAGE fueron realizadas según protocolos estándar (Laemmli U. K., 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 Coomasie Blue R-250 (0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250, etanol 30%, Ácido Acético 10%).

SDS-PAGE bidimensional

Se analizó el perfil de proteínas de un extracto de PEs por electroforesis bidimensional. Previamente, se realizó una precipitación del extracto con TCA para concentrar las proteínas y eliminar sustancias que pudieran interferir luego en la electroforesis. Se precipitaron 2 mg de proteína total con TCA 20% en acetona durante al menos 16 horas. Las proteínas fueron recuperadas por centrifugación a 14000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Se realizaron 5 lavados con acetona fría, se secó el precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en buffer de solubilización (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 2% anfolitos pH 3-10 (BioRad), 40 mM DTT). Las proteínas solubilizadas se incubaron con las tiras de isoelectroenfoque (17 cm, pH 3 a 10NL; BioRad) durante toda la noche. Se realizó la corrida de las tiras siguiendo un programa: 250 V durante 15 minutos, 10000 V por 3 horas y finalmente aumento hasta un voltaje final de 60000 V, en un sistema Protean IEF (Bio-Rad). Las tiras se congelaron hasta el momento de realizar la segunda dimensión. Luego cada tira se trató con DTT 1% en buffer de equilibrio (6 M urea, 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 29,3% glicerol, 2% SDS; 0,002% azul de bromofenol) durante 15 minutos, y finalmente con iodacetamida 4% también en buffer de equilibrio. En la segunda dimensión, se realizó un SDS-PAGE 12% utilizando un equipo Protean II xi 2D (BioRad). Las proteínas fueron visualizadas por tinción con Coomasie blue (ver párrafo anterior).

Western-blot

Las proteínas previamente fraccionadas 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 H. y col., 1979). La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó usando electrodos de carbono grafito en condiciones semisecas (Novablot, LKB), en tampón de transferencia (glicina 0,29%, Tris 0,28%, metanol 20%), siguiendo las indicaciones del fabricante (0.8 mA/cm²) durante 30 minutos. En el caso de los geles en dos dimensiones la transferencia se realizó durante 16 horas a 20 mA utilizando un sistema de inmersión (BioRad). La visualización de las proteínas se realizó por tinción de la membrana con Rojo Ponceau (Sambrook J. y Russel D. W., 2001). Luego, la membrana se bloqueó con PBS conteniendo Tween 0.5% y leche descremada al 5%, durante toda la noche a 4°C. Se realizaron lavados con PBS-Tween y luego se incubó la membrana con los sueros en las diluciones correspondientes en PBS-Tween-leche durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente, se lavó la membrana con PBS-Tween y se incubó con un conjugado anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa o fosfatasa alcalina por una hora a temperatura ambiente (dilución 1/1000 en PBS-Tween-leche).

Cuando se utilizó fosfatasa alcalina el revelado se llevó a cabo 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). El revelado para la reacción de la peroxidasa se realizó con 0,6 mg/mL de DAB y 0,03% peróxido de hidrógeno en buffer Tris 50 mM pH 7.5 conteniendo 0,3 mg/mL de NiCl₂, o por quimioluminiscencia utilizando el kit “Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents” (GE Healthcare).

2.2.5.3. Inmunoprecipitación

Se realizó una inmunoprecipitación con el fin de comprobar si *E. granulosus* expresa una enzima heterodimérica compuesta por EgGST2 y EgGST3. Se utilizaron los anticuerpos específicos para una de las subunidades para inmunoprecipitar a todas las proteínas presentes en el extracto de PEs que contienen a dicha subunidad. Luego se verificó por *western-blot* la presencia de la otra subunidad entre las proteínas retenidas en la resina.

Para la preparación de la resina, se lavó 200 µL de una suspensión de proteína G-Sepharosa 5 veces con PBS estéril, centrifugando durante 5 minutos a 196 g a temperatura ambiente. Luego del último lavado se retiró el sobrenadante y la resina se resuspendió en 600 µL de PBS. Posteriormente, se agregó 250 µL de suero de ratón (anti-EgGST2 o anti-EgGST3). La mezcla fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó 1

minuto a 196 g y se descartó el sobrenadante. Se lavó 3 veces con PBS y finalmente la resina se resuspendió en 400 μ L de PBS.

Una vez preparada la resina se llevó a cabo la inmunoprecipitación. Primeramente, para eliminar la contribución de las posibles interacciones inespecíficas entre las proteínas del extracto de PEs y la resina de proteína G, se incubó 900 μ L de sonificado de PEs (1,93 mg/mL) con 100 μ L de resina sin anticuerpos acoplados durante 1 hora a 4°C con agitación. Luego de centrifugar minuto a 82 g, se recuperó el extracto de PEs. Posteriormente, 900 μ L de dicho extracto se combinaron con 300 μ L de la suspensión de la resina acoplada a los anticuerpos y con 1,9 mL de buffer de inmunoprecipitación (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA, pH 8,0). La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C con agitación. Se centrifugó 1 minuto a 82 g y se descartó el sobrenadante. Se lavó la resina 3 veces con buffer de inmunoprecipitación frío por 5 minutos a 4°C, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió la resina en 30 μ L de buffer muestra para ser analizada por SDS-PAGE.

2.2.5.4. Ensayos de actividad enzimática

El sustrato utilizado comúnmente para la determinación de la actividad glutatión transferasa es el CDNB. La conjugación de glutatión al CDNB da como producto el S-(2,4-dinitrofenil) glutatión (ver Figura 4, sección 1.3.1), el cual puede ser detectado espectrofotométricamente a 340nm (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995).

Se determinó la actividad específica de rEgGST2-3 frente al CDNB a 25 °C en buffer fosfato 100 mM pH 6,5 conteniendo 18 μ g de enzima, 1 mM de CDNB y 4 mM de GSH en un volumen de reacción de 1 mL. La reacción se continuó durante 1 minuto, y se determinó la formación de producto por la reacción no enzimática, la cual fue restada de la velocidad de reacción.

Se determinó además la actividad específica de rEgGST2-3 frente a diferentes sustratos modelo de las glutatión transferasas. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1 minuto en un volumen final de 1 mL a 25 °C en un buffer fosfato 100 mM en las condiciones presentadas en la Tabla 2 para cada uno de los sustratos.

En todos los casos, la actividad específica fue determinada por triplicado, realizándose al menos dos experimentos independientes con cada sustrato.

Por otro lado, se analizó el efecto de varias drogas antihelmínticas sobre la actividad enzimática de rEgGST2-3 frente al CDNB. Para esto, se preparó la mezcla de reacción conteniendo el buffer fosfato, el GSH y la enzima como se describió previamente, y el inhibidor

en la concentración que se indica en la tabla 3. La mezcla fue incubada a 25°C durante 5 minutos, y luego se agregó 1 mM de CDNB para comenzar la reacción.

	[sustrato] (mM)	[GSH] (mM)	Enzima (μ g)	pH	λ (nm)
CDNB	1	4	18	6.5	340
DCNB	1	5	8	7.5	345
EA	0.2	0.25	4	6.5	270
EPNP	5	5	20	6.5	360
BSP	0.03	5	20	7.5	330
<i>trans</i> -nonenal	0.025	1	20	6.5	225
<i>trans-trans</i> -decadienal	0.05	2.5	5	6.5	280

Tabla 2. Condiciones en las que se llevaron a cabo los ensayos de actividad enzimática con los diferentes sustratos. Se incluye la concentración de glutatión y del segundo sustrato, así como el pH al cual se realizó el ensayo y la longitud de onda a la que se siguió la reacción, con su ϵ correspondiente.

Inhibidor	Concentración (μ M)
Mebendazol	50
Albendazol	200
Febendazol	100
Rafoxamida	100
Bitionol	10
Closantel	10
Hexaclorofeno	5

Tabla 3. Concentraciones de las drogas antihelmínticas utilizadas en los ensayos de inhibición de la actividad enzimática de rEgGST2-3.

2.2.6. Localización de EgGSTs en protoescólices por inmunofluorescencia

2.2.6.1. Fijación y deshidratación del material parasitario

Los PEs previamente lavados fueron fijados en una solución de paraformaldehído 3% en buffer PHEM (25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 60 mM PIPES, 2 mM MgCl₂, pH 7,3) durante 1 hora a 4°C. El fijador fue removido mediante lavados con buffer PHEM durante 1 hora a 4°C.

Luego, para la crioprotección de los tejidos, los PEs se incubaron con una solución de sacarosa 15% en PHEM en la que permanecieron toda la noche a 4°C. Finalmente, se pasó a

una solución de sacarosa 30% en la que permanecieron al menos 24 horas, o hasta el momento de su inclusión en la resina (Shandon Cryomatrix, Thermo electron Corporation). Se obtuvieron cortes de 10 μm que fueron mantenidos a -20°C hasta su uso.

2.2.6.2. Inmunofluorescencia

Los cortes de los PEs fueron incubados con una solución de Tritón X-100 0.1% en buffer PHEM (HEPES 25 mM, EGTA 10 mM, PIPES 60 mM, MgCl_2 2 mM; pH 7.2) durante diez minutos a temperatura ambiente para permeabilizar las membranas. El detergente se removió mediante dos lavados con PHEM. Posteriormente se bloquearon los grupos aldehídos y cetonas libres del propio tejido y generados por el fijador incubando los cortes con una solución de borohidruro de sodio 1% en PHEM durante diez minutos a temperatura ambiente. Se retiró el borohidruro de sodio lavando con PHEM, y se incubaron los cortes con solución de bloqueo (glicina 50mM, sero albúmina bovina 0.1%, suero normal de cabra 5% en buffer PHEM) durante treinta minutos 37°C . Posteriormente, los cortes se incubaron con los anticuerpos específicos diluidos (1/100 para los anticuerpos específicos para EgGST1 y EgGST2 y 1/500 para EgGST3) en buffer de incubación (50 mM glicina, 0.1% sero albúmina bovina en PHEM) durante una hora a 37°C . Luego de lavar los cortes con buffer de incubación, se enfrentaron a un anti-anticuerpo de conejo conjugado al fluorocromo Alexa 488 (Invitrogen) diluido 1/1000 en buffer de incubación, durante 45 minutos a 37°C . Nuevamente se lavaron los cortes con buffer de incubación de la misma manera y se agregó un último lavado con buffer PHEM. El montaje se realizó con medio ProLong Gold (Invitrogen) conteniendo Dapi, y se guardaron los cortes en la oscuridad a 4°C hasta su observación en un microscopio confocal Olympus FV300.

2.2.7. Cultivo de protoescólices y obtención de productos de excreción-secreción

Se utilizaron lotes de PEs con viabilidad mayor al 90%. Luego de lavarlos con PBS conteniendo gentamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO_2 , en medio M199 con antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina a 100 U/mL, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente) y glucosa en concentración de 4 mg/mL.

Los parásitos se mantuvieron en cultivo renovando el medio periódicamente y guardando el medio retirado. Cuando se observaron cambios en la forma o en la movilidad de los PEs que pudieran indicar la muerte de los mismos, se dio por finalizado el cultivo. Se juntaron todos los sobrenadantes extraídos de un mismo lote de PEs y se concentraron utilizando un filtro Amicon Ultra-15 con membrana de valor límite de 10kDa (Millipore). Se guardó a -20°C hasta su uso.

Capítulo 3. Clasificación de EgGST3

La clasificación de EgGST3 dentro de las GSTs citosólicas constituye una primera aproximación para comprender los posibles roles de esta proteína en el parásito. Para estudiar este aspecto, se realizaron varios análisis de la secuencia proteica de EgGST3 en los que se determinó la identidad con otras GSTs parasitarias y de mamíferos; se identificaron residuos conservados de las diferentes clases; y se construyeron árboles filogenéticos para determinar la relación de EgGST3 con otras GSTs citosólicas. En el Anexo se encuentra la lista de las secuencias aminoacídicas de las GSTs utilizadas a lo largo de este capítulo con su correspondiente número de acceso y el organismo del cual provienen.

3.1. Resultados

3.1.1. Homología de secuencia

Como se mencionó anteriormente, EgGST3 fue detectada en el transcriptoma de capa germinativa de *E. granulosus* (Parkinson J. y col., 2012) (Cluster EGC04109, localización CN651752). Una búsqueda de secuencias relacionadas en los genomas de *T. solium* y *E. multilocularis* permitió detectar genes ortólogos en estos organismos (TsGST3 y EmGST3). Las secuencias traducidas de ambos genes presentan porcentajes de identidad con EgGST3 de 83,4 y 98,1% para TsGST3 y EmGST3 respectivamente. Sin embargo, no se encontraron secuencias relacionadas en los otros helmintos considerados en el análisis (Iriarte A. y col., 2012) (ver Anexo).

Se analizó la identidad y homología de secuencia de EgGST3 con otras enzimas parasitarias y humanas de diferentes clases utilizando el programa BioEdit (Tabla 4). Los porcentajes de identidad de EgGST3 con las enzimas parasitarias se encuentran entre un 12,9 y 25,1 %. La identidad con las GSTs de las diferentes clases es demasiado baja como para poder asignar a EgGST3 a una de ellas. Los mayores porcentajes de identidad corresponden a las enzimas de clase Sigma, encontrándose entre 19,8 y 25,1%. Dentro de esta clase, el mayor porcentaje corresponde a una GST de clase Sigma de *S. mansoni*. Además, EgGST3 presenta un 19,2% de identidad con una prostaglandina sintasa humana, perteneciente a esta clase de GSTs. Mientras tanto, la menor identidad con EgGST3, entre 12,9 y 14,8%, corresponde a las proteínas de clase Omega.

Por otro lado, los porcentajes de homología se encuentran para las clases Mu y Omega en el entorno del 30%, mientras que para las clases Pi y Sigma lo hacen en el entorno del 40%.

Sobresalen por encima del resto las GSTs de clase Sigma de *S. mansoni* y *S. japonicum* (47,5 y 49,8% de homología respectivamente).

En resumen, si bien EgGST3 parece estar relacionada con las GSTs parasitarias de clase Sigma, no presenta una identidad suficiente como para ser incluida dentro de alguna de las clases de GSTs citosólicas según lo propuesto por Hayes y cols. (2005).

Clase	Organismo		Nº de acceso	Porcentaje de identidad	Porcentaje de homología
Mu	Parásitos	<i>E. granulosus</i> (EgGST1)	AAB66318	13,2	33,2
		<i>F. hepatica</i>	ACF59730	14,5	34,2
		<i>T. solium</i>	AAM64045	13,2	32,8
		<i>S. japonicum</i>	AAB59203	16,2	34,2
	Mamíferos	<i>Homo sapiens</i>	AAH08790	16,5	37,1
Pi	Parásitos	<i>Brugia malayi</i>	CAA73325	20,6	39
		<i>O. volvulus</i> (OvGST2)	AAA53575	21,5	40,4
	Mamíferos	<i>H. sapiens</i>	NP_000843	17,8	38,7
Sigma	Parásitos	<i>S. mansoni</i>	CAA28796	24,2	47,5
		<i>S. japonicum</i>	AAC00518	25,1	49,8
		<i>T. solium</i>	ACN88552	18,2	39,5
		<i>E. granulosus</i> (EgGST2)	ADQ89757.1	19,8	39,6
		<i>A. suum</i>	CAA53218	17,8	36,5
	Mamíferos	<i>H. sapiens</i>	AAH20734	19,2	34,7
Omega	Parásitos	<i>S. japonicum</i>	CAX74405	12,9	27
		<i>S. mansoni</i> (SmGSTO)	AAO49385	13,3	26,2
	Mamíferos	<i>H. sapiens</i>	NP_004823	14,8	30,9

Tabla 4. Identidad de secuencia aminoacídica de EgGST3 con GSTs parasitarias y humanas de diferentes clases: Mu, Pi, Sigma y Omega. Se realizaron alineamientos de EgGST3 con cada una de las proteínas indicadas en la tabla y se determinó la identidad y la homología de secuencia utilizando el programa BioEdit.

3.1.2. Análisis filogenético

Posteriormente, se realizaron alineamientos de secuencias en donde se incluyeron GSTs citosólicas de diferentes clases y se construyeron árboles filogenéticos. El estudio incluyó GSTs de diferentes organismos, entre ellos mamíferos y helmintos (ver anexo). Este análisis indica que EgGST1 y EgGST2 pertenecen a las clases Mu y Sigma respectivamente, tal como se había descrito previamente (Fernandez V. y col., 2000; Arbildi P., 2013) (Figura 8).

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran a EgGST3 agrupada con EmGST3, formando un grupo separado de las clases de GSTs caracterizadas hasta el momento. Dicho grupo se encuentra en una posición intermedia entre las GSTs de clase Sigma y las de clase Omega (Figura 8).

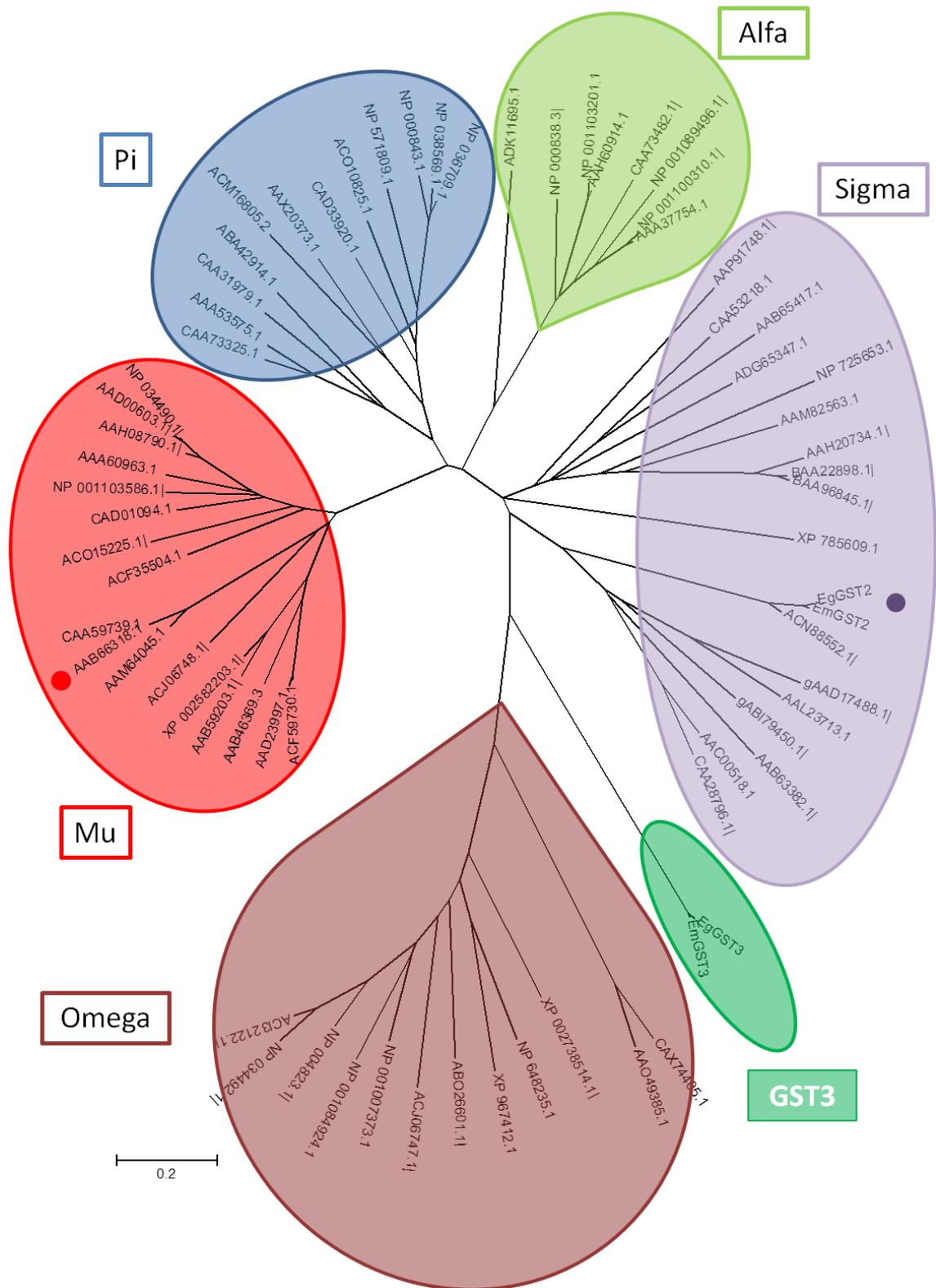


Figura 8. Relaciones filogenéticas entre GSTs citosólicas de diferentes clases procedentes de varios organismos. El árbol filogenético fue construido utilizando el programa MEGA 4.0. Se empleó el método Neighbor-Joining, obteniéndose un árbol consenso a partir de 500 réplicas (*bootstrap*). Las distancias evolutivas fueron computadas mediante el método de corrección de Poisson (número de sustituciones aminoacídicas por sitio). Los gaps fueron eliminados del análisis, de forma que se incluyeron 149 posiciones en los datos de partida. Se indican las diferentes clases de GSTs y el grupo formado por EgGST3 y su ortólogo en *E. multilocularis*. Se señalan además EgGST1 y EgGST2 con un punto en el grupo correspondiente. En la sección “Anexo” se presenta el número de acceso en GeneBank de las secuencias incluidas en el análisis, así como el organismo del que provienen.

Para confirmar los resultados obtenidos, se trabajó en colaboración con el Dr. Andrés Iriarte y el Dr. Héctor Musto del Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma de la Facultad de Ciencias. El trabajo tuvo como objetivo profundizar en el estudio de la clasificación y origen tanto de EgGST2 como de EgGST3, empleando diferentes herramientas informáticas. Este análisis confirmó los resultados obtenidos previamente, que indican que EgGST3 no se agruparía con ninguna de las clases de GSTs citosólicas. Vale la pena mencionar que estos resultados y los obtenidos del trabajo en conjunto con los Doctores Iriarte y Musto fueron publicados en una revista arbitrada (Iriarte A. y col., 2012).

3.1.3. Residuos conservados

Se buscaron secuencias características de las GSTs en general, así como los residuos de EgGST3 que se encuentran conservados en las clases Omega y Sigma. En particular, se analizaron aquellos residuos involucrados en el mecanismo catalítico. Para esto, se construyeron alineamientos independientes con las GSTs de clase Sigma y Omega utilizadas para la obtención del árbol filogenético.

En las GSTs de mamíferos se ha identificado una secuencia consenso conservada en el dominio N-terminal, SNAIL/TRAIL, la cual tiene su homóloga en las enzimas de parásitos (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). En estos organismos la secuencia presenta variaciones que pueden ser útiles para diferenciarlas de las enzimas de mamíferos, y está presente en gran parte de las secuencias analizadas (Nguyen H. A. y col., 2010). En GSTs parasitarias se han identificado motivos SLAIL/ SNAIN/ SQAIV, entre otros. Por ejemplo, en EgGST2 se encuentra la secuencia SMAIAR entre las posiciones 74 y 78 (Arbildi P., 2013). En EgGST3 está presente la secuencia SAILR entre las posiciones 75 y 79 (Figura 9).

Un primer aspecto a resaltar del alineamiento obtenido con las enzimas de clase Sigma, es que todas ellas presentan una tirosina conservada (n) que correspondería al residuo catalítico de las Y-GSTs (Atkinson H. J. y Babbitt P. C., 2009) (Figura 9). Las secuencias GST3 (tanto EgGST3 como EmGST3) presentan una tirosina (Y12) que si bien se encuentran muy cercanas a las de las otras proteínas (Figura 9), no se alinean exactamente con estas. Así, se plantea la interrogante de si el residuo Y12 pueda estar involucrado en la catálisis. En este sentido, en todas las GSTs de clase Sigma analizadas se encontraron los tres residuos descritos como importantes para el mecanismo catalítico (Angelucci F. y col., 2005): un residuo de glutamato (n+8), uno de arginina (n+11), ambos ausentes en las GST3, y por último un residuo de aspartato en la posición n+22 identificado como D36 en GST3.

Además, para la estabilización del GSH en el sitio activo de la enzima, se reportaron como importantes los residuos de triptófano y lisina ubicados, por ejemplo, en la posición 45 y

49 en EgGST2, así como la serina 75 (Asojo O. A. y col., 2007). Estos tres residuos están conservados en todas las GSTs de clase Sigma (Figura 9). En GST3 sólo fue identificado el triptófano en la posición 44.

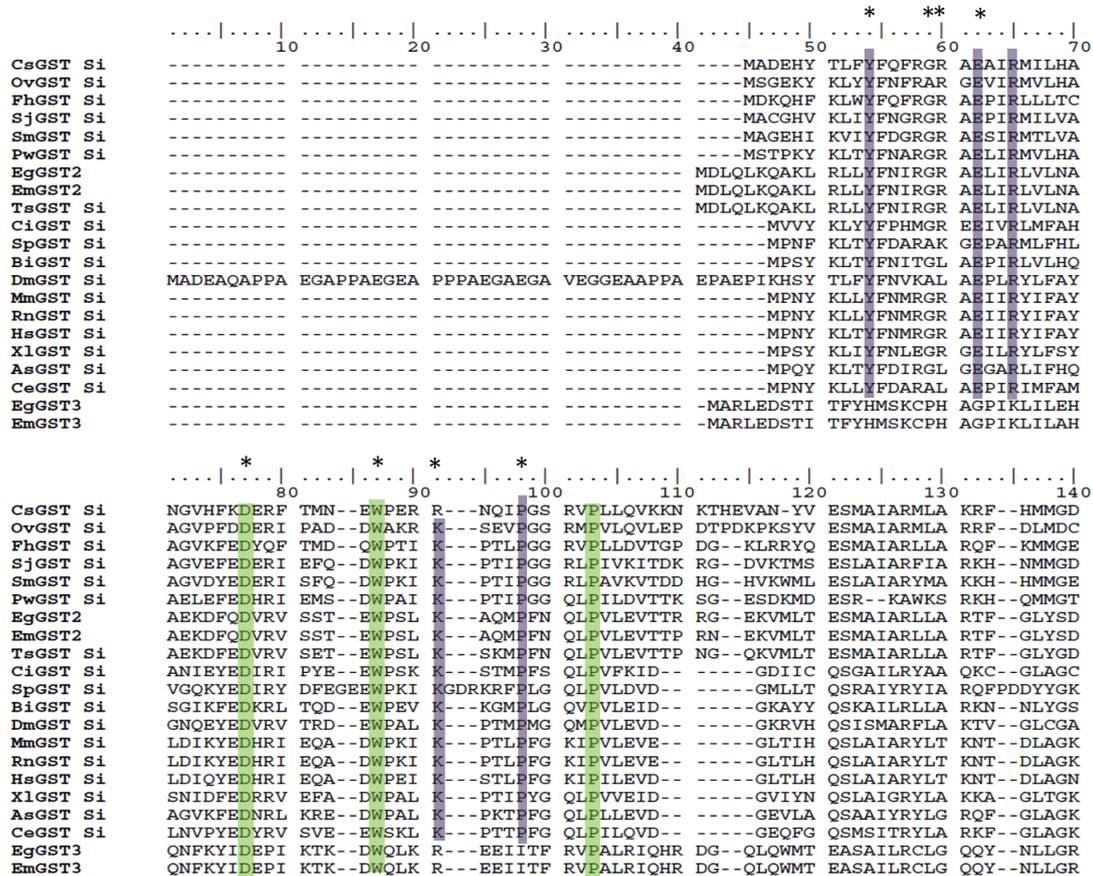


Figura 9. Alineamiento de secuencias de la región N-terminal GSTs de clase Sigma con EgGST3. Se incluyeron todas las secuencias de esta clase utilizadas para construir el árbol filogenético (ver anexo). Se muestran en violeta los residuos conservados en las GSTs de clase Sigma que no están presentes en GST3 y en verde los que fueron identificados en todas las secuencias incluyendo GST3. Los asteriscos sobre el alineamiento señalan los residuos involucrados en la unión del glutatión y por lo tanto en el mecanismo catalítico descrito para la clase Sigma (Angelucci F. y col., 2005; Asojo O. A. y col., 2007).

Con respecto al alineamiento de GST3 con las proteínas de clase Omega, podemos observar la presencia de una cisteína conservada en todas las enzimas analizadas (C17 en EgGST3), que constituiría el residuo catalítico de esta clase (Board P. G. y col., 2000) (Figura 10). Se identificó además un residuo conservado de prolina, P18 en EgGST3, que sería importante para la correcta orientación de la cisteína catalítica.

Asimismo, se observan algunos residuos conservados en todas las GSTs de clase Omega y también en GST3, que participarían en la unión del glutatión: E73, V56 y K42 para EgGST3 (Figura 10). Así, podemos pensar que estos residuos podrían estar cumpliendo en las GST3 el

mismo rol que en las de clase Omega. Otro residuo involucrado es la serina 86 en HsGSTO1 (Board P. G. y col., 2000), que está conservada en todas las proteínas de esta clase. En el caso tanto de EgGST3 como de EmGST3, existe un residuo de serina que queda en una posición contigua en el alineamiento a la S86 de HsGSTO1 conservada en las GSTs de clase Omega.

De los otros residuos que se han descrito que forman parte del sitio G en HsGSTO1 y que se encuentran conservados en otras proteínas de esta clase (Board P. G. y col., 2000; Brock J. y col., 2013), se identificaron en EgGST3 sólo una lisina en posición 43 y una prolina en posición 57 (K59 y P73 en HsGSTO1 respectivamente).

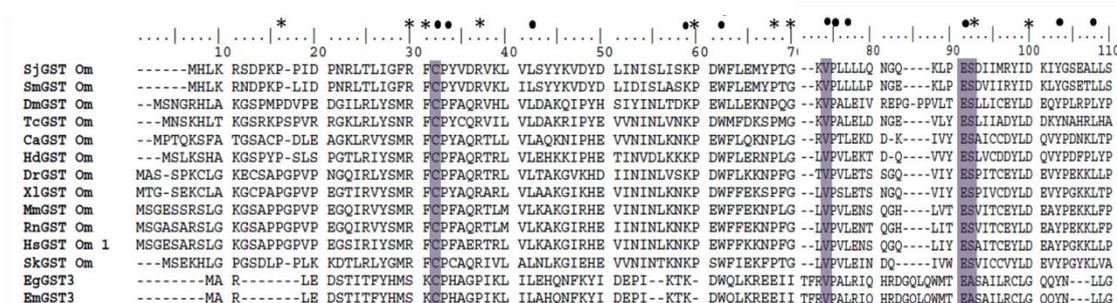


Figura 10. Alineamiento de la región N-terminal de GSTs de clase Omega con EgGST3. Se incluyeron todas las secuencias de esta clase utilizadas para construir el árbol filogenético (ver anexo). Los puntos sobre el alineamiento señalan los residuos conservados en todas las secuencias, y los asteriscos aquellos que se encuentran en todas las GSTs analizadas excepto GST3. Se señalan en violeta los residuos involucrados en la unión del glutatión descritos para la clase Omega (Board P. G. y col., 2000).

3.2. Discusión

Como se ha mencionado, las GSTs citosólicas pueden agruparse en función de varias propiedades como su secuencia aminoacídica, en particular su dominio N-terminal, su especificidad de sustratos, su reconocimiento por anticuerpos específicos para diferentes GSTs, su punto isoeléctrico, entre otras (Board P. G. y Menon D., 2013). Cada una de estas clases ha sido asociada a diferentes funciones, por lo que la clasificación de EgGST3 puede proporcionar información acerca de sus posibles roles en el parásito.

En esta sección nos centramos en las características de la secuencia de aminoácidos de EgGST3 para obtener información sobre su origen y posibles funciones. Al analizar la identidad de secuencia de EgGST3 con diferentes GSTs parasitarias, encontramos que el mayor porcentaje corresponde a las enzimas de clase Sigma parasitarias, en particular a las GSTs de *S. mansoni* y *S. japonicum*. Sin embargo, los porcentajes obtenidos son, en todos los casos, menores al 30%. Teniendo en cuenta que las proteínas que forman parte de una misma clase presentan al menos un 40% de identidad de secuencia (Hayes J. D. y col., 2005), EgGST3 no

parece pertenecer a ninguna de las clases descritas hasta el momento. De todas formas, debemos tener en cuenta que este criterio es arbitrario y resulta difícil de aplicar cuando la homología es limitada como en este caso (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995), por lo que no es definitivo.

Previamente, se había clasificado a EgGST1 y EgGST2 dentro de las GSTs citosólicas de clase Mu y Sigma respectivamente (Fernandez V. y col., 2000; Arbildi P., 2013). Se utilizó una estrategia similar para clasificar a EgGST3 mediante alineamientos de secuencias y la construcción de árboles filogenéticos. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes. Las relaciones filogenéticas observadas sugieren que EgGST3 no se agrupa con ninguna de las clases de GSTs citosólicas previamente descritas. Esta proteína se encuentra entre el grupo de las GSTs de clase Sigma y el de las de clase Omega. Si consideramos los datos de identidad de secuencia mencionados anteriormente y la cercanía a nivel filogenético de EgGST3 con las enzimas de clase Sigma, podríamos pensar que esta se encuentra relacionada con esta clase de GSTs. Sin embargo, la proximidad con la clase Omega resultó inesperada, lo que nos llevó a plantearnos nuevos estudios para verificar la información obtenida. En este sentido, consideramos que las características del software empleado para realizar los alineamientos y el árbol filogenético podrían estar afectando nuestros resultados. Así, se utilizaron otros programas informáticos con el fin de discriminar si la separación de EgGST3 respecto al resto de las proteínas refleja lo ocurrido a nivel evolutivo o podría ser producto de las características particulares de la metodología utilizada. Es por esto que se decidió realizar un nuevo análisis utilizando otros programas informáticos. Sin embargo, los resultados obtenidos con la nueva metodología coinciden con los obtenidos previamente, de forma que podemos pensar que EgGST3 en realidad no se agrupa con ninguna de las clases de GSTs citosólicas. De hecho, la estimación de la divergencia de EgGST3 respecto a las otras GSTs parasitarias indica que la distancia es tan grande que se podría considerar a GST3 como una nueva clase de GSTs (Iriarte A. y col., 2012).

Por otra parte, se ha observado que dentro de una clase de GSTs, la región más conservada es la N-terminal, mientras que las diferencias aumentan en la región C-terminal (da Fonseca R. R. y col., 2010). Al realizar una búsqueda de dominios conservados en EgGST3 en la base de datos CDD (Conserved Domain Database) se observó que sólo el C-terminal presenta características que permiten agruparlo con las GSTs de clase Sigma (Iriarte A. y col., 2012). En particular, se detectaron los residuos involucrados en la unión del sustrato hidrofóbico (sitio H) así como los que forman parte de la interface entre subunidades. Mientras tanto, el dominio N-terminal no pudo ser incluido en ninguna categoría. Se realizaron además árboles filogenéticos en base a dichas regiones por separado. Las relaciones de EgGST3 con otras

proteínas difieren entre ambas construcciones. Mientras el dominio C-terminal de EgGST3 se agrupa con las GSTs de clase Sigma, el N-terminal tiene un comportamiento similar al observado para la proteína entera. A este hecho debemos agregar que la estructura del gen *EgGST3* es similar a la de los genes que codifican proteínas de clase Sigma (Iriarte A. y col., 2012). Esto es importante ya que la estructura génica, incluyendo el número y longitud de exones e intrones, también es conservada entre miembros de una misma clase, y difiere entre proteínas de clases diferentes (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). En conjunto, estos resultados parecen indicar que EgGST3 se podría haber originado a partir de las GSTs de clase Sigma.

Sin embargo, el estudio de los residuos conservados muestra algunos aspectos interesantes en el dominio N-terminal. En este sentido, se identificaron dos posibles residuos catalíticos: una tirosina en la posición 12 y una cisteína en la 17. Como se mencionó previamente, la tirosina es el residuo fundamental para el mecanismo catalítico de las GSTs de clase Sigma, Alfa, Mu y Pi, mientras que la cisteína lo es para la clase Omega (Atkinson H. J. y Babbitt P. C., 2009). Debemos mencionar que la tirosina 12 se encuentra cercana a la tirosina conservada en las Y-GSTs, pero no queda alineada exactamente con esta. Además, no fueron identificados en EgGST3 los residuos de glutamato y arginina conservados en las posiciones (n+8) y (n+11) respectivamente de las GSTs de clase Sigma, y que serían importantes para el adecuado funcionamiento de la tirosina catalítica. Esto nos hace pensar que tal vez el sitio activo funciona de forma diferente al de esta clase de enzimas. Sumado a esto, existen algunas evidencias que sugieren que el dominio N-terminal, y por lo tanto el mecanismo catalítico de EgGST3 se parecería más al de la clase Omega. En este sentido, se identificó un residuo de cisteína (C17) que se alinea perfectamente con la cisteína catalítica de las GSTs de clase Omega. Además, se identificaron otros residuos claves: una P en posición 18, la K42, la V56 y el E73. En HsGSTO-1, los residuos homólogos (K59, V72 y E85) participarían en la unión del glutatión (Board P. G. y col., 2000). Otro residuo involucrado en la unión del GSH en HsGSTO1 es la serina en la posición 86. En el caso de EgGST3, esta serina no queda exactamente alineada con las correspondientes en las otras enzimas de esta clase, sino que queda en una posición contigua. De todas formas, no se puede descartar que esta serina pueda cumplir en EgGST3 los mismos roles que la serina conservada cumple en las otras GSTs de clase Omega. Vale la pena mencionar que la lisina 42 no fue señalada en el alineamiento presentado en el artículo publicado como uno de los residuos conservados (Iriarte A. y col., 2012). Esto se debe a que la posición de esta lisina difiere entre los dos alineamientos, probablemente porque los programas utilizados para construirlos así como las secuencias incluidas en los mismos son diferentes. En particular, en el alineamiento publicado se incluyen secuencias de GSTs de clase Sigma, las cuales no presentan esta lisina conservada, aunque puede observarse que sí lo

hacen las proteínas de clase Omega. De esta forma, EgGST3 podría presentar los residuos involucrados en el sitio activo de las GSTs de clase Omega.

Un aspecto que surge de los alineamientos de secuencias es la presencia de sustituciones aminoacídicas exclusivas de GST3 (Figuras 9 y 10). Algunos de estos cambios podrían afectar la polaridad o la carga de la proteína en una determinada región, lo que podría alterar la estructura y por lo tanto actividad de la enzima.

Hasta el momento no disponemos de la estructura cristalográfica de EgGST3. Sin embargo, se han construido modelos de la misma utilizando como molde diferentes GSTs, los cuales nos han permitido profundizar en la comprensión de la posible estructura del sitio activo. El modelo obtenido utilizando como molde una GST de clase Sigma de *S. mansoni* parece indicar que la orientación de la Y12 en EgGST3 sería opuesta a la que adopta el residuo homólogo en el molde (y en el modelo obtenido para EgGST2), y por lo tanto no sería la adecuada para que ésta pudiera participar en la unión del glutatión (Iriarte A. y col., 2012) (Figura 11). Los modelos construidos muestran además a la C17 y la P18 en la región N-terminal de la primera hélice α . Esto sería importante ya que se ha descrito que esta localización de la cisteína en la cercanía del extremo positivo del dipolo de hélice contribuiría a la disminución del pKa del tiol, aumentando su disponibilidad a pH fisiológico (Board P. G. y col., 2000).

Todo lo mencionado anteriormente sugiere que el sitio activo de EgGST3 estaría más relacionado con el de las enzimas de clase Omega. Esto indicaría que EgGST3 podría presentar actividades enzimáticas propias de dicha clase, en particular la actividad tioltransferasa característica de las glutarredoxinas. Como se desarrollará en secciones posteriores, esta actividad podría ser relevante para el parásito ya que constituiría un mecanismo para la protección del mismo en condiciones de estrés oxidativo. Este hecho adquiere mayor importancia aún teniendo en cuenta que no se han identificado GSTs de clase Omega en el genoma de *E. granulosus* (Iriarte A. y col., 2012).

Además de las actividades enzimáticas, la unión de ligandos no sustratos por parte de EgGST3 también podría verse influida por las características descritas para esta proteína. Recientemente se ha descrito la cristalización de una de las GSTs de clase Omega humanas, HsGSTO1 (Brock J. y col., 2013). A partir de la estructura obtenida, se identificaron los residuos catalíticos conservados con otras GSTs de esta clase y se examinó el sitio de unión para ligandos, que denominaron "sitio L", identificándose algunos residuos involucrados en la unión de los compuestos. Algunos de ellos se encuentran conservados en varias GSTs de clase Omega, o han sido sustituidos por residuos de similares características. Esto podría indicar que las enzimas que comparten estos residuos podrían unir ligandos estructuralmente similares,

que podrían ser acomodados en el sitio L a través del contacto con estos residuos. De todas formas, una misma GST puede unir diferentes tipos de ligandos y no podemos descartar que haya otros residuos involucrados en dicha unión. De hecho, en EgGST3 aparece uno sólo de estos residuos conservados en la clase Omega (L88).

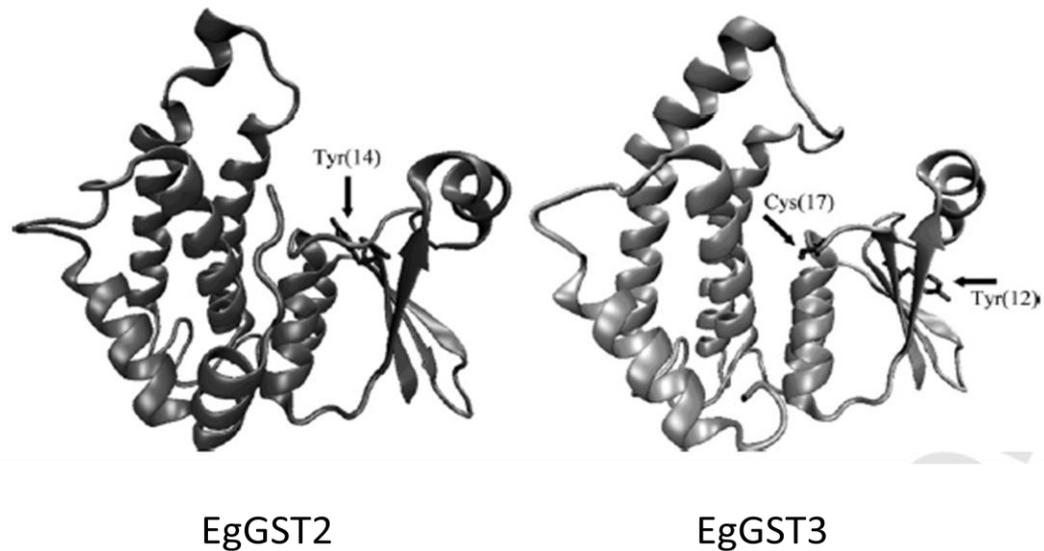


Figura 11. Diagramas del modelado de EgGST2 y EgGST3 utilizando como molde la estructura cristalográfica de una GST de clase Sigma de *S. mansoni* (PDB-ID: 1U3I, cadena "A"). Se indican con flechas los posibles residuos catalíticos: Tyr14 en EgGST2 y Tyr12 y Cys17 en EgGST3. Tomado de Iriarte y col. (2012).

En suma, podemos decir que EgGST3 presenta características particulares que no permiten su clasificación en ninguna de las clases de GSTs citosólicas descritas hasta el momento. Por un lado, los resultados indican que EgGST3 estaría relacionada con la clase Sigma y que podría haberse originado a partir de ella. Sin embargo, el dominio N-terminal presenta algunos residuos característicos de la clase Omega, en particular una cisteína en el sitio activo que participaría en el mecanismo catalítico. Esto sugeriría que EgGST3 podría presentar actividades enzimáticas propias de la clase Omega, lo cual sería relevante ya que no se han identificado GSTs de esta clase en cestodos.

Capítulo 4. Expresión de EgGST3 recombinante

En la actualidad las proteínas recombinantes son una herramienta muy útil para analizar el papel de dichas proteínas en los procesos celulares. A continuación se describen los resultados obtenidos en la optimización de la producción de EgGST3 recombinante en *Escherichia coli* y la preparación de antisueros específicos. Asimismo, se presenta la detección de las EgGSTs en protoesclólices.

4.1. Resultados

4.1.1. Expresión de EgGST3 recombinante

La región codificante del gen *EgGST3* fue clonada en el vector pET5a (Novagen). En primera instancia se transformaron células de la cepa BL21[DE3] con la construcción EgGST3-pET5a, y en paralelo con el vector no recombinante como control. La expresión se indujo según el protocolo descrito por Harispe y col (2010), utilizado previamente para la expresión de EgGST1. En ambos casos se separó antes de la inducción una alícuota del cultivo a la que no se le agregó IPTG (control sin inducir). Vale la pena mencionar, que en estas condiciones experimentales no se observa la expresión de proteínas de la masa molecular esperada (aproximadamente 25kDa) en el cultivo de células transformadas con el vector no recombinante (Figura 12). Por otra parte, en la fracción soluble de los lisados bacterianos de cultivos transformados con la construcción EgGST3-pET5a no se observan diferencias respecto del control sin inducir (Figura 12). Sin embargo, al analizar la fracción insoluble se observó una importante cantidad de proteína recombinante (Figura 13).

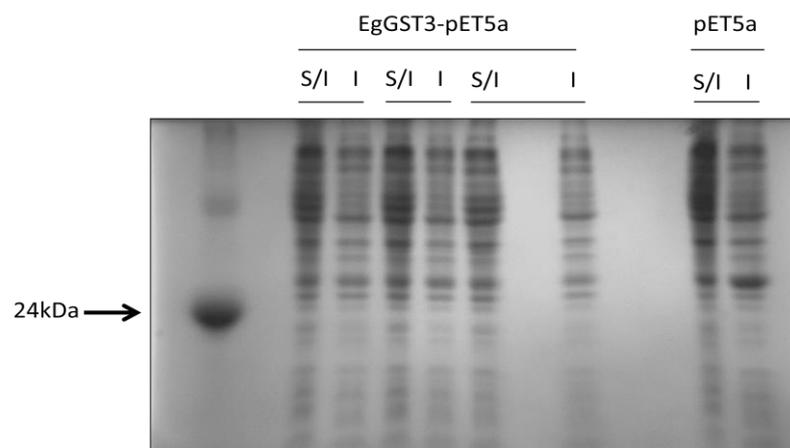


Figura 12. Expresión de EgGST3 utilizando el protocolo de referencia. SDS-PAGE en el que se analizaron las fracciones solubles de los cultivos sin inducir (S/I) e inducidos (I) para tres clones diferentes conteniendo el plásmido recombinante EgGST3-pET5a y para un clon conteniendo el vector pET5a no recombinante.

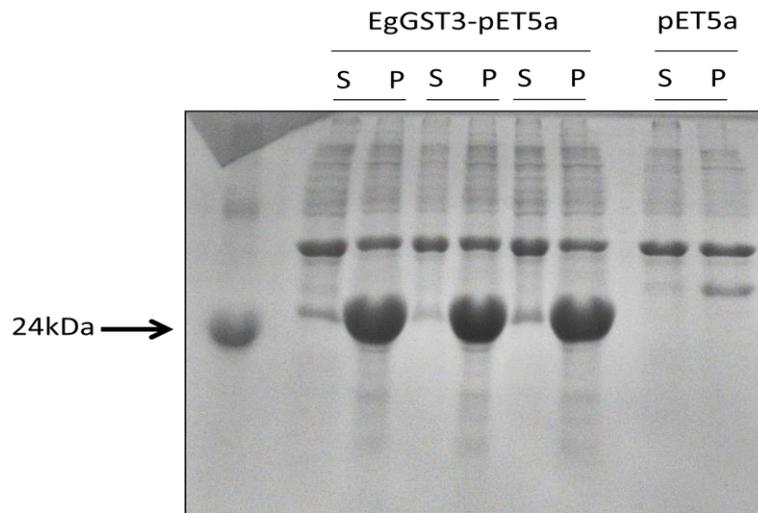


Figura 13. Expresión de EgGST3 utilizando el protocolo de referencia. SDS-PAGE en el que se analizaron las fracciones soluble (S) e insoluble (P) de los tres clones diferentes presentados en la Figura 6.

Dado que no se obtuvo la proteína recombinante en forma soluble, fue necesario modificar el protocolo de expresión. Se realizaron cambios en las condiciones de inducción y lisis celular y se analizó la expresión de EgGST3 en diferentes cepas de *E. coli*. Por otro lado, se ensayó la solubilización de EgGST3 de cuerpos de inclusión y su posterior renaturalización.

4.1.2. Cambios en las condiciones de inducción de la expresión

El nivel de expresión de una proteína recombinante puede afectar significativamente la solubilidad de la misma (Brondyk W. H., 2009). Así, se utilizaron diferentes estrategias para reducir la cantidad de proteína sintetizada buscando aumentar la solubilidad de rEgGST3.

Primeramente, se disminuyó la concentración de inductor y la temperatura de inducción. Se indujo la expresión tanto a 37°C como a 25°C, y para cada temperatura se probaron concentraciones de IPTG en el rango de 0.03 a 0.4 mM. A 37°C no se observaron diferencias importantes en la cantidad de proteína producida para las diferentes concentraciones de inductor analizadas (Figura 14). A 25°C hay una menor expresión de rEgGST3, la cual se mantuvo constante para todas las concentraciones de IPTG utilizadas (datos no mostrados). Tanto a 37°C como a 25°C, en todas las condiciones ensayadas, casi la totalidad de la proteína permaneció insoluble (Figura 14).

Por otro lado, se disminuyó el tiempo de inducción. Se utilizó una única concentración de IPTG (0.1mM) y tanto a 37°C como a 25°C se indujo la expresión de EgGST3 durante 15, 30, 60 y 120 minutos. Los niveles de proteína sintetizada fueron similares para los diferentes tiempos estudiados a cada temperatura, y la solubilidad de EgGST3 se mantuvo en niveles bajos y prácticamente constantes en todas las condiciones analizadas (datos no mostrados).

Vale la pena mencionar que en la fracción insoluble del control sin inducir se observó una pequeña proporción de proteína recombinante (Figura 14). Estos niveles de expresión basal fueron disminuidos en ensayos posteriores agregando al cultivo glucosa en una concentración de 1% (datos no mostrados).

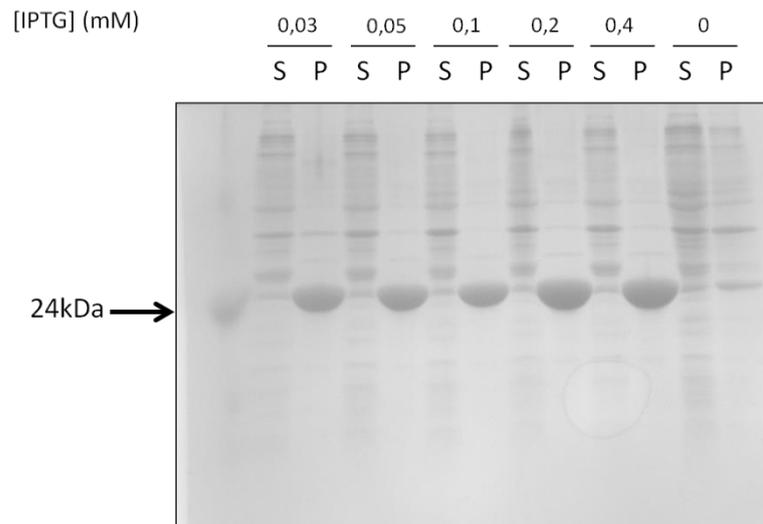


Figura 14. Cambios en la concentración de inductor a 37°C. SDS-PAGE en el que se analizaron las fracciones soluble (S) e insoluble (P) de cultivos a los que se les agregó IPTG en concentraciones de 0, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 mM.

4.1.3. Cambio en la cepa hospedadora

Una de las ventajas de la expresión en *E. coli* es que existen diferentes cepas, cada una de ellas con características particulares, que pueden favorecer la expresión en forma soluble de diferentes tipos de proteínas. En función de estas características se seleccionó un conjunto de cepas que podrían mejorar la expresión de EgGST3: BL21[DE3]pLysS y BL21[DE3]pLysE que permitirían disminuir los posibles efectos tóxicos de EgGST3, RIL[DE3], Rosetta[DE3] y RP[DE3], que podrían contribuir a compensar las diferencias en el uso de codones entre *E. coli* y *E. granulosus*, y C41[DE3] y C43[DE3], que han facilitado la expresión de proteínas que no han podido producirse en la cepa BL21[DE3] de la que derivan. La expresión en cada una de las cepas fue comparada con la correspondiente en la cepa de referencia BL21[DE3]. Se utilizó el protocolo de referencia variando únicamente la concentración de IPTG para cada cepa según lo recomendado por el proveedor.

Al expresar EgGST3 en las cepas RIL[DE3] y BL21[DE3]pLysS se observó una pequeña disminución de la cantidad de proteína sintetizada respecto a la cepa BL21[DE3], pero esto no influyó en la solubilidad (datos no mostrados). En todas las condiciones trabajadas se obtuvieron proporciones de proteína soluble similares a los alcanzados con la cepa de

referencia. A pesar de esto, los mejores resultados se obtuvieron al expresar EgGST3 en la cepa C43[DE3], en la que se logró aumentar mínimamente la proporción de proteína soluble con respecto a la cepa BL21[DE3] (datos no mostrados). Se decidió ensayar la purificación de la proteína soluble obtenida mediante afinidad al GSH. En dicho ensayo, la proteína no fue retenida en la columna por lo que no pudo ser purificada por este método (Figura 15).

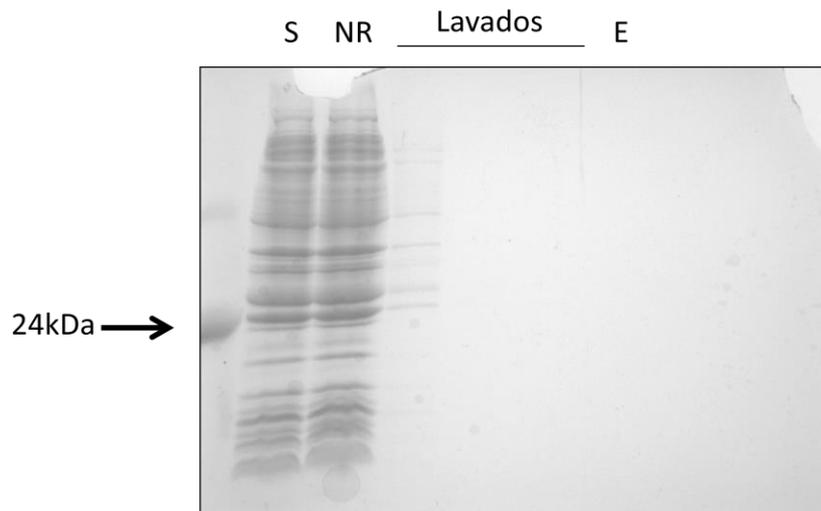


Figura 15. Purificación de EgGST3 por afinidad al GSH. Se muestra un SDS-PAGE en el que se analizó la fracción soluble obtenida al expresar EgGST3 en la cepa C43[DE3] (S), la fracción que no fue retenida por la columna (NR), tres lavados, y el eluido de la columna (E).

4.1.4. Cambios en las condiciones de lisis celular

Un elemento importante para la expresión de proteínas recombinantes solubles es el proceso realizado para la lisis celular. Uno de los aspectos relevantes es el pH de la solución de extracción. El mismo debe estar alejado del punto isoeléctrico (pI) de la proteína, ya que en ese punto hay un mínimo de solubilidad (Benedek G. B. y Villars F. M. H., 2000). Utilizando el programa BioEdit se determinó que el pI teórico de EgGST3 es de 7.71, muy cercano al pH 7.4 del buffer de lisis utilizado hasta el momento (PBS pH7.4, Tritón X-100 1%, EDTA 5mM). Se decidió cambiar dicho buffer, utilizándose dos amortiguadores diferentes: 10mM KH_2PO_4 pH 6.5 y 20mM Tris-HCl pH 8.0, ambos conteniendo Tritón X-100 1% y EDTA 5mM.

Se realizó la expresión en la cepa BL21[DE3], pero en ningún caso se observaron diferencias en la proporción de proteína soluble con respecto a la solución inicial (Figura 16). Además, durante los ensayos de solubilidad de EgGST3 en las cepas RIL[DE3] y BL21[DE3]pLysS se pudo analizar la misma utilizando las tres soluciones de lisis. Nuevamente, EgGST3 se encontró casi en su totalidad en la fracción insoluble, tanto cuando se trabajó con la solución

de referencia como cuando se utilizaron las otras dos soluciones de lisis (Figura 16). De esta forma se decidió continuar trabajando en ensayos posteriores con la cepa BL21[DE3] a pH 7.4.

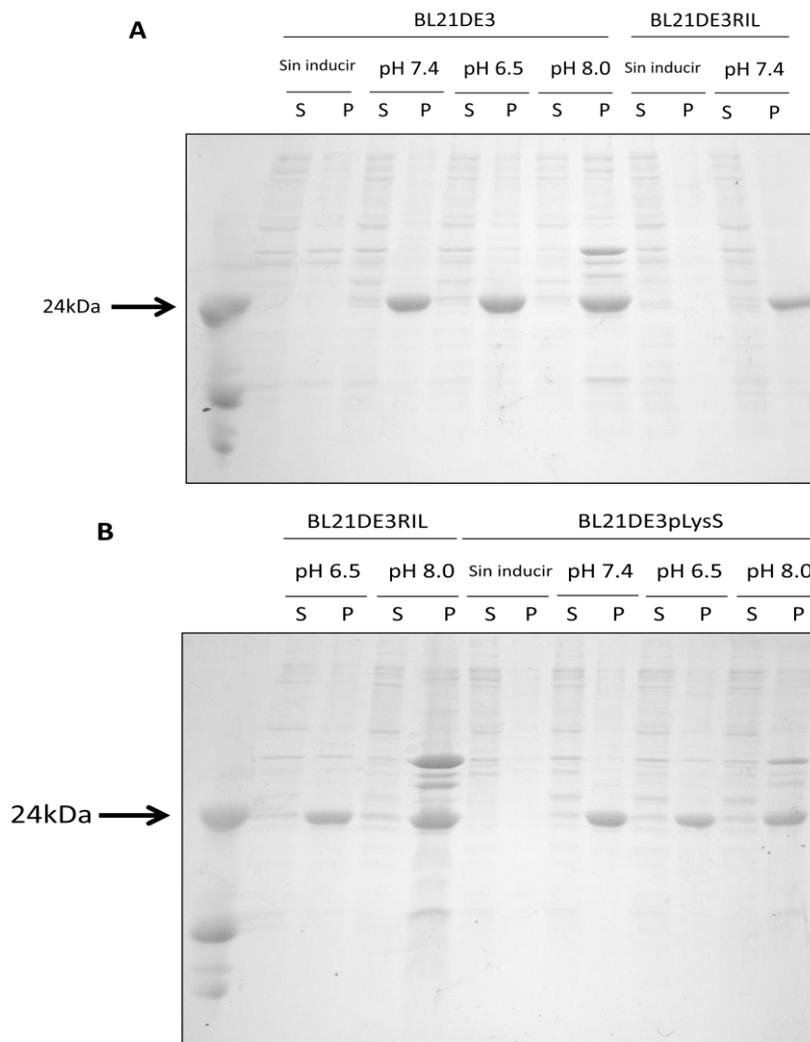


Figura 16. Expresión de EgGST3 en diferentes cepas de *E. coli* y utilizando diferentes soluciones de lisis para su extracción. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones soluble (S) e insoluble (P) obtenidas al expresar EgGST3 en las cepas BL21DE3 (referencia), BL21DE3RIL y BL21DE3pLysS. Para cada cepa se probaron tres soluciones de lisis cada una con un pH diferente: 7,4 (referencia), 6,5 y 8,0.

La composición de la solución de lisis debe ser optimizada para cada proteína en particular. En general, contiene inhibidores de proteasas, detergentes, agentes reductores, entre otros, para prevenir la degradación de la proteína y favorecer su solubilidad. Teniendo esto en consideración, se modificaron algunos de sus componentes y su concentración. Se comparó la solubilidad de EgGST3 en cada una de las soluciones con la de referencia (PBS-Tritón 1%-EDTA 5mM; pH 7,4).

En primer lugar, se probaron variantes del detergente y de la concentración del mismo. La solución de referencia contiene Tritón X-100 1%, un detergente no iónico. Se disminuyó la

concentración de este hasta 0.1%, pero la solubilidad de EgGST3 no se modificó. Luego, se probó cambiar el detergente, usando CHAPS, un detergente zwitteriónico. Se analizaron concentraciones de 0.1 y 2%, obteniéndose en ambos casos una mayor proporción de proteína soluble, aunque, como ha ocurrido en otros ensayos realizados a lo largo de este trabajo, el aumento no fue considerable (datos no mostrados).

Como se mencionó anteriormente, el glicerol puede tener un efecto directo favoreciendo el plegamiento de las proteínas (Bowden G. A. y Georgiou G., 1990). Es por esto que se analizó la incorporación de glicerol en la solución de lisis, en concentraciones de 0.4 y 20%. En esta última condición se obtuvo más proteína soluble respecto al control sin glicerol, aunque nuevamente el aumento fue mínimo (datos no mostrados).

Finalmente, y considerando que EgGST3 presenta 4 residuos de cisteína que podrían oxidarse durante y después de la lisis celular, se ensayó la adición de agentes reductores en la solución de lisis. Tanto el mercaptoetanol (50mM) como el DTT (1mM) mejoraron la solubilidad de EgGST3 pero no significativamente (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió analizar la solubilidad de EgGST3 utilizando la solución de lisis de referencia conteniendo 20% de glicerol y 1mM de DTT. Nuevamente, la proporción de proteína soluble fue ligeramente superior a la obtenida hasta el momento con la solución de referencia. Se intentó realizar una purificación de la proteína presente en la fracción soluble por afinidad al GSH pero EgGST3 no fue retenida por la columna (datos no mostrados).

4.1.5. Cambio en el vector de expresión

Luego de ensayar diferentes condiciones de expresión de EgGST3 sin lograr su obtención en forma soluble, se decidió cambiar de vector de expresión. En este caso, se optó por otro vector de la serie pET, el pET28a (Novagen). Este permite expresar la proteína fusionada, tanto en su extremo N- como C-terminal, con un péptido compuesto por seis residuos de histidinas, que facilitará su purificación por afinidad de dicho péptido a una resina de níquel-agarosa. Este aspecto es de particular relevancia dado que, por lo observado en los ensayos anteriores, EgGST3 no se podría purificar por afinidad al GSH.

Se clonó la región codificante de EgGST3 en el vector pET28a de forma de que la proteína se expresara fusionada con una cola de histidinas en su extremo N-terminal. Se analizó la expresión en la cepa BL21[DE3] siguiendo el protocolo de referencia. Nuevamente, EgGST3 se expresó en mayor proporción en forma insoluble en dichas condiciones (datos no mostrados). De todas formas, se purificó la proteína de la fracción soluble por afinidad a una resina de Ni-agarosa y se determinó la actividad GST. Estos ensayos permitieron detectar

actividad enzimática de EgGST3 (Iriarte A. y col., 2012), aunque la proteína purificada no fue suficiente para llevar a cabo su caracterización.

4.1.6. Renaturalización de la proteína de cuerpos de inclusión

Como se mencionó anteriormente, la expresión en cuerpos de inclusión presenta algunas ventajas relacionadas con los importantes niveles de proteína que se pueden obtener y las facilidades en su purificación. Una vez que se tienen los cuerpos de inclusión, los mismos deben ser solubilizados y se deben optimizar las condiciones para la renaturalización de la proteína.

En esta parte del trabajo se contó con la colaboración de la Dra. Paula Tucci (Laboratorio Celsius), que nos orientó en la solubilización y renaturalización de EgGST3 siguiendo un protocolo optimizado por su grupo de trabajo para otras proteínas. El mismo implica, en primera instancia, la solubilización de los cuerpos de inclusión en un buffer conteniendo cloruro de guanidinio 6M. Para la renaturalización se utiliza, primero DTT, y luego un “buffer de refolding” que contiene arginina, EDTA, sorbitol y el par redox cisteína/cistina, con el que se incubaba la proteína durante toda la noche a 8°C. Al retirar la solución al día siguiente se observaba claramente que la misma estaba turbia debido a la precipitación de proteína. De todas formas, se centrifugó para separar la fracción soluble de la insoluble y se realizaron varias etapas de concentración de la proteína para poder analizarla por SDS-PAGE. El estudio confirmó que la totalidad de la proteína había precipitado nuevamente. Se realizaron además ensayos de actividad GST en la fracción soluble pero no se detectó actividad (datos no mostrados).

De esta forma, los protocolos utilizados no permitieron obtener EgGST3 en forma soluble y activa, por lo que, sería necesario ensayar nuevas condiciones de renaturalización para alcanzar aquellas más adecuadas para nuestra proteína. Sin embargo, teniendo en cuenta todos los esfuerzos realizados hasta el momento y por una cuestión de tiempo y de costos se decidió abandonar los intentos de expresión de EgGST3 en este sistema. De todas formas, dentro de los objetivos del grupo se encuentra la expresión de EgGST2 y EgGST3 en un sistema eucariota, levaduras (Proyecto I+D FCE-ANII, 2013-2015).

4.2.7. Detección de EgGST3 en PEs

La proteína EgGST3 recombinante obtenida en forma de cuerpos de inclusión fue utilizada por nuestro grupo de trabajo para la producción de antisueros específicos tanto de ratón como de conejo (ver Materiales y métodos). Los mismos reconocieron en un lisado de PEs por *western-blot* una banda de aproximadamente 25kDa, que correspondería a EgGST3.

Además, ambos antisueros reconocieron a la proteína recombinante expresada en la fracción insoluble (Figura 17 y datos no mostrados). Se observa además que los antisueros reconocen otras proteínas presentes en los lisados bacterianos. Dado que los antisueros fueron producidos a partir de proteína purificada de un lisado bacteriano, es posible que hubiera algunas proteínas de *E. coli* en la preparación administrada tanto a los ratones como a los conejos.

Un aspecto importante a destacar, y que será relevante para diferentes ensayos realizados en este trabajo, es que los anticuerpos anti-EgGST3 producidos, tanto de ratón como de conejo, no reconocen a rEgGST1 ni a rEgGST2 (Figura 17 y comunicación con Verónica Fernández, quien realizó la verificación con los sueros de conejo).

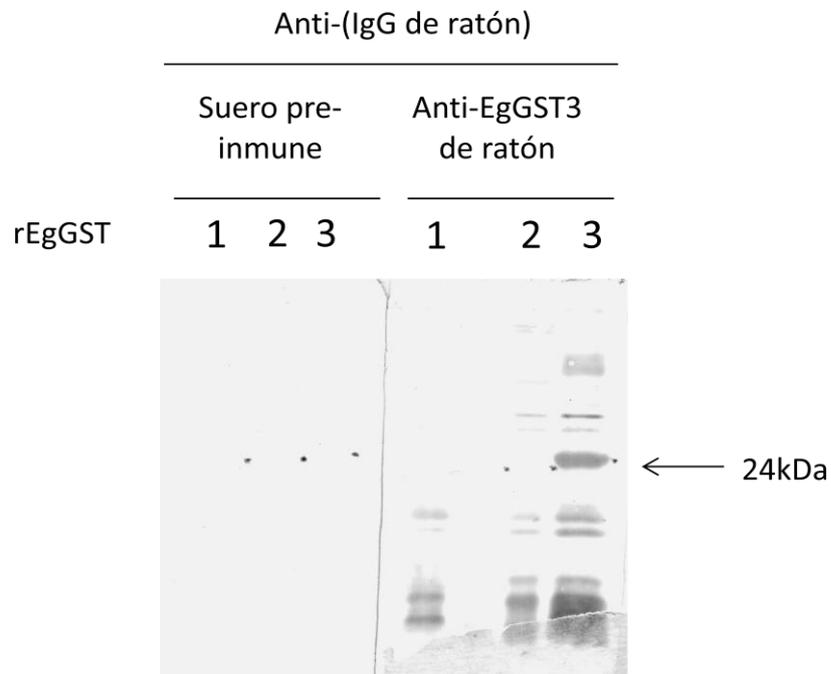


Figura 17. Western-blot en el que se enfrentó el suero anti-EgGST3 producido en ratón y el correspondiente suero pre-inmune, a las tres EgGSTs recombinantes (rEgGST). Se indica la rEgGST cargada en cada carril (1, 2 y 3) y el suero al que se las enfrentó (suero pre-inmune y anti-EgGST3 en dilución 1/250). El revelado se realizó con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (dilución 1/1000) según se describe en Materiales y Métodos.

La presencia de EgGST3 en PEs se analizó además por electroforesis bidimensional y western-blot. Vale la pena mencionar que este estudio se extendió a las otras dos EgGSTs. Este trabajo fue realizado en el marco de una pasantía realizada en el Laboratorio de Genómica Estructural y Funcional del Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Río Grande del Sur (Porto Alegre, Brasil), bajo la supervisión del Dr. Henrique Ferreira. La misma fue financiada por la organización AMSUD-Pasteur a través de su programa “Regional research training fellowships program/ young researchers”.

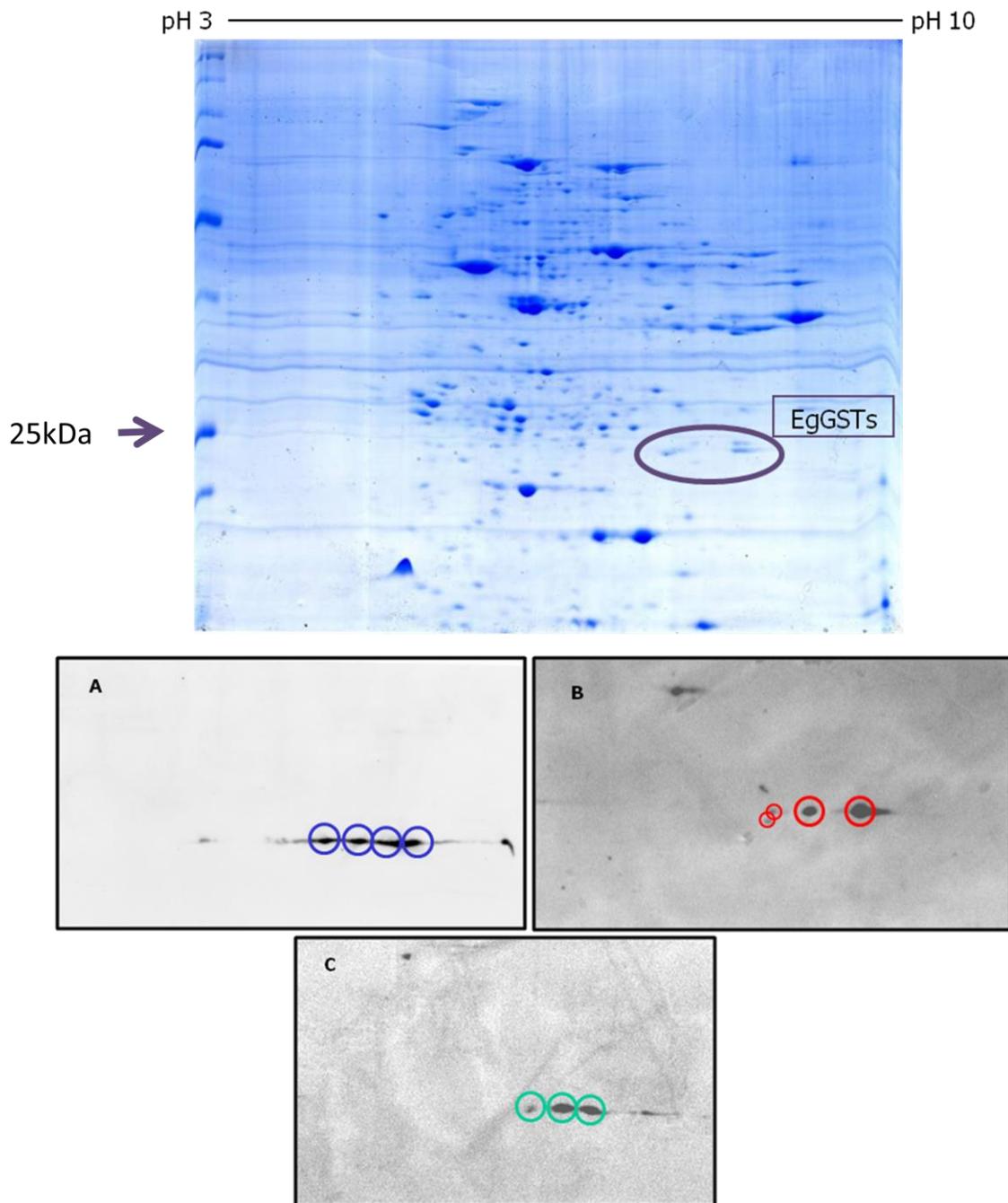


Figura 18. Detección de EgGSTs en PEs. En la parte superior de la imagen se muestra una electroforesis bidimensional de extractos de PE teñida con Coomassie y con una elipse se la región del gel en la que se encuentran las EgGSTs. En la parte inferior se muestran los western-blot realizados para la detección de cada una de las EgGSTs: (A) EgGST1, (B) EgGST2, (C) EgGST3. Los sueros de conejo fueron utilizados en diluciones 1/50000, 1/20000 y 1/10000 respectivamente.

En primer lugar, se analizó el perfil de proteínas de un extracto de PEs por electroforesis bidimensional, visualizándose por tinción con Coomassie. El patrón general de los spots observados coincide con el descrito por Monteiro y cols. (2010) (Figura 18). Posteriormente, se realizaron electroforesis bidimensionales seguidas de western-blot para cada una de las subunidades. Los mismos permitieron detectar varios spots con cada uno de los antisueros

específicos para cada EgGST, sugiriendo la presencia de varias isoformas o de diferentes modificaciones postraduccionales de estas (Figura 18). No se detectaron en EgGST3 posibles sitios para N- y O-glicosilación, pero sí se identificaron sitios para la fosforilación tanto por serin como por treonin y tirosinquinazas.

4.3. Discusión

La expresión de proteínas recombinantes adquiere gran importancia en la actualidad para el estudio del rol de dichas proteínas en una gran variedad de procesos celulares. Existen diversos sistemas de expresión, tanto eucariotas como procariotas, cada uno de ellos con características particulares que los harán apropiados para la expresión de diferentes clases de proteínas (Sørensen H. P., 2010). La elección del sistema a utilizar va a depender de diversos factores, en particular, características de la proteína como su masa, la presencia de enlaces disulfuro y modificaciones postraduccionales, si es una proteína citosólica, de membrana o secretada, así como su posterior aplicación ya sea en estudios estructurales, ensayos de actividad *in vitro*, producción de anticuerpos o estudios *in vivo* (Brondyk W. H., 2009). El más utilizado de estos sistemas es *E. coli*, debido a su simplicidad y su bajo costo, y al amplio conocimiento de este organismo a nivel genético, bioquímico y molecular. Esto brinda una gran variedad de herramientas y recursos para optimizar la expresión, mejorando el rendimiento y la calidad de la proteína obtenida (Terpe K., 2006). Así, se ha optimizado en *E. coli* la producción de proteínas en diferentes compartimientos celulares (citosol, periplasma o incluso la secreción hacia el medio extracelular), los medios y temperaturas de expresión, los vectores y las cepas bacterianas utilizadas, entre otros (Sorensen H. P. y Mortensen K. K., 2005a; Terpe K., 2006). Nuestro grupo ha adquirido experiencia en la expresión de EgGSTs en este sistema, en el que se produjo EgGST1 en su forma funcionalmente activa y en niveles suficientes para su posterior caracterización (Harispe L. y col., 2010). Posteriormente, se comenzaron los ensayos de expresión de EgGST2 y EgGST3, utilizando el protocolo seguido para la expresión de EgGST1 como referencia. Sin embargo, hasta el momento, EgGST2 no ha podido ser expresada en forma soluble en este sistema, lo que ha impedido su caracterización (Arbildi P., 2013). En este trabajo, se siguió el mismo camino para expresar EgGST3 en *E. coli* utilizando el mismo protocolo, obteniéndose grandes cantidades de proteína recombinante, pero casi en su totalidad en forma insoluble. Se han descrito importantes dificultades en la producción de muchas proteínas en *E. coli*, principalmente de origen eucariota, que forman agregados denominados cuerpos de inclusión (Sorensen H. P., 2010). El mecanismo por el cual se forman estos agregados no es totalmente comprendido, aunque se ha propuesto que se

establecerían interacciones no covalentes hidrofóbicas e iónicas entre proteínas parcialmente plegadas. De todas formas, se ha descrito la presencia en los cuerpos de inclusión de proteínas con conformaciones secundarias nativas (Singh S. M. y Panda A. K., 2005; Martínez-Alonso M. y col., 2009). Se ha correlacionado la formación de cuerpos de inclusión con la cantidad de residuos que conforman la proteína, su carga promedio e hidrofobicidad, la proporción de residuos que forman parte de estructuras en forma de vueltas y la cantidad de residuos de cisteína y prolina (Makrides S. C., 1996).

Uno de los factores que influiría en el plegamiento, y por lo tanto en la posibilidad de formación de cuerpos de inclusión, es la velocidad de la síntesis proteica. Se ha descrito que las importantes diferencias entre las maquinarias de traducción determinan que la velocidad de este proceso en *E. coli* sea aproximadamente diez veces mayor que la observada en eucariotas. Esto lleva a la acumulación de importantes cantidades de proteína recombinante que no han adquirido su conformación nativa (Brondyk W. H., 2009). Uno de los elementos que influyen en la velocidad de la traducción, y que debe ser considerado a la hora de expresar una proteína recombinante en un sistema heterólogo (Angov E., 2011), es el uso de los diferentes codones sinónimos que existen para los aminoácidos. Cada especie utiliza estos codones con diferente frecuencia, la cual depende de la abundancia de los correspondientes tARNs. En la Tabla 5 se presentan los codones menos frecuentes en el genoma de *E. coli* (Sharp P. M. y col., 2010). En general, hay codones que son utilizados con mayor frecuencia que el resto en todos los genes, y esta preferencia es más marcada en aquellos que presentan mayores niveles de expresión. Existen entonces algunos codones poco utilizados que actuarían disminuyendo la velocidad de la traducción, permitiendo así la formación de estructuras secundarias o terciarias en el péptido que se está sintetizando. De esta forma, los codones presentes en un determinado gen van a condicionar la síntesis de la proteína y su correcto plegamiento.

Arginina	Glicina	Isoleucina	Leucina	Prolina	Serina	Treonina
AGA	GGA	AUA	CUA	CCC	UCA*	ACA
AGG	GGG				AGU*	
CGA					UCG*	
CGG						

Tabla 5. Se listan los codones “raros” en el genoma de *E. coli* según Sharp y col. (2010) y el aminoácido al que corresponden. *codones presentes en baja frecuencia en genes altamente expresados, pero no si se considera la totalidad del genoma.

Por otra parte, hay algunos estudios sobre la frecuencia de utilización de los diferentes codones en las especies *E. granulosus* y *E. multilocularis* (Alvarez F. y col., 1993; Fernández V. y

col., 2001). Se ha observado que en los genes altamente expresados predominan los codones que presentan en su tercera posición G o C. Sin embargo, existen grandes variaciones dentro del propio genoma de estas especies, en particular con los genes poco expresados. Se realizó un análisis de los codones que conforman los genes de EgGST1 y de EgGST3, lo que permitió comparar la frecuencia con la que se utilizan los diferentes codones en el genoma de *E. coli* con la correspondiente en EgGST3 y en un gen que se pudo expresar dando lugar a una proteína soluble como EgGST1. Tanto en *EgGST1* como en *EgGST3* hay algunos codones que aparecen muy frecuentemente, y que además son poco utilizados en el genoma de *E. coli* (Tabla 6). Por ejemplo, en *EgGST1* el codón CCC es el que aparece con mayor frecuencia codificando la prolina, mientras que en *EgGST3*, es el segundo codón más frecuente para este aminoácido. Sin embargo, es el codón menos utilizado en los genes de *E. coli* para codificar la prolina. Algo similar sucede con algunos codones que codifican para la arginina y la glicina tanto en *EgGST1* como en *EgGST3*, y con los codones para la treonina en *EgGST3* (Tabla 6). Así, algunos de los codones más frecuentes en los genes de estas EgGSTs forman parte de los codones “raros” de *E. coli*, por lo que su presencia podría afectar la velocidad de síntesis proteica, y por lo tanto el plegamiento de la proteína. Igualmente, EgGST1 pudo ser expresada en forma soluble en *E. coli*, por lo que probablemente haya otros factores que estén contribuyendo de manera más importante a la agregación de EgGST3.

Aminoácido	Codones más frecuentes	
	<i>EgGST1</i>	<i>EgGST3</i>
Prolina	CCC	CCA
	CCA	CCC
Arginina	CGU	AGA
	CGA	CGC
	AGA	CGA
Glicina	GGU	GGU
	GGG	GGA
Treonina	ACU	ACA
	ACG	ACC

Tabla 6. Codones más frecuentes para algunos aminoácidos en los genes *EgGST1* y *EgGST3* determinados con el programa codonw 1.4.4. En rojo se muestran algunos de los codones “raros” en el genoma de *E. coli*.

Igualmente, se buscaron estrategias para confirmar la contribución de estas diferencias en el uso de codones en la producción de la proteína soluble. Una aproximación que permita una posible solución a este problema es la co-expresión de los tARNs correspondientes a los codones raros para *E. coli* y que podrían ser necesarios para la expresión de determinadas

proteínas. En este trabajo se utilizaron cepas comerciales que expresan diferentes conjuntos de tARNs como son la Rosseta[DE3], RIL[DE3] y RP[DE3]. La cepa RIL[DE3] contiene copias extra de los genes que codifican para los tARNs correspondientes a los codones AGA y AGG (arginina), AUA (isoleucina) y CUA (leucina). Por otro lado, la cepa RP[DE3] permite la expresión de los tARNs correspondientes a los codones AGA y AGG (arginina) y CCC (prolina). Mientras tanto, la cepa Rosseta[DE3] contiene un plásmido que codifica los tRNAs para todos los codones mencionados anteriormente. Cualquiera de estas tres cepas permitiría expresar únicamente el tARN correspondiente al codón AGA dentro de los necesarios para la expresión de EgGST3. La presencia de este codón en varios genes ha dificultado la expresión de los mismos en *E. coli* (Makrides S. C., 1996). En los tres casos la proteína nuevamente se expresó en cuerpos de inclusión. De esta forma, la expresión de estos tARNs “raros” para *E. coli*, en particular el correspondiente al codón AGA, no mejoró la expresión de EgGST3. Entonces se deberían co-expresar los tARNs correspondientes a los otros codones que podrían ser necesarios para la síntesis de EgGST3. Esto hubiera implicado el diseño de cebadores específicos para cada gen, su amplificación y clonado en un vector adecuado, para luego co-transformar todas estas construcciones con la que contiene a EgGST3 en el plásmido pET5a. Esta estrategia resultaría muy costosa, tanto en tiempo como económicamente, por lo que no se llevó a cabo. Otra posibilidad implicaría la introducción de mutaciones en la región codificante de EgGST3, de forma de sustituir los posibles codones “raros” por aquellos utilizados con más frecuencia por *E. coli*. Este procedimiento ha permitido expresar con éxito algunas proteínas (Makino T. y col., 2011), pero en algunos casos, las altas tasas de síntesis han llevado a la acumulación de proteína en forma insoluble en cuerpos de inclusión (Angov E., 2011). Este abordaje tampoco se llevó a cabo.

Por otra parte, el plegamiento de las proteínas dependerá además de los aminoácidos que la componen y de las interacciones, tanto covalentes como no covalentes, que se puedan establecer entre ellos. Dentro de las uniones covalentes, debemos mencionar a los enlaces disulfuro que se forman entre los residuos de cisteína que componen la proteína. EgGST3 presenta cuatro residuos de cisteína, cuyo estado de oxidación resulta desconocido ya que hasta el momento no disponemos de la estructura cristalina de EgGST3. De todas formas, no se han descrito enlaces disulfuro, tanto intra- como inter-catenarios, en las estructuras de las GSTs obtenidas hasta el momento. Por otro lado, el análisis bioinformático realizado en este trabajo sugiere que los cuatro residuos de cisteína de EgGST3 se encuentran en forma reducida. Algunos estudios permitieron obtener un modelado molecular de EgGST3, utilizando como molde una GST de *S. mansoni* (PDB ID: 1U3I) (Iriarte A. y col., 2012). A pesar de la alta divergencia encontrada entre EgGST3 y el resto de las GSTs de helmintos descritas hasta el

momento, se obtuvo un buen modelo, en el cual las cisteínas no se encuentran formando enlaces disulfuro, sino que están en forma reducida. Incluso, estos modelos en conjunto con otros estudios indican que una de las cisteínas, la Cys17, formaría parte del sitio activo de la enzima y podría estar involucrada en el mecanismo catalítico de la misma (Iriarte A. y col., 2012). De esta forma, podríamos plantear la posibilidad de que EgGST3 no presentara enlaces disulfuro en su conformación nativa, aunque esto debe ser confirmado mediante la cristalización de la proteína y la determinación de su estructura. Si se confirmara esta suposición, el carácter reductor del citoplasma de *E. coli* no representaría un obstáculo para la expresión de EgGST3 en este sistema. En el caso de que EgGST3 requiriera la formación de enlaces disulfuro para adquirir su conformación funcional, posibilidad que aún no se puede descartar, estos no se podrían formar en el citoplasma de *E. coli* ya que es un ambiente reductor (Makino T. y col., 2011), lo que podría constituir otra de las razones que contribuyeron a la agregación de la proteína. Si esta fuera la situación, se podría haber dirigido la expresión de EgGST3 hacia el periplasma, o se podrían haber utilizado cepas de *E. coli* que permitieran la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma. En este sentido, se podría haber utilizado la cepa Origami[DE3], que presenta mutaciones en los genes tioredoxina reductasa (*trxB*) y la glutatión reductasa (*gor*). Esto no se pudo llevar a cabo debido a la escasa viabilidad del stock de células de dicha cepa disponible en el laboratorio.

Por otra parte, no podemos descartar que se puedan formar enlaces disulfuro erróneamente una vez que la proteína es extraída de las células, abandonando el ambiente reductor del citoplasma. De hecho, al incluir agentes reductores en el buffer de lisis se produjo un mínimo aumento de la proporción de proteína soluble. Sin embargo, la mayor parte de la proteína se mantuvo en forma insoluble por lo que debería haber otros factores contribuyendo a la baja solubilidad de EgGST3.

Dentro de las interacciones no covalentes, las más relevantes para la conformación nativa de las proteínas serían las hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno y las interacciones de Van der Waals (Dill K. A. y col., 2008). Las interacciones hidrofóbicas se establecen entre regiones no polares de una o varias proteínas o lípidos que, al encontrarse en un entorno acuoso, se aproximan para evitar el contacto con el agua (Meyer E. E. y col., 2006). Estas interacciones son particularmente importantes, por ejemplo, en la estructura de las membranas celulares. Los detergentes pueden interferir en el establecimiento de las interacciones hidrofóbicas a través de sus regiones no polares, mientras las partes polares de la molécula quedan expuestas hacia el medio acuoso. Es por esto que se los incorpora en las soluciones utilizadas para lisar células, para romper las interacciones que mantienen unidas a las membranas celulares. Por otra parte, las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína

contribuyen de forma importante a la agregación de las mismas. De esta forma, la presencia de los detergentes en las soluciones de lisis cumpliría una doble función, contribuyendo por un lado a la ruptura de las membranas celulares y por otro a la desagregación de la proteína recombinante, y por lo tanto a su solubilización. El Tritón X-100, un detergente no iónico, fue incorporado en la solución de lisis en la expresión de EgGST1, obteniéndose importantes niveles de proteína recombinante en la fracción soluble. Es así que se decidió utilizar el Tritón X-100 en la expresión de EgGST3, en las mismas condiciones. Sin embargo, tanto al utilizar el protocolo de referencia como en todas las otras estrategias empleadas para la expresión de EgGST3, casi la totalidad de la proteína se encontró en la fracción insoluble. Dado que EgGST1 se obtuvo soluble en estas condiciones, se podría pensar que la lisis celular funcionó adecuadamente, pero el problema radica en la solubilidad de EgGST3. Por otra parte, se utilizó el CHAPS, un detergente zwitteriónico que, al igual que el Tritón X-100, no tiene el efecto desnaturalizante de los detergentes iónicos. De todas formas, si bien la incorporación de CHAPS en el buffer de lisis en lugar de Tritón produjo un mínimo aumento de la proporción de proteína soluble, éste no fue significativo. Así, ninguno de los dos detergentes en las condiciones analizadas contribuyó lo suficiente para desagregar los cuerpos de inclusión formados por EgGST3.

Por otra parte, el establecimiento de las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína se ve favorecido por altas concentraciones de éstas. Así, se podría disminuir los niveles de proteína como un posible mecanismo para evitar su agregación. Con este fin se probaron tres estrategias: disminución de la temperatura de inducción y del tiempo de inducción, y de la concentración de inductor. Tanto el cambio del tiempo como de la concentración de IPTG no provocaron variaciones en los niveles de proteína. Esto indicaría que la proteína se expresa rápidamente una vez que se incorpora el inductor, llegando a una especie de meseta, en la que la cantidad de proteína se mantiene constante a lo largo del tiempo. Tal vez se podrían haber probado tiempos menores de inducción, de apenas unos minutos, para ver si en las primeras etapas de la expresión la proteína no llega a agregarse (el menor intervalo de tiempo probado fue de 30 minutos). Por otra parte, parecería que bajas concentraciones de inductor son suficientes para que EgGST3 se exprese. De hecho, se observó una cierta cantidad basal de proteína recombinante en los cultivos controles sin IPTG, la cual fue reducida mediante la incorporación al medio de cultivo de 1% de glucosa. Estos niveles de expresión basal pueden ser importantes en el caso de que EgGST3 resultara tóxica para las células, disminuyendo su viabilidad. Esto parecería no haber ocurrido, ya que el crecimiento de los cultivos realizados en principio sin glucosa, fue similar al de los cultivos posteriores conteniendo glucosa en el medio de cultivo. De esta forma, los niveles basales de EgGST3 parecerían no estar afectando la

viabilidad de las células. De todas formas, existen cepas comerciales de *E. coli* que fueron desarrolladas para expresar proteínas posiblemente tóxicas para la BL21[DE3]. Dentro de estas se encuentran las cepas pLySE[DE3] y pLySS[DE3] que fueron utilizadas en este trabajo para la expresión de EgGST3, aunque sin buenos resultados. También se probaron las cepas C41[DE3] y C43[DE3], obteniéndose un pequeño aumento en la solubilidad de EgGST3 en la C43[DE3]. De todas formas, se intentó purificar la proteína soluble producida por afinidad al GSH, pero EgGST3 no se unió a la columna. Este hecho podría constituir nueva evidencia de que EgGST3 presenta características que la acercan a la clase Omega, ya que todas las proteínas de esta clase descritas hasta el momento no pudieron ser purificadas de esta forma (Whitbread A. K. y col., 2005).

Mientras tanto, la disminución de la temperatura de inducción permitió disminuir los niveles de expresión pero la solubilidad de EgGST3 no se vio modificada, permaneciendo casi la totalidad de la proteína en la fracción insoluble.

Por otro lado, se sugiere que las interacciones electrostáticas no serían las más relevantes para el plegamiento de las proteínas (Dill K. A. y col., 2008). Sin embargo, las regiones cargadas de las mismas son importantes ya que determinan su pI, punto en el cual la proteína presenta un mínimo en su solubilidad (Benedek G. B. y Villars F. M. H., 2000). Esto no implica que la proteína sea completamente insoluble en su punto isoeléctrico. De hecho, el pI teórico de EgGST1 es de 7,5 y fue expresada en forma soluble y activa utilizando una solución de lisis de pH 7,4 (Harispe L. y col., 2010). De todas formas, es importante que en todos los pasos del proceso de expresión y purificación, en particular en la lisis celular, se utilicen soluciones que presenten un pH alejado del pI de la proteína a expresar para aumentar las probabilidades de que ésta esté soluble. En el caso de EgGST3, su pI teórico es de 7.71, cercano al pH de la solución de lisis utilizada como referencia (7,4). Si bien en este trabajo no se determinó con precisión el pI de EgGST3, los estudios realizados por electroforesis bidimensional muestran que hay al menos tres spots correspondientes a esta subunidad que difieren básicamente en su pI. Los resultados obtenidos por Monteiro y col. (2010) sugieren que el pI de las EgGSTs se encuentra aproximadamente entre 7,5 y 8,0. Es por esto que se decidió probar dos nuevas soluciones: un buffer fosfato pH 6,5, que es la solución en la que se determina la actividad GST, y un buffer tris pH 8,0 que, si bien tiene pH cercano al pI de EgGST3, ha sido utilizado en la expresión y purificación de algunas GSTs, particularmente de helmintos (Liebau E. y col., 2008). De todas formas, los cambios de pH tampoco favorecieron la solubilización de EgGST3. Esto podría indicar que, como sugiere Dill y cols. (2008), las interacciones electrostáticas no serían el principal factor contribuyendo al plegamiento de

EgGST3, de forma que un ajuste en el pH no es suficiente para solucionar las posibles causas de un incorrecto plegamiento.

Hasta este punto, se ha mencionado la influencia en el plegamiento de las proteínas de las interacciones, tanto covalentes como no covalentes, entre los residuos aminoacídicos que las componen. Estos residuos pueden sufrir además procesos de modificación durante o después de la traducción (Walsh C. T. y col., 2005). Estos incluyen entre otros la fosforilación, acilación y alquilación, glicosilación y oxidación (un ejemplo de oxidación es lo que ocurre en la formación de los enlaces disulfuro discutidos previamente). Además, se puede producir el clivaje de la cadena polipeptídica, generalmente mediante la acción de proteasas. Todas estas modificaciones postraduccionales son importantes para que la proteína adquiera su conformación nativa y funcional. Se han identificado GSTs glicosiladas (Kuzmich S. y col., 1991; Gronwald J. W. y Plaisance K. L., 1998) y se ha observado que ciertas GSTs pueden sufrir otras modificaciones postraduccionales *in vitro*, en particular fosforilación, metilación y oxidación, lo que sugiere la posibilidad de que también lo hagan *in vivo* (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). Por otra parte, se ha observado que una GST de clase Pi humana es capaz de catalizar la glutationilación de ciertas proteínas, en un mecanismo que incluye su propia glutationilación (Tew K. D. y col., 2011; Tew K. D. y Townsend D. M., 2011). En helmintos se han identificado GSTs glicosiladas, como es el caso de una GST de clase Sigma del nematodo *O. volvulus* (Liebau E. y col., 1994). A través de los estudios bioinformáticos realizados en este trabajo no se identificaron sitios que probablemente sean N-, O- o C-glicosilados en EgGST3, pero si se encontraron varios posibles sitios fosforilados. La fosforilación es un mecanismo sumamente relevante en la regulación de la actividad de numerosas proteínas, y esto podría aplicarse también en el caso de EgGST3. El análisis por electroforesis bidimensional y *western*-blot de la expresión en PEs de las EgGSTs, y en particular de EgGST3, reveló la presencia de varias formas de cada una de estas proteínas, las cuales podrían corresponderse con alguna de las modificaciones postraduccionales descritas anteriormente. Sin embargo, como se ha mencionado previamente, *E. coli* carece de los mecanismos necesarios para la incorporación de gran parte de las modificaciones postraduccionales descritas en eucariotas, entre ellas la glicosilación, la fosforilación e hidroxilación (Brondyk W. H., 2009). De esta forma, la falta de estas modificaciones podría haber afectado el plegamiento de EgGST3, lo que podría haber contribuido a su agregación.

Todas las estrategias utilizadas con el fin de evitar la formación de los cuerpos de inclusión condujeron al mismo resultado: elevados niveles de proteína casi en su totalidad en la fracción insoluble. Si bien suele considerarse un problema la formación de agregados insolubles, la expresión de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión presenta ciertas

ventajas (Singh S. M. y Panda A. K., 2005). En primer lugar, la sobre-expresión de la proteína permite obtener importantes cantidades de la misma, y al agregarse, quedan de cierta manera protegidas de la acción de las proteasas celulares, disminuyendo su degradación. Por otra parte, los cuerpos de inclusión pueden aislarse fácilmente del resto de los componentes celulares, ya que presentan una densidad mayor que la de éstos, y al tener pocos contaminantes, se facilita el proceso de purificación de la proteína (Singh S. M. y Panda A. K., 2005). Una vez que se produjo la proteína, se deben aislar y solubilizar los cuerpos de inclusión y luego renaturalizar la proteína para que ésta adquiera su conformación nativa y funcionalmente activa. En la mayoría de los casos esto no se consigue fácilmente y son pocas las proteínas que pueden producirse de manera soluble y activa por este tipo de estrategias (Graslund S. y col., 2008), por lo que deben cambiarse las condiciones o el sistema de expresión (Burgess R. R., 2009). En el caso de EgGST3, se logró solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión pero luego del refolding, se observó claramente la precipitación de EgGST3 y no se la pudo recuperar en la fracción soluble.

Otro aspecto a considerar es que si bien en el gen *EgGST3* se utilizan con frecuencia codones de los considerados “raros” para *E. coli*, lo que nos haría pensar que la síntesis proteica se enlentecería, disminuyendo así los niveles de proteína obtenida, se obtienen cantidades significativas de EgGST3, incluso con tiempos cortos de inducción de la expresión y bajas concentraciones de inductor. Una posible interpretación de estos hechos, estaría relacionada con posibles diferencias en la regulación de la expresión del gen *EgGST3*. Según el análisis realizado, en general los codones que aparecen con mayor frecuencia en el gen *EgGST3* coinciden con los más utilizados en los genes altamente expresados en *E. granulosus* según Fernández y col. (2001). Sin embargo, EgGST3 se expresa en bajos niveles en protoescólex, aunque puede inducirse su expresión en presencia de ciertos estímulos (Arbildi P., 2013). Se han identificado varios elementos en la región promotora del gen *EgGST3* que permitirían alcanzar esta estricta regulación de la expresión, desde sitios de unión para factores de transcripción hasta elementos de respuesta que permiten la inducción de la expresión en determinadas condiciones (Arbildi P., 2013). Mientras tanto, el vector pET5a contiene el promotor del bacteriófago T7, un promotor fuerte que permite la sobre-expresión de las proteínas recombinantes, obteniéndose grandes niveles de las mismas (Terpe K., 2006). A esto se debe agregar que la T7 ARN polimerasa tiene una tasa de traducción cinco veces mayor que la de la polimerasa de *E. coli* (Sorensen H. P. y Mortensen K. K., 2005a), de forma que la velocidad de síntesis de EgGST3 tal vez sería significativamente mayor que la necesaria para su correcto plegamiento. Por otra parte, si EgGST3 no se plegó correctamente durante su síntesis pueden haber quedado regiones hidrofóbicas expuestas, favoreciendo así las

interacciones proteína-proteína y por lo tanto la agregación. Teniendo todos estos factores en cuenta, tal vez se podría haber optado por utilizar otro vector de expresión que presentara un promotor que permitiera una regulación más estricta de la expresión, alcanzando menores niveles de proteína sintetizada. Un ejemplo de estos vectores podría ser el sistema pBAD, basado en el promotor *araBAD* (Sorensen H. P. y Mortensen K. K., 2005a; Terpe K., 2006). El mismo permite una fina regulación de la expresión, mediante la variación en la concentración de inductor, en este caso, la L-arabinosa. También podrían utilizarse vectores con el promotor *rhaBAD*, inducible mediante la adición de L-rhamnosa. Así, la utilización de un vector que permita una mayor regulación de la expresión podría ser una posible estrategia a analizar para la producción de EgGST3 soluble y activa en *E. coli*.

De todas formas, uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo, que será llevado a cabo próximamente, es la expresión de EgGST3 en un sistema eucariota. Entre estos sistemas, podemos encontrar varias levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, así como células de mamífero y el sistema del baculovirus para la expresión en células de insectos (Brondyk W. H., 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 M. A. y col., 1992; Brondyk W. H., 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 W. H., 2009).

En este capítulo se describió la utilización de diversas estrategias y el ensayo de un gran número de condiciones para expresar EgGST3 recombinante en forma soluble y funcionalmente activa. A pesar de esto, ninguna de ellas tuvo éxito, por lo que, hasta el momento, EgGST3 no ha podido ser bioquímicamente caracterizada. Sin embargo, la proteína EgGST3 obtenida en cuerpos de inclusión pudo ser utilizada para la producción de anticuerpos policlonales específicos para EgGST3, tanto en ratón como en conejo. Estos anticuerpos fueron utilizados para confirmar la presencia de EgGST3 en PEs y constituirán además una herramienta fundamental para otros estudios realizados en este trabajo.

Capítulo 5. Caracterización de una GST parasitaria heterodimérica

La dimerización de las GSTs requiere de ciertos residuos en la estructura de cada subunidad, que se encuentran conservados dentro de una clase (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). Teniendo en cuenta el análisis de secuencia de EgGST3 presentado previamente, se plantea la posibilidad de que EgGST3 forme una enzima heterodimérica con EgGST2. En este capítulo se describe la detección *in vivo* de esta GST heterodimérica parasitaria (EgGST2-3). Asimismo, se incluyen los estudios bioquímicos de la correspondiente proteína recombinante y se pone en manifiesto la presencia de anticuerpos específicos en sueros de pacientes con Hidatidosis. Finalmente, en base a los datos obtenidos, se discute el posible papel en la infección de EgGST2-3.

5.1. Resultados

5.1.1. Detección de un heterodímero de GST en protoescolices

Con el fin de determinar si existe *in vivo* una EgGST heterodimérica constituida por las subunidades EgGST2 y EgGST3 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Para esto, se utilizó una resina de proteína G, a la que se le acoplaron anticuerpos de ratón específicos para EgGST3 (ver detalles en Materiales y Métodos). De esta forma, al incubar un extracto de PEs con la resina, aquellas proteínas que contengan como uno de sus componentes a la subunidad EgGST3 quedarían retenidas. Posteriormente, se analizó por *Western-blot* la presencia de la subunidad EgGST2 en las proteínas retenidas en la resina (Figura 19).

En primer lugar, se verificó la presencia de EgGST2 y EgGST3 en el extracto de PEs utilizado para la inmunoprecipitación (SPE). A continuación, pudimos observar que EgGST3 se encuentra entre las proteínas unidas por los anticuerpos anti-EgGST3, observándose una banda del peso molecular esperado para esta proteína en la fracción I. Asimismo, los anticuerpos anti-EgGST2 reconocieron en la fracción I una proteína dando una banda que, por su peso molecular, podría corresponder a EgGST2 (Figura 19). Esto sugeriría que hay una interacción entre EgGST2 y EgGST3 que daría lugar a una enzima heterodimérica compuesta por estas dos subunidades.

En los carriles correspondientes a la fracción I y al SPE se observan otras bandas además de las correspondientes a las EgGSTs. Considerando que se pegaron a la proteína G inmunoglobulinas totales, no sólo las específicas para las EgGSTs, podría haber anticuerpos

específicos contra otras proteínas que podrían presentar reactividad cruzada con proteínas presentes en los PEs. Esto podría explicar las bandas que aparecen en estos carriles que, por su peso molecular, no corresponderían a las EgGSTs. Otro hecho que se puede observar, es que el PM de cada EgGST difiere si comparamos la fracción I y la SPE (Figura 19). Se ha sugerido que migraciones anómalas en geles de SDS-PAGE podrían deberse a diferencias en la carga intrínseca de la proteína, o a que la proteína adopte conformaciones ligeramente diferentes en ambos medios (Dunker A. K. y Rueckert R. R., 1969). En ambos casos, se vería afectada la unión del SDS a la proteína y por lo tanto la migración.

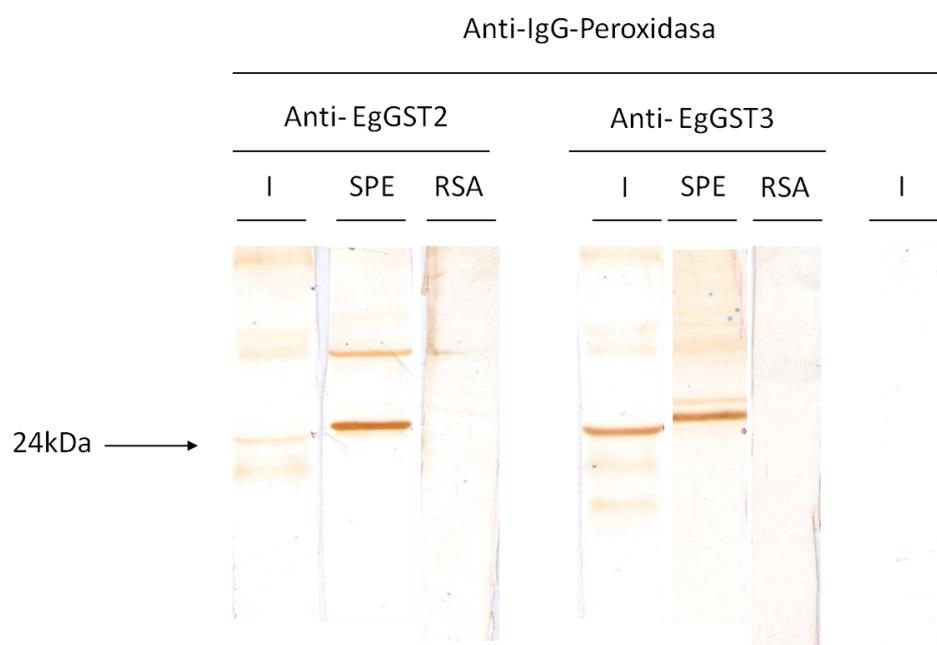


Figura 19. Detección de la proteína heterodimérica EgGST2-3 en PEs por inmunoprecipitación (ver Materiales y Métodos). *Western-blot* en el que se analiza la presencia de EgGST2 y EgGST3 en I: fracción conteniendo las proteínas de SPE que quedaron retenidas en la resina de proteína G por los anticuerpos anti-EgGST3; SPE: sonificado de PEs; RSA: proteínas que son retenidas en la resina de proteína G sin anticuerpos acoplados; Anti-EgGST: antisuero específico para cada EgGST utilizado como anticuerpo primario (dilución 1/200); Anti-IgG-Peroxidasa: anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (anticuerpo secundario, dilución 1/1000).

Se realizaron además controles para asegurar que no existieran interacciones inespecíficas que pudieran afectar los resultados. En este sentido, previo a la inmunoprecipitación se incubó el extracto de PEs con una alícuota de resina sin anticuerpos acoplados, para eliminar del extracto aquellas proteínas que pudieran interaccionar inespecíficamente con la proteína G (Figura 19). En la fracción conteniendo dichas proteínas (RSA), no se observan bandas debidas al reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-EgGST2 y anti-EgGST3. En particular, no se observan bandas del peso molecular esperado para

las EgGSTs. Se puede observar además que el anticuerpo secundario utilizado no reconoce a ninguna proteína en la fracción I (Figura 19).

De esta forma, colectivamente todos estos datos sugieren que el reconocimiento de EgGST2 y EgGST3 en la fracción de proteínas retenidas en la columna de proteína G es específico, y que por lo tanto, ambas subunidades se encuentran en dicha fracción.

Vale la pena mencionar que también se realizó una inmunoprecipitación con la resina de proteína G acoplada a anticuerpos anti-EgGST2. Al igual que en el experimento anterior, se detectó por *Western*-blot que ambas subunidades fueron retenidas en la resina, indicando también que podría existir en PEs un heterodímero EgGST2-3 (datos no mostrados).

5.1.2. Expresión del heterodímero EgGST2-3 recombinante

La expresión del heterodímero EgGST2-3 recombinante (rEgGST2-3) se realizó mediante la co-transformación de células de la cepa BL21[DE3] de *E. coli* con las construcciones recombinantes de EgGST2 y EgGST3 en los vectores de expresión pET28a y pET5a respectivamente. De esta forma, se expresó una proteína heterodimérica conteniendo la subunidad rEgGST2 fusionada a una cola de histidinas, que permitió la purificación de rEgGST2-3 por afinidad a una resina de Níquel-agarosa. En la figura 20 se muestra un SDS-PAGE de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación. El carril 2 contiene la fracción soluble (S) del cultivo bacteriano en el que se indujo la expresión de rEgGST2-3. Si bien parece que la cantidad de proteína cargada fue excesiva, dificultando la distinción de las bandas, en el entorno de los 25kDa se observa una gran acumulación de proteína que podría corresponder a rEgGST2 y rEgGST3. La fracción S fue la que se utilizó para purificar la enzima por columna de Ni-agarosa. En el carril NR se encuentran las proteínas que no fueron retenidas en la resina de níquel-agarosa. El patrón de bandas, en las regiones en que éste puede ser distinguido, coincide con el observado en la fracción S. Incluso gran parte de la proteína que suponemos corresponde a las EgGSTs no fue retenida. Esto puede haberse debido a que la cantidad de proteína cargada en la columna fue grande con relación al volumen de resina empleado (superó la capacidad de la resina Ni-agarosa). Los lavados realizados permitieron eliminar las proteínas que no quedaron unidas a la resina (carriles Lavados). Finalmente, en las fracciones correspondientes al eluido se pueden observar dos bandas en el entorno de los 25kDa, coincidentes con la acumulación de proteínas detectada en la fracción S, que corresponderían a EgGST2 y EgGST3. La identidad de las proteínas presentes en dicha fracción fue confirmada por *western*-blot utilizando los anticuerpos específicos para EgGST2 y EgGST3 (datos no mostrados). El rendimiento de la purificación fue de 20 mg de rEgGST2-3 por litro de cultivo.

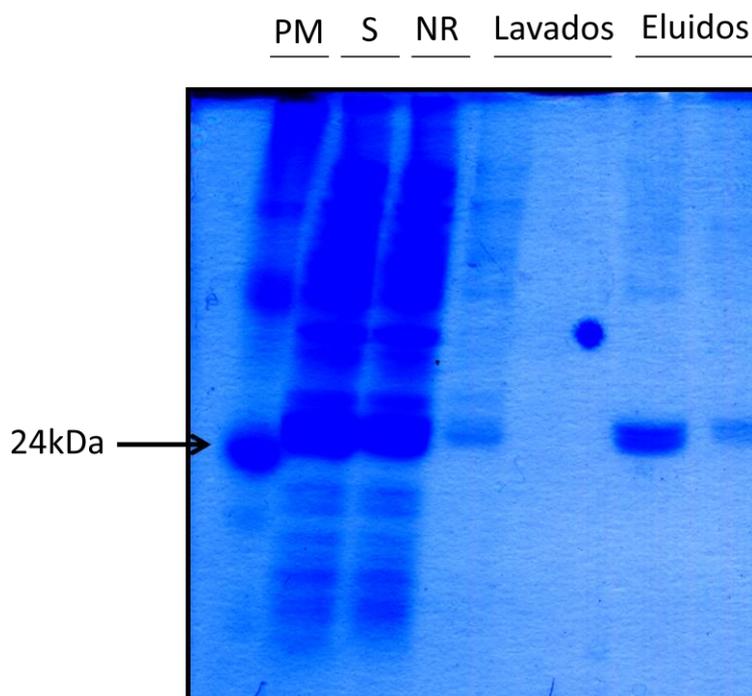


Figura 20. Purificación de rEgGST2-3 por afinidad a una resina de níquel-agarosa. Se muestra el análisis de las diferentes fracciones de la purificación por SDS-PAGE. PM: Peso molecular; S: fracción soluble del cultivo de *E. coli* BL21[DE3] inducido, a partir de la que se purificó la enzima recombinante; NR: proteínas no retenidas en la resina.

5.1.3. Caracterización bioquímica de rEgGST2-3

Se determinó la actividad específica de rEgGST2-3 frente al CDNB, la cual fue de $1,2 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Además, las diferentes clases de GSTs de mamíferos se diferencian, entre otros aspectos, por su especificidad de sustratos. Así, se ha definido un conjunto de sustratos modelo, cada uno de ellos específico para una determinada clase de GSTs, con el fin de identificar y clasificar estas enzimas. En este trabajo se analizó la actividad glutatión transferasa de rEgGST2-3 frente a algunos de los sustratos considerados modelo (Tabla 7). Se estudió además la actividad frente a dos compuestos que se podrían generar como productos secundarios de la peroxidación lipídica, el *trans*-nonenal y el *trans-trans*-decadienal. La enzima heterodimérica rEgGST2-3 presentó actividad frente a los sustratos 1,2-dicloro-4-nitrobenceno (DCNB), ácido etacrínico y *trans-trans*-decadienal, mientras que no se detectó actividad con el 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi)propano (EPNP), bromosulfoftaleína (BSP) y *trans*-nonenal (Tabla 7).

Por otra parte, se analizó la sensibilidad de la actividad catalítica frente a posibles inhibidores, en particular, drogas antihelmínticas. Para esto, se determinó el porcentaje de actividad remanente de la enzima con el sustrato CDNB luego de una incubación de 5 minutos con los diferentes antihelmínticos (Tabla 8). Los mayores niveles de inhibición se obtuvieron con el mebendazol, de forma que rEgGST2-3 retuvo solamente entre un 30 y 40% de la

actividad luego de la incubación con dicho compuesto. Mientras tanto, otros antihelmínticos como el albendazol no inhibieron significativamente a la enzima.

	Actividad específica ($\mu\text{mol. min}^{-1}. \text{mg}^{-1}$)
CDNB	1,2 \pm 0,2
DCNB	0,015 \pm 0,005
Ácido etacrínico	0,27 \pm 0,03
<i>trans-trans</i> -decadienal	0,010 \pm 0,002
EPNP	ND
<i>trans</i> -nonenal	ND
BSP	ND

Tabla 7. Actividad específica de rEgGST2-3 frente a diferentes sustratos modelo. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos dos experimentos independientes, cada uno de ellos incluyendo determinaciones por triplicado. ND: no fue detectable.

Inhibidor	Concentración (μM)	Porcentaje de actividad remanente
Mebendazol	50	31%
		36%
Albendazol	200	95%
		86%
Febendazol	100	82%
		55%
Rafoxamida	100	75%
		71%
Bitionol	10	46%
		36%
Closantel	10	46%
		24%
Hexaclorofeno	5	58%
		56%

Tabla 8. Inhibición de rEgGST2-3 por antihelmínticos. Se presenta el porcentaje de actividad remanente de la enzima luego de una incubación de 5 minutos con el antihelmíntico con respecto a la actividad de la enzima sin inhibidor. Se incluyen los resultados de dos experimentos independientes.

5.1.4. Presencia de anticuerpos anti-EgGST2-3 en sueros de pacientes.

Un aspecto importante es determinar si en los sueros de pacientes cursando una infección por *E. granulosus* existen anticuerpos específicos que reconozcan a rEgGST2-3. Para

esto, se analizaron 17 sueros de pacientes con una infección por este parásito confirmada quirúrgicamente, y se compararon con 13 sueros provenientes de personas no infectadas mediante la técnica de ELISA. La comparación entre las poblaciones se realizó con el test de Mann Whitney, considerándose diferencias significativas un $P < 0,05$. En la Figura 21 se muestran gráficamente los resultados de uno de los experimentos realizados. El P obtenido en este experimento, de 0,0082, indica que existen diferencias significativas en el título de anticuerpos que reconocen rEgGST2-3 entre individuos no infectados y pacientes con equinococosis quística.

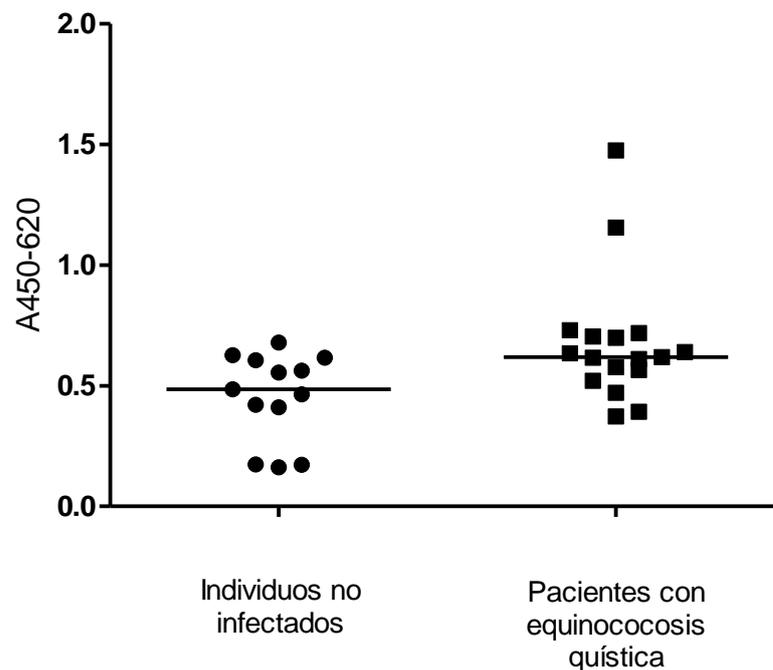


Figura 21. Comparación del título de anticuerpos que reconocen rEgGST2-3 entre un grupo de individuos no infectados y uno de pacientes con equinococosis quística. Se muestra la mediana para cada población y la comparación de las mismas se realizó con el test de Mann Whitney. Los resultados indican diferencias significativas entre ambas poblaciones ($P < 0,05$).

En ambas poblaciones existen puntos que parecen alejarse del comportamiento general del resto. En el caso del grupo de los individuos no infectados, hay tres puntos que presentan valores ligeramente menores. Considerando que este experimento fue realizado dos veces de forma independiente y en ambos los sueros de estos individuos tienen la misma tendencia, podemos pensar que la misma no se debió a un error experimental, por lo que en principio no hay razones para descartarlos. Por otro lado, en el grupo de los pacientes con equinococosis quística hay dos individuos que presentan valores relativamente superiores al resto. Al igual que en el caso anterior, la tendencia se mantiene en los dos experimentos. Igualmente, la diferencia de uno de estos puntos con el resto es ligeramente mayor en el experimento

presentado en la figura respecto al otro experimento. De todas formas, dicho punto no afecta el resultado obtenido ya que con su eliminación se siguen observando diferencias significativas entre ambas poblaciones ($P=0,0201$).

5.2. Discusión

Como se mencionó en secciones anteriores, se nos presentaron importantes dificultades para expresar el homodímero recombinante EgGST3 en forma soluble en *E. coli*. Se han descrito dificultades similares en la expresión de otras subunidades que componen proteínas multiméricas, y se ha propuesto que podrían deberse a que el plegamiento correcto de cada subunidad requiere la presencia de los otros componentes del oligómero (Sorensen H. P. y Mortensen K. K., 2005b). De esta forma, nos planteamos la posibilidad de que EgGST3 formara una enzima heterodimérica con alguna de las dos EgGSTs identificadas hasta el momento, EgGST1 y EgGST2. La dimerización de las GSTs parece ocurrir únicamente entre subunidades de la misma clase ya que se requieren ciertos residuos conservados en la estructura de cada una de ellas (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). Si bien EgGST3 presenta características propias tanto de la clase Omega como de la Sigma, los residuos que estarían involucrados en la dimerización son conservados con los de esta última clase (Iriarte A. y col., 2012). Además, no hemos identificado GSTs de clase Omega en *E. granulosus*. Teniendo en cuenta todos estos factores, decidimos investigar si las subunidades EgGST2 y EgGST3 podrían dimerizar, dando lugar a una enzima catalíticamente activa.

La estrategia utilizada implicó la separación de las proteínas presentes en un extracto de PEs que contienen la subunidad EgGST3 por afinidad a anticuerpos anti-EgGST3 de ratón acoplados a una resina de proteína G. Si existiera *in vivo* una interacción entre EgGST2 y EgGST3 que diera lugar a una enzima heterodimérica, podríamos detectar a EgGST2 en la fracción que contiene a las proteínas retenidas en la resina, como finalmente sucedió. Se realizaron además controles para verificar que las bandas observadas en el *Western-blot* se debieran al reconocimiento específico de las EgGSTs y no a la detección de otras proteínas presentes en la muestra. Esto es particularmente importante ya que durante el procedimiento se podrían desprender los anticuerpos acoplados a la proteína G. El anticuerpo secundario utilizado, un anti-IgG de ratón, podría reconocer las cadenas livianas de dichos anticuerpos, dando lugar a una banda de aproximadamente 25kDa. Teniendo en cuenta que el peso molecular de las EgGSTs se encuentra entre 24 y 25kDa, no podríamos asegurar que una banda detectada de este peso correspondiera específicamente a las EgGSTs. Así, se realizó un control en el que la fracción de proteínas unidas a la resina fue enfrentada directamente al anticuerpo

secundario. No se observaron bandas en el entorno de los 25kDa, indicando que el anticuerpo secundario no reconoció directamente ninguna proteína retenida por la resina, incluyendo las cadenas livianas de las inmunoglobulinas. En conclusión, se podría pensar que las bandas observadas cuando la misma muestra fue enfrentada a los anticuerpos anti-EgGSTs corresponderían a dichas proteínas parasitarias, evidenciando así la existencia de una enzima heterodimérica EgGST2-3.

De esta forma, podemos decir que *E. granulosus* expresa las subunidades EgGST2 y EgGST3, y que produce una enzima heterodimérica formada por estas. Podemos preguntarnos si el parásito expresa, además de EgGST2-3, a los correspondientes homodímeros. En este sentido, podemos plantear la posibilidad de una distribución diferencial de cada una de las subunidades en el parásito y en las diferentes etapas de su ciclo de vida. Esto implicaría que, por ejemplo, en algunas regiones se exprese una sola subunidad y por lo tanto sólo se exprese el homodímero correspondiente. La pregunta sería qué pasa en aquellas regiones en las que se expresen tanto EgGST2 como EgGST3: ¿se expresan simultáneamente uno o los dos homodímeros y el heterodímero? ¿O existe algún mecanismo que permita producir preferentemente una u otra enzima? Podemos pensar en diferentes posibles respuestas a estas preguntas teniendo en cuenta las actividades enzimáticas y no enzimáticas que cumplen las GSTs. Considerando las actividades catalíticas de estas enzimas, debemos tener en cuenta que cada subunidad que compone una GST contiene un sitio activo, por lo que un heterodímero presenta dos sitios catalíticos diferentes. Esto podría sugerir que una enzima heterodimérica como EgGST2-3 podría actuar sobre los mismos sustratos utilizados por los homodímeros con los que comparte subunidades, en este caso 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 presentarán una afinidad y eficiencia catalítica diferente frente a un determinado sustrato. A su vez, cada enzima tendrá una sensibilidad diferente 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, Hayes y cols. (1995) han 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. Así, en función de las condiciones encontradas en una determinada región del parásito, se podría favorecer la expresión del heterodímero o del homodímero correspondiente según las propiedades de cada uno de ellos. Esto implicaría la existencia de mecanismos reguladores que determinen que, teniendo a

disposición las subunidades EgGST2 y EgGST3, las mismas sean utilizadas para formar los homodímeros y/o del heterodímero.

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 diferencias en 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.

Por otra parte, la importancia de producir tanto las enzimas homodiméricas como la heterodimérica, ya sea simultánea o separadamente, podría estar relacionada con la función transportadora o de reserva de las GSTs. En este sentido, la interface entre los monómeros que forman la enzima heterodimérica adopta una distribución espacial diferente a la que podrían presentar los homodímeros de las mismas subunidades, permitiendo la formación de diferentes sitios de unión para ligandos (Hayes J. D. y col., 2005).

Todos los aspectos discutidos anteriormente sugieren que la formación de GSTs heterodiméricas podría ser de gran importancia a nivel fisiológico. 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 J. D. y Pulford D. J., 1995). En helmintos parásitos, no se han caracterizado hasta el momento GSTs heterodiméricas, por lo que EgGST2-3 sería la primera enzima de este tipo expresada y parcialmente caracterizada.

Otro de los objetivos planteados en este trabajo fue la expresión y purificación de rEgGST2-3. La expresión de rEgGST2-3 se llevó a cabo utilizando el protocolo de referencia probado en primera instancia para la expresión de rEgGST3. A diferencia de rEgGST2 y rEgGST3, rEgGST2-3 pudo ser expresada en *E. coli* en cantidades adecuadas sin mayores dificultades. Esto podría deberse, como se mencionó anteriormente, a la necesidad para un correcto plegamiento de ambas subunidades que componen la proteína dimérica (Sorensen H. P. y Mortensen K. K., 2005b). Esto plantea nuevamente la interrogante de si podrían existir *in vivo* las enzimas homodiméricas EgGST2-2 y EgGST3-3, y si es así, por qué no logramos expresarlas solubles. Se podría pensar que dichas enzimas no se pudieron expresar en *E. coli* debido a que la interacción entre dos subunidades iguales no da lugar a una enzima correctamente plegada y funcional, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto implicaría que los homodímeros no serían expresados por el parásito. Como se comentó anteriormente, este hecho no ha sido confirmado y no podemos descartar la posibilidad de que EgGST2-2 y

EgGST3-3 sean producidas *in vivo*. Si este fuera el caso, ¿por qué no logramos obtener los homodímeros recombinantes en forma soluble y activa? En el capítulo anterior nos planteamos varias hipótesis para explicar este hecho, algunas de las cuales podremos reconsiderar con la nueva información obtenida. Varios de los factores que podrían haber contribuido a la agregación de rEgGST3, y probablemente de rEgGST2, afectarían tanto la expresión de estas subunidades en forma individual, para producir los correspondientes homodímeros, como simultánea para producir una enzima heterodimérica. Por ejemplo, la diferencia en el uso de codones entre *E. coli* y *E. granulosus* o la posibilidad de que se formen enlaces disulfuro incorrectos entre los residuos de cisteína que forman las subunidades, influirían en la expresión de EgGST3 tanto para producir tanto rEgGST3-3 como rEgGST2-3. De todas formas, otros factores podrían influir en la expresión de EgGST3-3, pero no contribuir en la de EgGST2-3. Uno de ellos estaría relacionado con la necesidad de incorporar modificaciones postraduccionales a las EgGSTs. Ambas subunidades fueron detectadas en PEs en varias formas diferentes por electroforesis bidimensional y *Western-blot*. A su vez, estudios bioinformáticos identificaron secuencias conteniendo posibles sitios para la incorporación de modificaciones como fosforilación. La carencia de *E. coli* de los mecanismos necesarios para hacerlo podrían afectar el correcto plegamiento de las proteínas, llevando a su agregación. Teniendo esto en cuenta, podríamos pensar que las variantes de EgGST2 y EgGST3 que conforman los homodímeros y la enzima heterodimérica son diferentes. Por ejemplo, podríamos sugerir que las subunidades que conforman EgGST2-3 no presentan modificaciones postraduccionales, o si las tienen, éstas pueden ser incorporadas por *E. coli*, mientras que las que conforman los homodímeros requieren modificaciones que la bacteria no puede realizar. De esta forma, rEgGST2-2 y rEgGST3-3 no adoptarían su conformación correctamente plegada y precipitarían, mientras que rEgGST2-3 sí podría ser producida en forma soluble y funcional. Ésta podría ser una de las explicaciones de por qué las dificultades presentadas para la expresión de rEgGST3-3 no afectaron la producción de rEgGST2-3.

Las diferentes estrategias utilizadas para obtener los homodímeros rEgGST2-2 y rEgGST3-3 recombinantes solubles y activos no permitieron obtener cantidades de proteína soluble suficientes para efectuar posteriores ensayos de actividad enzimática. De todas formas, la escasa proteína soluble producida se intentó purificar por afinidad al glutatión. Esta estrategia no fue exitosa, ya que no se obtuvieron los homodímeros solubles en el eluido de la columna. Esto podría deberse a que la cantidad de proteína fuera muy pequeña y no pudiera ser detectada, o a que las proteínas no quedaran retenidas en la columna. Así, se buscó otra metodología para la purificación de rEgGST2-3. Esto llevó a plantearnos la expresión de rEgGST2 fusionada a una cola de histidinas, lo que nos permitiría purificar a rEgGST2-3 por

afinidad de la misma a una resina de níquel-agarosa. Esta metodología tiene la ventaja de que, dado que rEgGST3 no presenta esta cola de histidinas, el homodímero rEgGST3-3 no quedará retenido en la columna, facilitando la purificación. Además, se puede separar rEgGST2-3 de rEgGST2-2 eluyendo las proteínas retenidas en la columna con un gradiente de concentración de imidazol. De esta forma, la metodología empleada permite la purificación de rEgGST2-3, separándola de posibles trazas de los homodímeros correspondientes presentes en el extracto.

Una vez expresada y purificada, se determinó la actividad de la enzima rEgGST2-3, en primera instancia con el CDNB, el sustrato modelo utilizado comúnmente para la determinación de la actividad glutatión transferasa (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). La enzima presentó una actividad específica de $1,2 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ frente a dicho sustrato. Si bien en este trabajo no se obtuvo el homodímero rEgGST3-3 en forma soluble, como había ocurrido previamente con rEgGST2, estudios posteriores permitieron obtener mínimas cantidades de estas enzimas, suficientes para determinar la actividad de las mismas frente al CDNB (Iriarte A. y col., 2012). Estos estudios, si bien son preliminares, indican actividades específicas de $1,7 \pm 0,1$ y $1,3 \pm 0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para rEgGST2-2 y rEgGST3-3 respectivamente. Para ciertas GSTs de mamíferos, se ha observado que la actividad frente a un determinado sustrato de una enzima heterodimérica presenta un valor intermedio entre las actividades de los correspondientes homodímeros (Hayes J. D. y Pulford D. J., 1995). En el caso de rEgGST2-3, la actividad con el CDNB se aproxima a la de rEgGST3-3, pero es menor que la de ambos homodímeros. Igualmente, si tenemos en cuenta el margen de error en la determinación de la actividad, podríamos decir que el valor de esta para rEgGST2-3 se encuentra en el orden de los de ambos homodímeros, e incluso podría ubicarse entre estos.

Las primeras GSTs identificadas fueron clasificadas, entre otros criterios, por los sustratos que eran capaces de utilizar. Cada una de las clases de GSTs de mamíferos cataliza un conjunto determinado de reacciones y utiliza sólo ciertos sustratos. Para determinar qué tipos de reacciones cataliza cada clase de enzimas se utilizan sustratos denominados "modelo". En el caso de los mamíferos, 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, entre ellos los helmintos parásitos. Esto se debe a que en general las GSTs de estos organismos pueden actuar sobre varios sustratos modelos correspondientes a diferentes clases (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). Este hecho ya había sido observado con EgGST1, que presenta actividad glutatión transferasa, entre otras, 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 L. y col., 2010) (Tabla 9). En el caso de

rEgGST2-3 se volvió a observar este comportamiento, ya que la enzima presenta actividad con el ácido etacrínico, marcador para la clase Pi, y con el DCNB, marcador de la clase Mu.

Además de los sustratos modelo, existen un conjunto de moléculas, como el *trans*-nonenal y el *trans-trans*-decadienal, generadas como productos de la peroxidación lipídica, que son utilizados como marcadores de estrés oxidativo (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). En este sentido, rEgGST2-3 exhibió cierta actividad frente al *trans-trans*-decadienal. Se han descrito GSTs parasitarias de diferentes clases que son capaces de conjugar GSH a este compuesto, y se las ha relacionado con la protección del parásito frente a la exposición a las especies oxidantes producidas por la respuesta inmune del hospedero (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008).

En la Tabla 9 se muestran los valores de actividad específica frente a diferentes sustratos de rEgGST2-3, rEgGST1 y dos enzimas de *S. mansoni*, una de clase Omega (SmGSTO) y otra de clase Sigma (SmGST28). Como podemos observar, los sustratos utilizados por rEgGST2-3 difieren en parte de los correspondientes a rEgGST1. Esto podría indicar que cada una de estas enzimas actuaría en cierta medida sobre diferentes tipos de sustratos, y por lo tanto podrían cumplir roles al menos ligeramente diferentes en el parásito.

Sustrato	Actividad específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			
	rEgGST2-3	rEgGST1	SmGSTO	SmGST28
CDNB	1,2 \pm 0,2	2,5 \pm 0,4	0,02	7,27
DCNB	0,015 \pm 0,005	ND	ND	ND
Ácido etacrínico	0,27 \pm 0,03	0,87 \pm 0,08	0,02	1,58
BSP	ND	0,015 \pm 0,007	-	ND
EPNP	ND	ND	-	ND
<i>trans</i> -nonenal	ND	0,15 \pm 0,02	-	0,45
<i>trans-trans</i> -decadienal	0,010 \pm 0,002	0,16 \pm 0,02	-	0,22

Tabla 9. Comparación de la actividad específica de rEgGST2-3 frente a diferentes sustratos con la correspondiente para rEgGST1 y dos GSTs de *S. mansoni*, una de clase Omega (SmGSTO) y una de clase Sigma (SmGST28). DCNB: 1,2-dicloro-4-nitrobenceno; BSP: bromosulfoftaleína; EPNP: 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano; ND: No se detectó. -: No fue determinada. Datos tomados de: Harispe y cols. (2010) (rEgGST1), Girardini y cols. (2002) (SmGSTO) y Torres-Rivera y cols. (2008) (SmGST28).

Se ha descrito que en general, las GSTs de parásitos, entre ellas las de helmintos, no utilizan el EPNP y la BSP como sustratos, mostrando preferencia por el ácido etacrínico y el hidróxido de cumeno (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). Los resultados obtenidos para rEgGST2-3 siguen también este comportamiento, aunque aún no se determinó si presenta actividad peroxidasa.

Además, rEgGST2-3 presenta una actividad relativamente baja frente al CDNB, al igual que SmGSTO. Esta característica ha sido observada para varias GSTs de clase Omega, tanto de mamíferos como de parásitos (Tabla 9) (Girardini J. y col., 2002; Whitbread A. K. y col., 2005). Los estudios con SmGSTO no incluyeron la determinación de la actividad frente a varios de los sustratos modelo más comunes. Sin embargo, esta enzima presenta actividad tioltransferasa y dehidroascorbato reductasa, y se ha propuesto que estas serían sus principales funciones (Girardini J. y col., 2002). Como se mencionó previamente, la actividad tioltransferasa de esta clase de GSTs estaría involucrada en reacciones de glutationilación y deglutationilación de proteínas. Estas reacciones serían importantes para la protección de las proteínas en condiciones de estrés oxidativo, así como para la regulación de su función en dichas condiciones (Townsend D. M., 2007). Por otra parte, la actividad dehidroascorbato reductasa 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). Las enzimas con actividad dehidroascorbato reductasa catalizan la reducción del dehidroascorbato a ascorbato acoplada a la oxidación del glutatión. 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 SmGSTO podría utilizar el ascorbato proveniente de su hospedero (Girardini J. y col., 2002), lo que contribuiría a la protección del parásito frente a los oxidantes. 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. Hasta el momento no hemos podido determinar si rEgGST2-3 presenta actividad tioltransferasa y dehidroascorbato reductasa, características de las GSTs de clase Omega. Teniendo en cuenta que no se han identificado GSTs de esta clase en cestodos y que EgGST3 presenta los residuos catalíticos conservados de esta clase, se podría sugerir que EgGST3, y quizás también EgGST2-3, podrían cumplir dichas funciones en estos organismos.

Las GSTs han recibido gran atención dentro de las enzimas parasitarias debido a sus funciones detoxificantes e inmunomoduladoras y se ha propuesto que la inactivación o neutralización de las mismas puede producir efectos nocivos sobre el parásito, que podrían incluso conducir a su muerte (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). En este sentido, y teniendo en cuenta además, que existen importantes diferencias a nivel estructural entre las GSTs de parásitos y las de mamíferos, se ha planteado que las GSTs podrían ser blanco de drogas antihelmínticas (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). Incluso está en discusión una posible relación de las GSTs con la resistencia a ciertas drogas observada en algunos parásitos (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). Además, se ha observado una inducción de la expresión de GSTs

por xenobióticos (Cvilink V. y col., 2009), por lo que la exposición del parásito a la droga podría estimular la producción de estas enzimas, favoreciendo así su inactivación. Se han descrito GSTs parasitarias capaces de unir algunas drogas antihelmínticas, y se ha observado que la unión produce una inhibición de la actividad enzimática (Brophy P. M. y col., 1989). En este trabajo se comenzó a analizar la inhibición de rEgGST2-3 por algunos antihelmínticos disponibles. Dentro de los compuestos estudiados, el mebendazol fue el que produjo una mayor inhibición de la actividad enzimática. Vale la pena mencionar además que el mebendazol induce la expresión de EgGST2 en PEs en cultivo (Arbildi P., 2013). Además, también se observó inhibición, aunque en menor medida, con el hexaclorofeno, closantel y bitionol. Esto concuerda con lo observado para otras GSTs de helmintos, las cuales resultan, en general, más sensibles al bitionol y al hexaclorofeno que al resto de los antihelmínticos, y en particular al albendazol (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). De todas formas, en los ensayos realizados con algunos de los antihelmínticos se observó una baja reproducibilidad. Esto podría deberse a dificultades en la solubilización de los antihelmínticos. La concentración a utilizar de cada uno de los compuestos fue optimizada previamente, de forma de ser la máxima concentración en la que no se observara precipitación del compuesto. Si bien en cada ensayo se verificó que no se formaran precipitados, quizás estos no fueron visibles pero su presencia afectó los valores de absorbancia obtenidos, y por lo tanto, la actividad de la enzima determinada.

De esta forma, se podría pensar en EgGST2-3 como un posible blanco de nuevos antihelmínticos. Igualmente, para el diseño racional de nuevas drogas que puedan ser utilizadas en el tratamiento de infecciones por helmintos, sería importante disponer de la estructura cristalográfica de EgGST2-3 y conocer qué otras actividades enzimáticas presenta. En nuestro grupo ya se está trabajando para cristalizar la proteína y luego poder determinar su estructura. Por el momento disponemos de un modelo de la misma creado en base a la estructura de una GST de *S. mansoni* (Iriarte A. y col., 2012), que podría ser de utilidad si decidiéramos profundizar en la búsqueda de nuevos inhibidores, mientras obtenemos la estructura cristalina de la EgGST2-3.

Por otra parte, se ha descrito que la actividad enzimática de las GSTs parasitarias puede ser inhibida por anticuerpos específicos generados contra ellas (Riveau G. y col., 2012). La producción de anticuerpos contra las GSTs de helmintos ha sido observada en varios de sus hospederos (Shuxian L. y col., 1997; LaCourse E. J. y col., 2012; Riveau G. y col., 2012), y se han realizado estudios con el fin de determinar si podrían ser candidatas para el desarrollo de vacunas. En los estudios realizados el éxito obtenido ha sido variable. Los resultados más alentadores fueron conseguidos con las GSTs de *Schistosomas* spp. Este es el caso de una GST

de *S. haematobium*, Sh28GST, que está siendo utilizada en ensayos clínicos (Riveau G. y col., 2012). Se ha observado que la inmunización de diferentes animales con esta enzima seguida de una infección experimental disminuye el número de parásitos y/o la fecundidad de los mismos. Además, la producción de anticuerpos específicos contra la enzima, capaces de inhibir su actividad ha sido relacionada con la resistencia a una re-infección en humanos. Esta información llevó a iniciar estudios clínicos para determinar la inmunogenicidad de la preparación conteniendo Sh28GST, así como la seguridad en su administración y la tolerancia de los individuos a la misma (Riveau G. y col., 2012).

Si bien las GSTs de clase Sigma de helmintos han adquirido en la actualidad una gran importancia en la búsqueda de estrategias de control de las infecciones por estos parásitos, también se han realizado estudios con GSTs de otras clases. En este sentido, se ha observado que la inmunización de varios hospederos de *S. japonicum* (búfalos, cerdos y ratones) con una GST de clase Mu de este parásito (Sjc26GST) estimula la producción de anticuerpos específicos para esta proteína (Shuxian L. y col., 1997). La inmunización de búfalos con Sjc26GST produce una disminución en el número de parásitos así como de huevos tanto depositados en los tejidos del hospedero como los liberados en las heces en los animales desafiados.

Hasta el momento no se han llevado a cabo ensayos de inmunización con GSTs de clase Omega de helmintos parásitos, por lo que la posibilidad de ser utilizadas para el desarrollo de vacunas no ha sido probada. De todas formas, se ha detectado la producción de anticuerpos específicos para OVGST3, una GST de clase Omega de *O. volvulus*, por pacientes con infecciones por este parásito (Liebau E. y col., 2008).

De esta forma, los anticuerpos producidos contra las GSTs parasitarias podrían ser un componente importante de la respuesta inmune contra los helmintos, que podría ser aprovechado para el diseño de vacunas. Teniendo esto en consideración, decidimos analizar la presencia de anticuerpos anti-EgGST2-3 en sueros de pacientes con infección por *E. granulosus* confirmada quirúrgicamente. Los resultados muestran una diferencia significativa entre los sueros de los pacientes y los de individuos no infectados con relación a la presencia de anticuerpos anti-rEgGST2-3. Dado que no tenemos a las subunidades EgGST2 y EgGST3 solubles, sólo pudimos analizar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer el heterodímero rEgGST2-3, pero no podemos saber si estos reconocen a una subunidad en particular o si hay anticuerpos específicos para las dos. De todas formas, se podría realizar un *Western-blot* para identificar qué subunidades son reconocidas por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes, ya que para eso no necesitamos a las EgGSTs solubles. Por otra parte, sería importante analizar un número mayor de sueros de pacientes así como de

individuos control no infectados para tener una muestra más representativa de ambas poblaciones y así confirmar el comportamiento observado.

Teniendo en cuenta que se utilizó como anticuerpo secundario en el ELISA un anti-(IgG humana), sabemos además que los anticuerpos detectados son de isotipo IgG, aunque no podemos especificar a qué subtipo pertenecen y tampoco si existen anticuerpos de otras clases. En pacientes con equinococosis quística crónica, se ha descrito la presencia de anticuerpos de isotipo IgM, IgE e IgG (Zhang W. y col., 2012). Dentro de esta última clase, predomina primeramente el subtipo IgG1 y con el transcurso de la infección comienza a predominar IgG4 (Siracusano A. y col., 2012). Los anticuerpos de tipo IgG4 no participan en mecanismos de citotoxicidad ni pueden fijar complemento, por lo que se ha propuesto que la inducción por parte del parásito de respuestas en las que predominan estos anticuerpos constituiría un mecanismo para evadir la respuesta inmune del hospedero (Siracusano A. y col., 2012). Se ha asociado a las respuestas de IgG4 con el crecimiento y desarrollo de los quistes, y por lo tanto, con la progresión de la enfermedad, mientras que IgG1, 2 y 3 estarían relacionadas con quistes infiltrados o destruidos por el hospedero (Zhang W. y col., 2012).

Vale la pena mencionar que también se han detectado anticuerpos específicos para EgGST1 en sueros de pacientes con equinococosis quística (Monteiro K. M. y col., 2010). La producción de anticuerpos específicos para las EgGSTs sugiere que estas enzimas podrían localizarse en las regiones del parásito en contacto con el hospedero, o incluso ser secretadas. De esta forma, las EgGSTs no sólo estimularían la producción de anticuerpos sino que también podrían estar en contacto con células del sistema inmune, afectando su activación y sus funciones, y por lo tanto la respuesta frente al parásito. Esto se ha descrito para FhGST-S1, que es capaz de activar células dendríticas inhibiendo el desarrollo de una respuesta Th17 (Dowling D. J. y col., 2010). Además se ha descrito que GSTs de clase Sigma de helmintos, entre otros mecanismos, producen compuestos inmunomoduladores como las prostaglandinas (Arbildi P., La Rocca S., Fernández, V., 2011). Dado que EgGST2 pertenece a la clase Sigma, y que EgGST3 presenta características que la acercan a dicha clase, podríamos pensar que EgGST2-3, y los correspondientes homodímeros, podrían presentar actividad prostaglandina sintasa. Durante la realización de este trabajo no pudimos disponer de los reactivos necesarios para llevar a cabo los ensayos de actividad con rEgGST2-3, pero es uno de los objetivos planteados por nuestro grupo de trabajo.

A modo de resumen, podemos decir que *E. granulosus* expresa una GST heterodimérica formada por las subunidades EgGST2 y EgGST3, que presenta actividad con sustratos modelos de las glutatión transferasas así como con productos secundarios de la peroxidación lipídica. Este hecho, en conjunto con los estudios realizados previamente sobre el origen y clasificación

de ambas subunidades sugieren que EgGST2-3 podría estar involucrada en la protección del parásito frente al estrés oxidativo. En este sentido, debe confirmarse si EgGST2-3 presenta también actividad tioltransferasa y dehidroascorbato reductasa. Además, EgGST2-3 podría afectar la respuesta inmune del hospedero actuando directamente sobre las células del sistema inmune o produciendo compuestos inmunomoduladores como prostaglandinas, pero esto también debe ser verificado. Finalmente, se detectaron anticuerpos específicos que reconocen a rEgGST2-3 en sueros de pacientes con infecciones por este cestodo, lo que podría contribuir a la neutralización e inhibición de la actividad de estas enzimas en el hospedero. Este hecho sugiere una posible aplicación de las EgGSTs en el desarrollo de vacunas contra *E. granulosus*.

Capítulo 6. Localización de las EgGSTs

La localización de una proteína proporciona información relevante para conocer su función en el organismo. En este capítulo se describe la distribución de las EgGSTs en los diferentes componentes del quiste hidático así como la identificación de los dominios de expresión dentro del protoescólex.

6.1. Resultados

6.1.1. Detección de EgGSTs en diferentes materiales parasitarios

Se analizó la presencia de las tres EgGSTs en PEs, líquido hidático y capa germinativa mediante *Western-blot*, utilizando los anticuerpos específicos para cada una de ellas previamente obtenidos por nuestro grupo (Figura 22). En el *Western-blot* se observan bandas del peso molecular esperado para las respectivas GSTs (24-25KDa) en los extractos de PEs. En el caso de EgGST1, también se observa una banda del peso esperado en los carriles correspondientes a los extractos de capa germinativa y líquido hidático (Figura 22).

De esta forma, se puede afirmar que las tres EgGSTs se encuentran en PEs, como ya se había descrito previamente, y solamente EgGST1 se encuentra además en capa germinativa y líquido hidático.

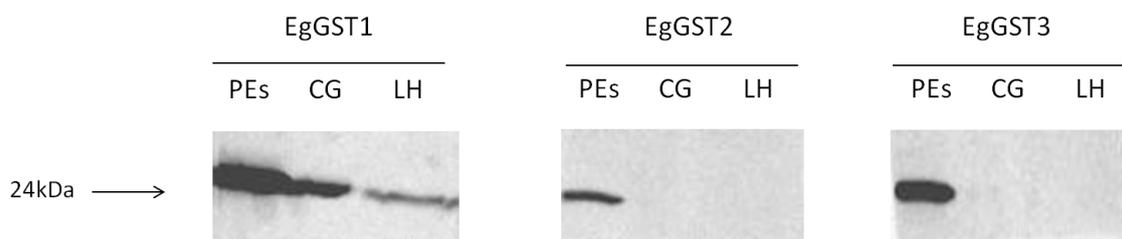


Figura 22. Localización de las EgGSTs en diferentes materiales parasitarios. Se muestra un *Western-blot* en el que se analizaron muestras de protoescólices (PEs), capa germinativa (CG) y líquido hidático (LH). Se utilizaron anticuerpos de conejo específicos para cada EgGST y un anticuerpo secundario anti-IgG conejo conjugado a peroxidasa. El revelado se realizó por quimioluminiscencia.

6.1.2. Identificación de EgGSTs en productos de excreción-secreción

En la sección anterior, se detectó EgGST1 en líquido hidático, lo que podría estar indicando que dicha proteína podría ser secretada por el parásito. Mientras tanto, EgGST2 y EgGST3 no fueron detectadas en esta fracción. De todas formas, debemos considerar que ambas proteínas se expresan en niveles bajos en comparación con EgGST1 (Arbildi P., 2013) y

que las proteínas del hospedero están presentes en el líquido hidático en altas concentraciones, lo que, en conjunto, podría estar dificultando su detección. Es por esto que se realizaron otros abordajes para estudiar la posibilidad de que las EgGSTs sean secretadas. Una primera aproximación fue mediante predicciones bioinformáticas, para buscar la presencia de péptido señal en las secuencias aminoacídicas. Ninguna de las tres EgGSTs presenta dicho péptido señal en su extremo N-terminal. Sin embargo, se han descrito proteínas extracelulares que no requieren un péptido señal para su secreción y se han desarrollado programas bioinformáticos para predecir si esto puede suceder para una determinada proteína (Bendtsen J. D. y col., 2004). De todas formas, estos programas están diseñados para ser aplicados al estudio de proteínas bacterianas o de mamíferos. Es por esto que dicha aproximación no fue llevada a cabo con las EgGSTs.

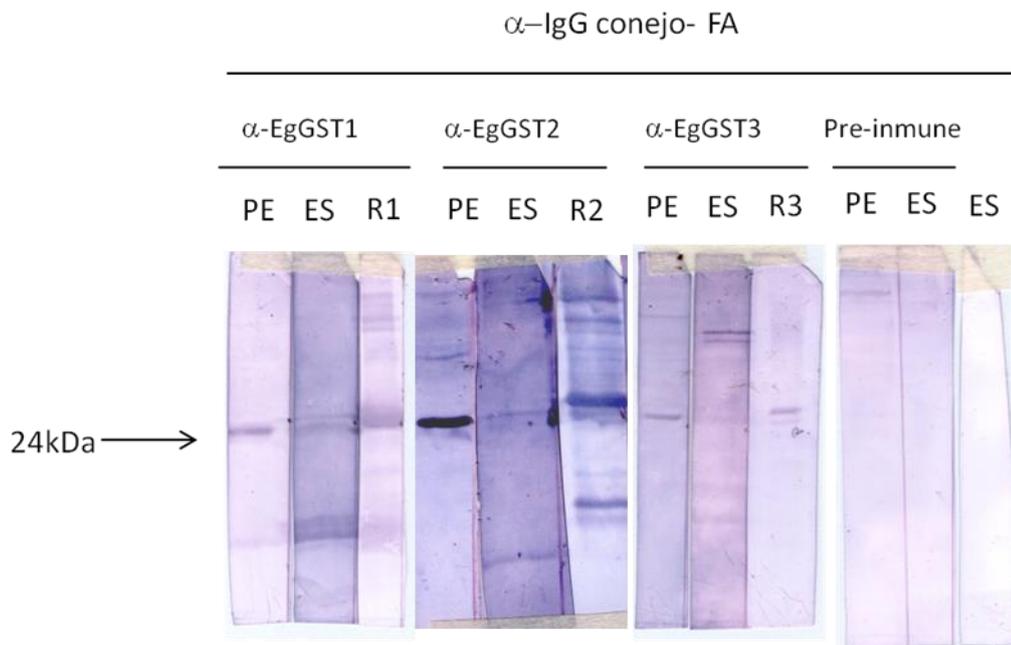


Figura 23. Detección de las EgGSTs en productos de excreción-secreción de *E. granulosus*. Western-blot en el que se analizó la presencia de cada una de las subunidades en sonicado de PEs (PE) y en productos de excreción-secreción (ES). Como control, se verificó el reconocimiento por parte de cada suero de la correspondiente proteína recombinante (R1, R2 y R3). Las fracciones PE y E-S fueron enfrentadas además a un suero pre-inmune de conejo y se realizó un control de la fracción ES sin anticuerpo primario. El revelado se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (FA). Los sueros fueron utilizados en una dilución de (dilución 1/250).

Otra estrategia utilizada, fue analizar la presencia de las tres EgGSTs en productos de excreción-secreción de parásitos en cultivo. Los anticuerpos específicos para cada subunidad reconocen a la proteína recombinante correspondiente por Western-blot (Figura 23). Se observan además bandas del peso molecular esperado para cada una de las tres EgGSTs en los

extractos de los PEs puestos en cultivo, así como en el medio de cultivo de los mismos. Además, se verificó que no hay reconocimiento por parte del anticuerpo secundario así como del suero pre-inmune de las proteínas presentes en los productos de excreción-secreción (Figura 23). Estos resultados indican que *E. granulosus* podría, si se dieran las condiciones adecuadas, secretar las tres EgGSTs.

6.1.3. Localización de las EgGSTs en protoescólex

En esta sección se presentan los resultados obtenidos del análisis de la localización de las EgGSTs en PEs mediante inmunofluorescencia. Este trabajo se llevó a cabo en el marco de una pasantía realizada en el Laboratorio de Proteínas y Ácidos Nucleicos del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, bajo la supervisión de la Dra. Alejandra Kun.

En primera instancia se utilizaron PEs recién extraídos de los correspondientes quistes hidáticos y lavados según lo descrito en Materiales y Métodos. Primeramente, se visualizó su estructura por microscopía óptica, la cual concuerda con lo descrito previamente en la literatura (Galindo M. y col., 2002; Galindo M. y col., 2008) (Figura 24). Posteriormente, se analizó la localización de las EgGSTs en PEs evaginados. Dado que no nos es posible acceder a la forma adulta del parásito, el estudio de los PEs evaginados nos podría dar una idea de los cambios que podría sufrir el parásito durante su maduración, tanto a nivel estructural así como también en la distribución de enzimas parasitarias, en este caso las EgGSTs. Para la obtención de los parásitos evaginados, los PEs extraídos de los quistes fueron cultivados en las condiciones descritas en Materiales y Métodos y observados periódicamente. En trabajos previos se había observado que en dichas condiciones los PEs evaginan al poco tiempo de cultivo (horas o días). Inicialmente los PEs se mantienen prácticamente inmóviles. A las pocas horas de cultivo, los PEs ya comienzan a mostrarse más activos, realizando diferentes tipos de movimientos que finalmente terminarían con la salida del escólex al exterior. Este proceso no es sincronizado, de forma que se observan simultáneamente PEs en diferentes etapas del mismo. En los parásitos evaginados se pudieron observar las principales regiones descritas por Galindo y colaboradores (2008), cuerpo, cuello y escólex (Figura 24).

Posteriormente, se pasó al estudio por inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como referencia para la determinación de la localización de las EgGSTs se visualizó la distribución de los núcleos celulares y los filamentos de actina. Los núcleos, visualizados por tinción con DAPI, muestran una distribución no homogénea. Se observa mayor abundancia de núcleos celulares en las ventosas y en la región que rodea al rostelo (Figura 25) y en menor proporción, en la región subtegumentaria del organismo. Este patrón de distribución de los núcleos celulares observado en los parásitos con el escólex invaginado concuerda con lo descrito previamente

por Martínez y cols. (2005). Un patrón similar se observa en los parásitos evaginados (Figura 25).

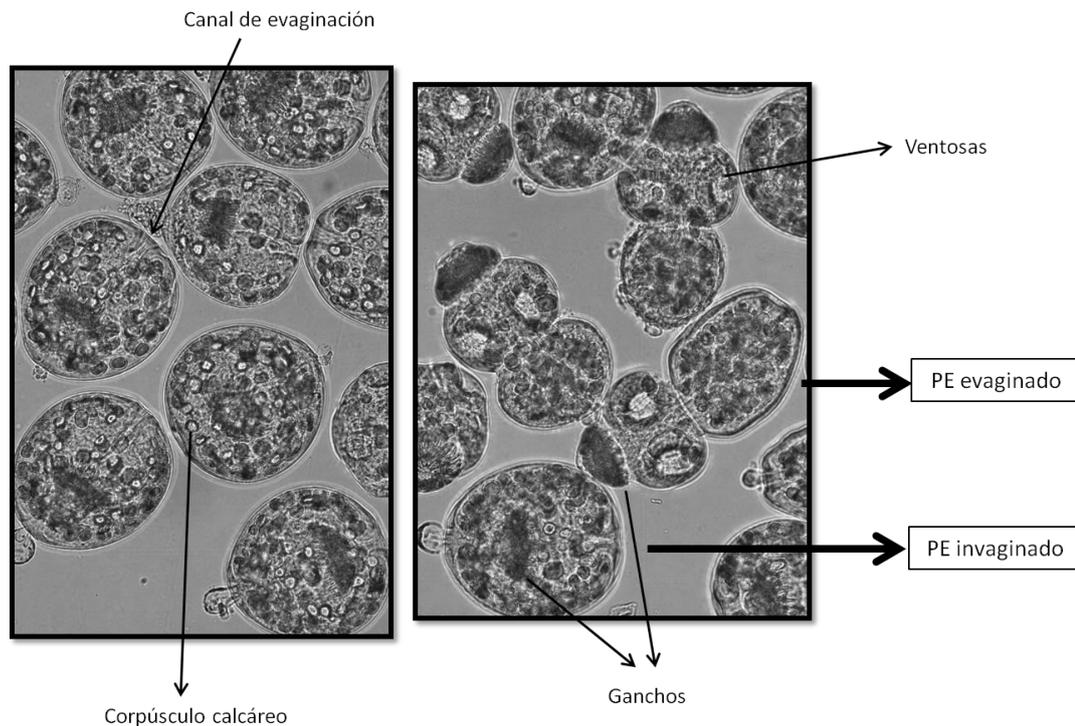


Figura 24. Morfología de los PEs visualizada por microscopía óptica. Aumento 20X.

Los filamentos de actina fueron detectados mediante el uso de faloidina marcada con un fluoróforo. En los parásitos invaginados se distingue una capa de fibras musculares subtegumentaria conformada por fibras tanto longitudinales como transversales que se extienden a lo largo de todo el organismo (Figura 25). Las ventosas presentan una musculatura importante compuesta por un conjunto de fibras radiales, las cuales han sido descritas también en otros cestodos (Ambrosio J. R. y col., 2003). Se observa además, un grupo de fibras dispuestas en diferentes direcciones en la zona que correspondería al rostelo (Figura 25).

El parásito evaginado mantiene la disposición de la musculatura subtegumentaria, observándose un estrechamiento que constituye el cuello del mismo (Figura 25). Este da lugar a la separación entre el escólex y el cuerpo del parásito propiamente dicho. Dentro del escólex, en la región del rostelo, las coronas de ganchos se disponen sobre una región con importante presencia de fibras musculares que actuarían como soporte y permitirían los movimientos necesarios para el anclaje al intestino del hospedero. Las ventosas mantienen la misma organización de las fibras musculares observada en el parásito invaginado. En la zona entre las ventosas se observa un entramado de fibras en diversas direcciones, situación que se mantiene en el cuello y el cuerpo del parásito. El cuerpo además exhibe algunas

organizaciones circulares de actina, también observadas en parásitos invaginados. Si bien en las condiciones trabajadas no se puede reconocer a qué corresponden, estos anillos de actina podrían estar rodeando determinadas estructuras, por ejemplo corpúsculos calcáreos, cuya presencia ha sido descrita en esta región del parásito.

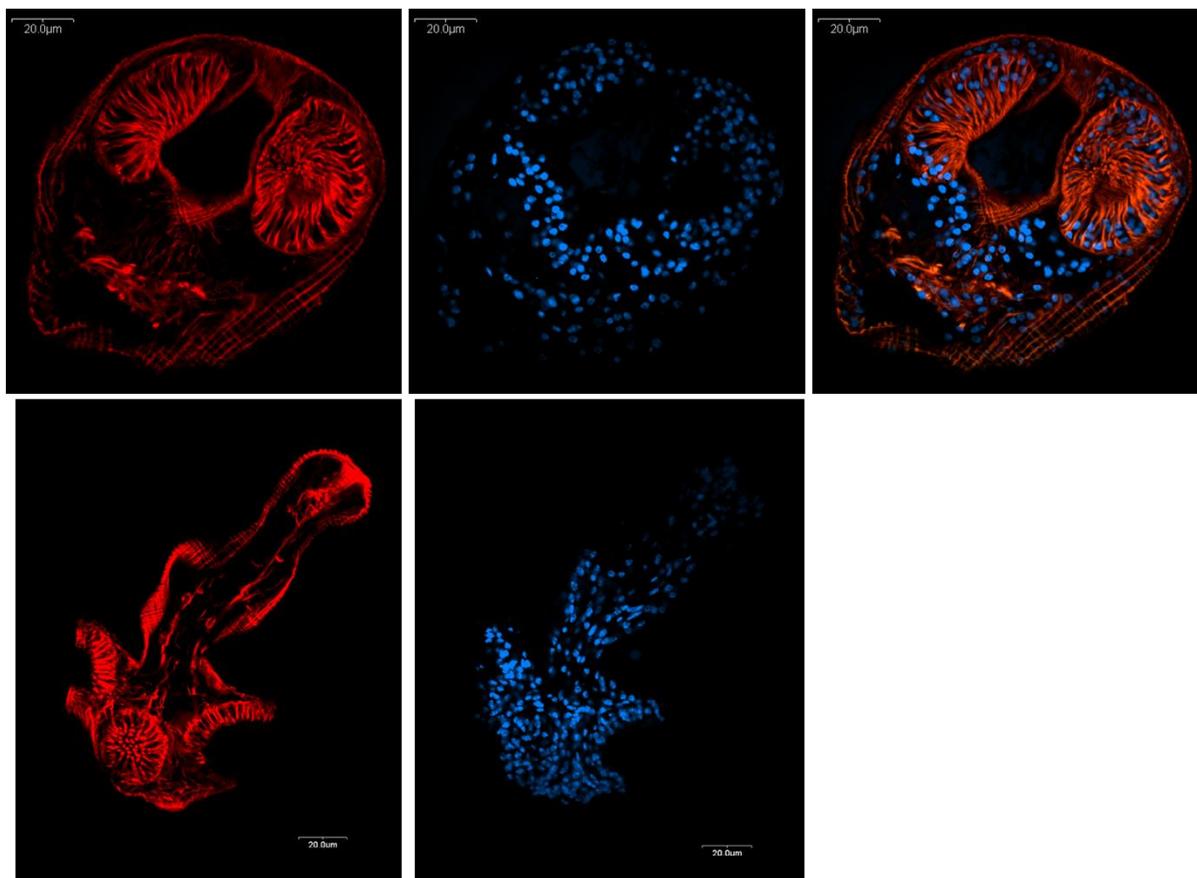


Figura 25. Visualización de los filamentos de actina y los núcleos celulares en PEs. Se muestran las señales de la actina (rojo) y los núcleos (azul) por tinción con faloidina marcada y DAPI respectivamente. En la parte superior de la imagen las señales individuales y superpuesta en un PE invaginado y en la parte inferior las señales individuales en PE evaginado. Aumento 60X.

De esta forma, la utilización de un marcador para los núcleos celulares y los filamentos de actina nos permitió visualizar en parte la morfología del parásito, identificando las diferentes estructuras descritas en la literatura y su distribución, lo que resultará muy importante para poder analizar la localización de las GSTs parasitarias.

6.1.3.1. Localización de las EgGSTs en PEs

Se estudió la localización de las tres EgGSTs mediante inmunofluorescencia. Para esto, se utilizaron los correspondientes sueros específicos para cada una de las subunidades producidos en conejos y anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugado con el

fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (señal visualizada en color verde). Se realizó un control sin anticuerpo primario, para determinar la contribución a la señal de las interacciones inespecíficas entre el anticuerpo secundario y los tejidos del parásito así como la propia fluorescencia del mismo (autofluorescencia) (Figura 26). La señal detectada en este control fue utilizada posteriormente para definir el umbral que determina si una señal es positiva o negativa.



Figura 26. Control para el estudio de PEs sin sueros específicos. En verde se muestra la autofluorescencia de un PE invaginado, sometido a la técnica de Inmunofluorescencia (ver 2.2.6.2) donde se sustituyó el anticuerpo primario por buffer de incubación. El anticuerpo secundario fue utilizado en una dilución de 1/1000. Aumento 60X.

6.1.3.2. Localización de EgGST1

La señal específica para EgGST1 parece localizarse en todo el parénquima del PE invaginado (Figura 27). También se puede observar la presencia de esta proteína en la región externa del parásito, por fuera de la red de fibras musculares subtegumentarias. Esto podría indicar la expresión de EgGST1 en el tegumento del parásito. Este patrón de expresión cambia ligeramente en los PEs evaginados, ya que en éstos la señal específica para EgGST1 es más débil en el parénquima, presentando una mayor intensidad en el tegumento (Figura 28).

Al analizar la distribución de EgGST1 se pudo observar además que en algunas regiones la señal parecería co-localizar con los núcleos celulares (Figura 29). Al visualizar dicha región a mayor aumento, se observó que la señal correspondiente a EgGST1 en ciertas zonas rodea a los núcleos o se superpone con los mismos. De esta forma, se podría pensar que EgGST1 se encuentra en dicho compartimento. Se realizó un análisis informático de la localización subcelular de EgGST1, que indica una probabilidad de prácticamente el 96% de que EgGST1 sea una proteína citosólica. Sin embargo, habría un 3,4% de probabilidades de que se encontrara en el núcleo, un 0,4% en la membrana y un 0,2% en la mitocondria.

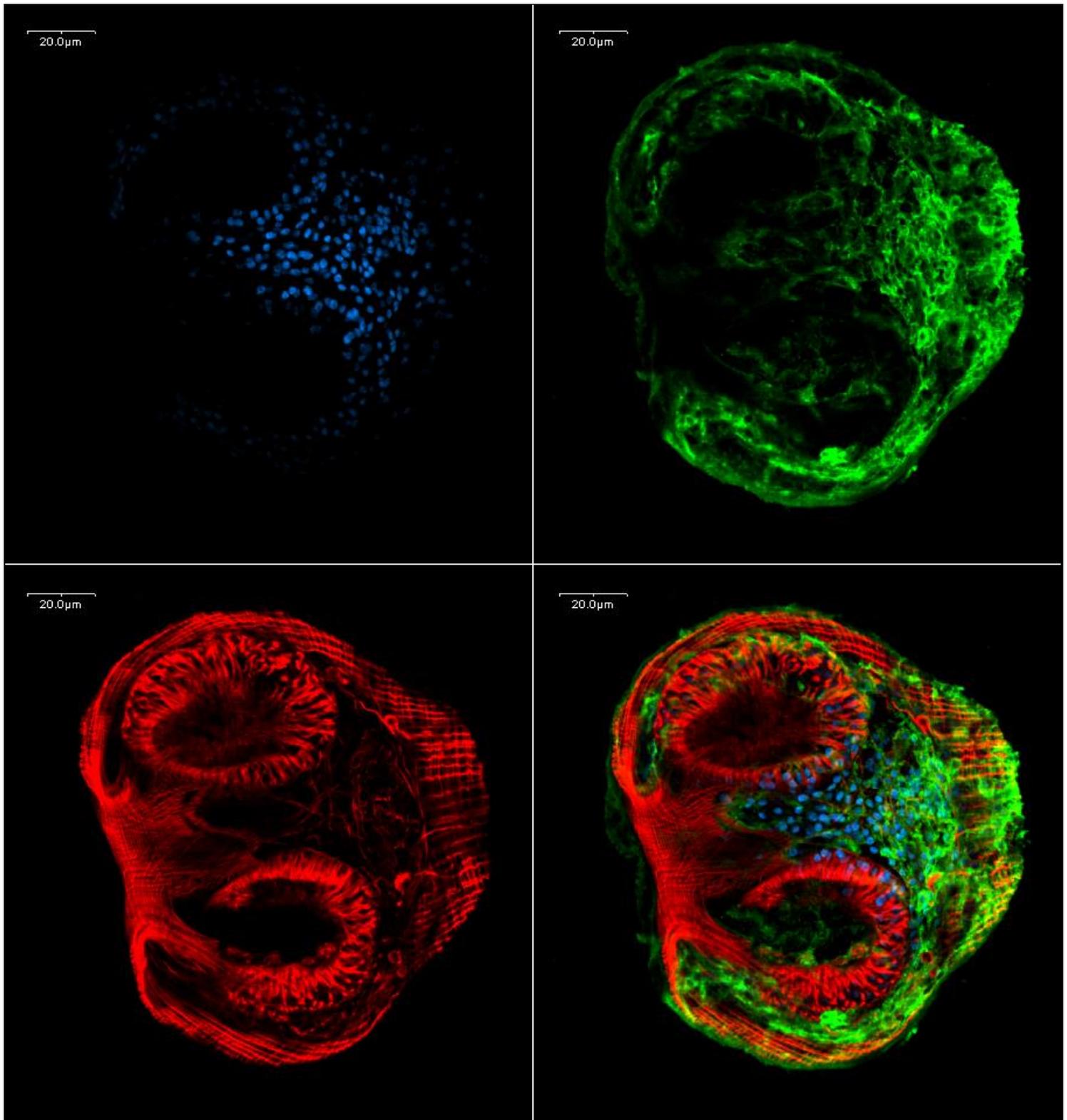


Figura 27. Localización de EgGST1 en PEs invaginados. En azul se observan los núcleos celulares (tinción con DAPI) y en rojo los filamentos de actina (tinción con faloidina marcada). En verde se muestra la distribución de EgGST1. Se utilizó el antisuero específico producido en conejo para esta subunidad (dilución 1/100) y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa 488 (dilución 1/1000). Se presenta además la superposición de las tres señales. Aumento de las imágenes 60X.

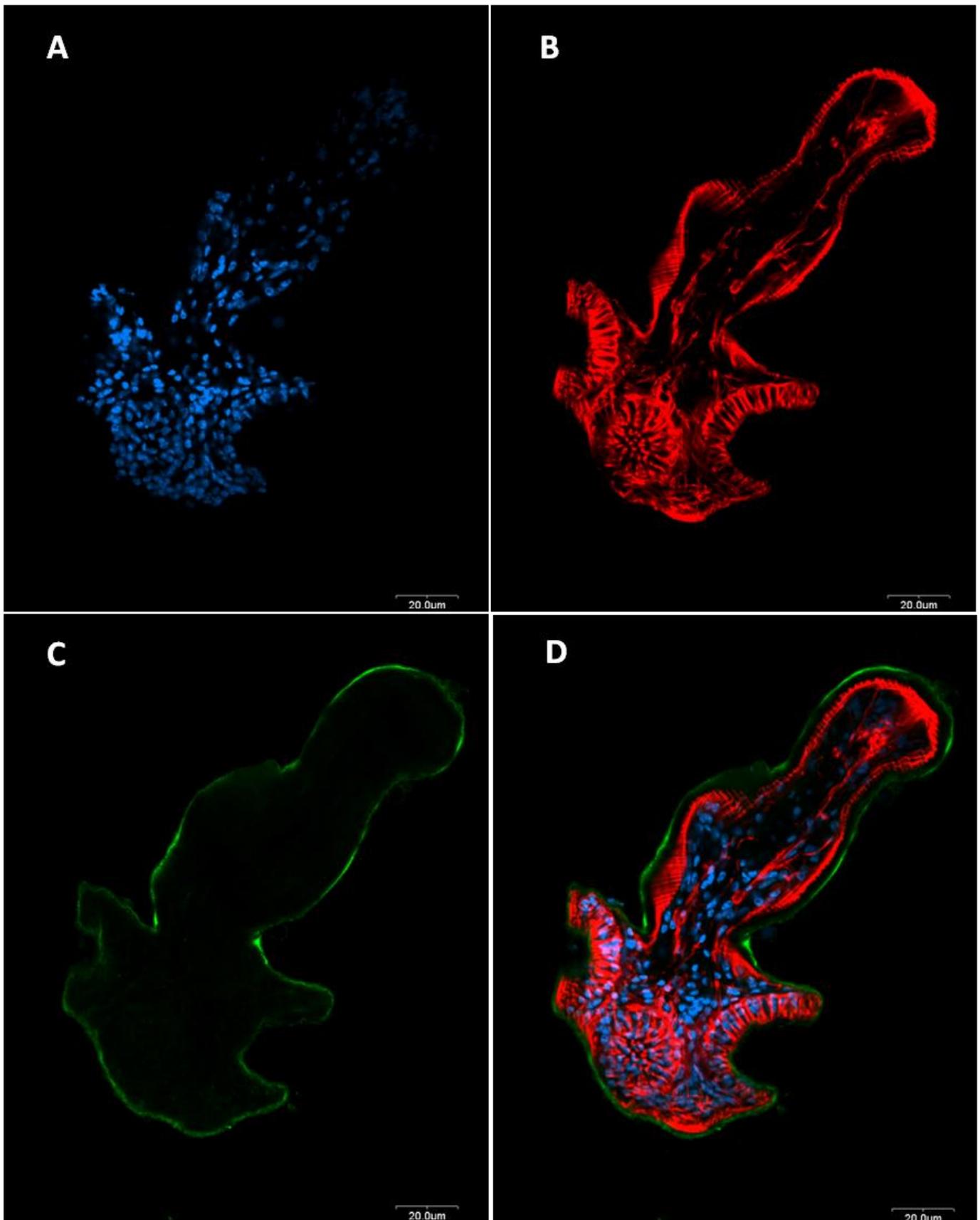


Figura 28. Localización de EgGST1 en PEs evaginados. (A) Núcleos celulares visualizados por tinción con DAPI. (B) Filamentos de actina. (C) Señal específica para EgGST1. (D) Superposición de las tres señales. El suero específico para EgGST1 fue utilizado en una dilución 1/100 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

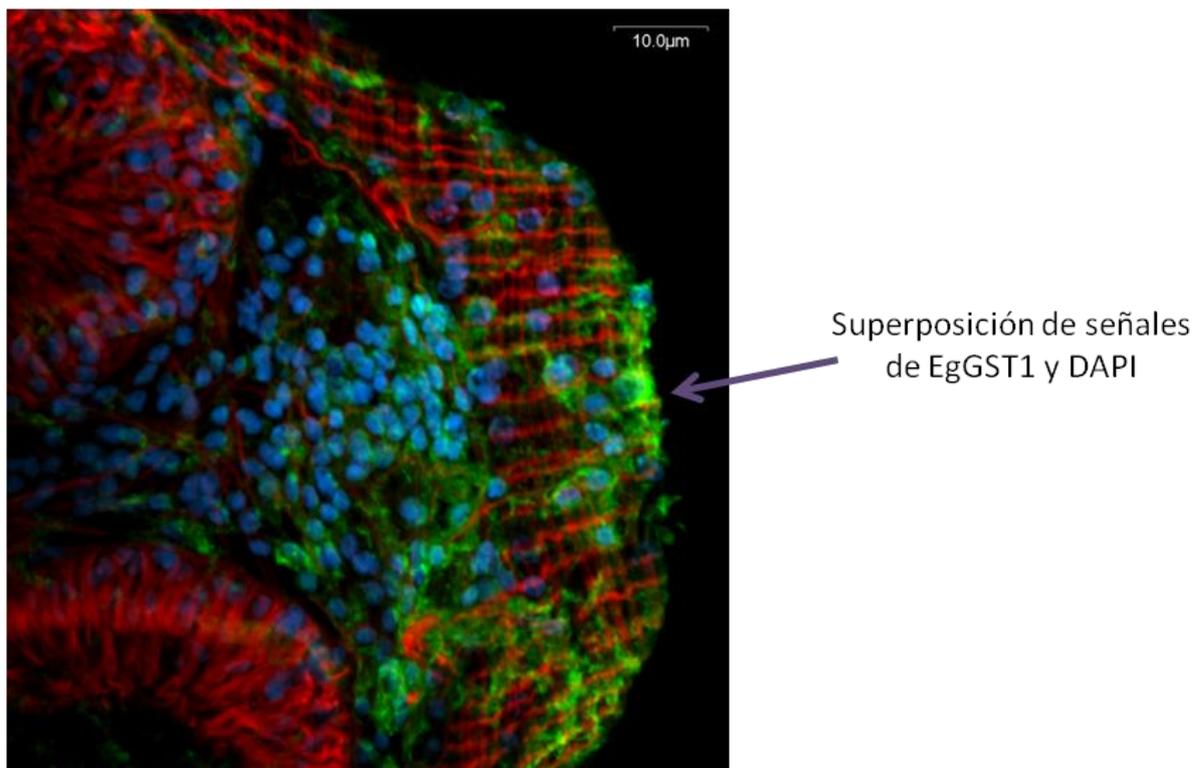


Figura 29. Localización de EgGST1 en PEs. Vista ampliada (aumento 120X) de una región del PE invaginado de la Figura 27.

6.1.3.3. Localización de EgGST2

Al analizar la expresión de EgGST2 en los PEs invaginados, se puede observar que esta proteína se localiza principalmente en la región más externa del parásito, por fuera de lo que es la red de fibras musculares, indicando que EgGST2 podría estar presente en el tegumento del parásito. En cambio, la señal en las ventosas y el parénquima es similar a la fluorescencia basal (Figura 30). Una situación similar se advierte en PEs total (Figura 31) y parcialmente evaginados (Figura 32), donde EgGST2 se expresa mayoritariamente en el tegumento, en todo el largo del organismo, incluyendo el que rodea el rostelo y las ventosas. En la figura 31 también se muestra una ventosa aislada. En la misma se puede ver que la expresión de EgGST2 se localiza principalmente en la base de la ventosa.

Con respecto a la localización sub-celular, el programa YLoc predice que existe una gran probabilidad (84,2%) de que EgGST2 sea una proteína citosólica. Sin embargo, también podría localizarse en la mitocondria, en el núcleo o en la membrana siendo las probabilidades de que esto ocurra del 13,9%, 1,8% y 0,1% respectivamente. Como se mencionó anteriormente, EgGST2 también fue localizada en productos de excreción-secreción de PEs, por lo que podría ser secretada por el parásito.

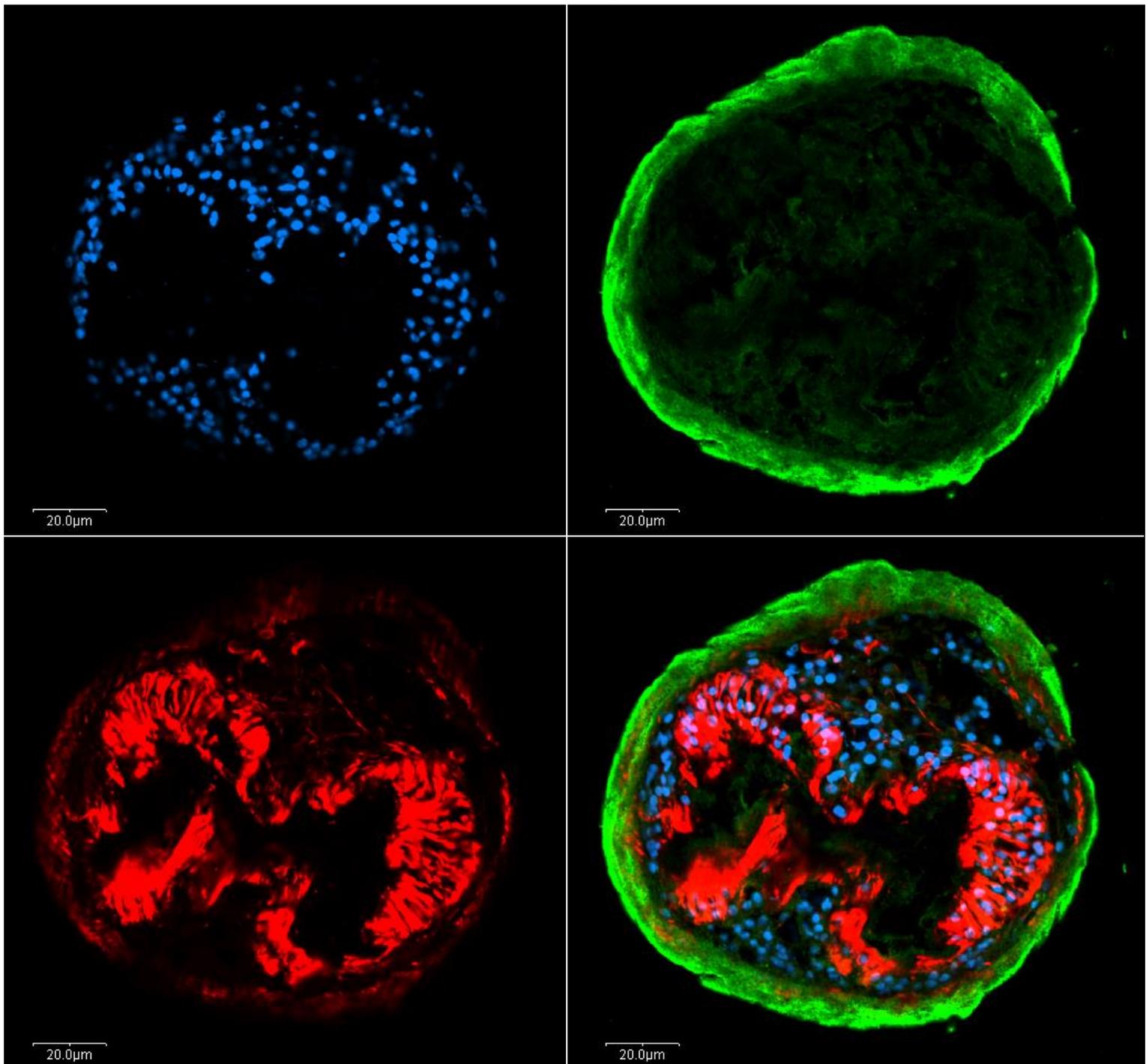


Figura 30. Localización de EgGST2 en PEs invaginados. En azul se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI y en rojo los filamentos de actina teñidos con faloidina marcada. En verde se encuentra la distribución de EgGST2. Se utilizaron los anticuerpos específicos producidos en conejo para esta subunidad (dilución 1/100) y un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa 488 (dilución 1/1000). Se presenta además la superposición de las tres señales. Aumento de las imágenes 60X.

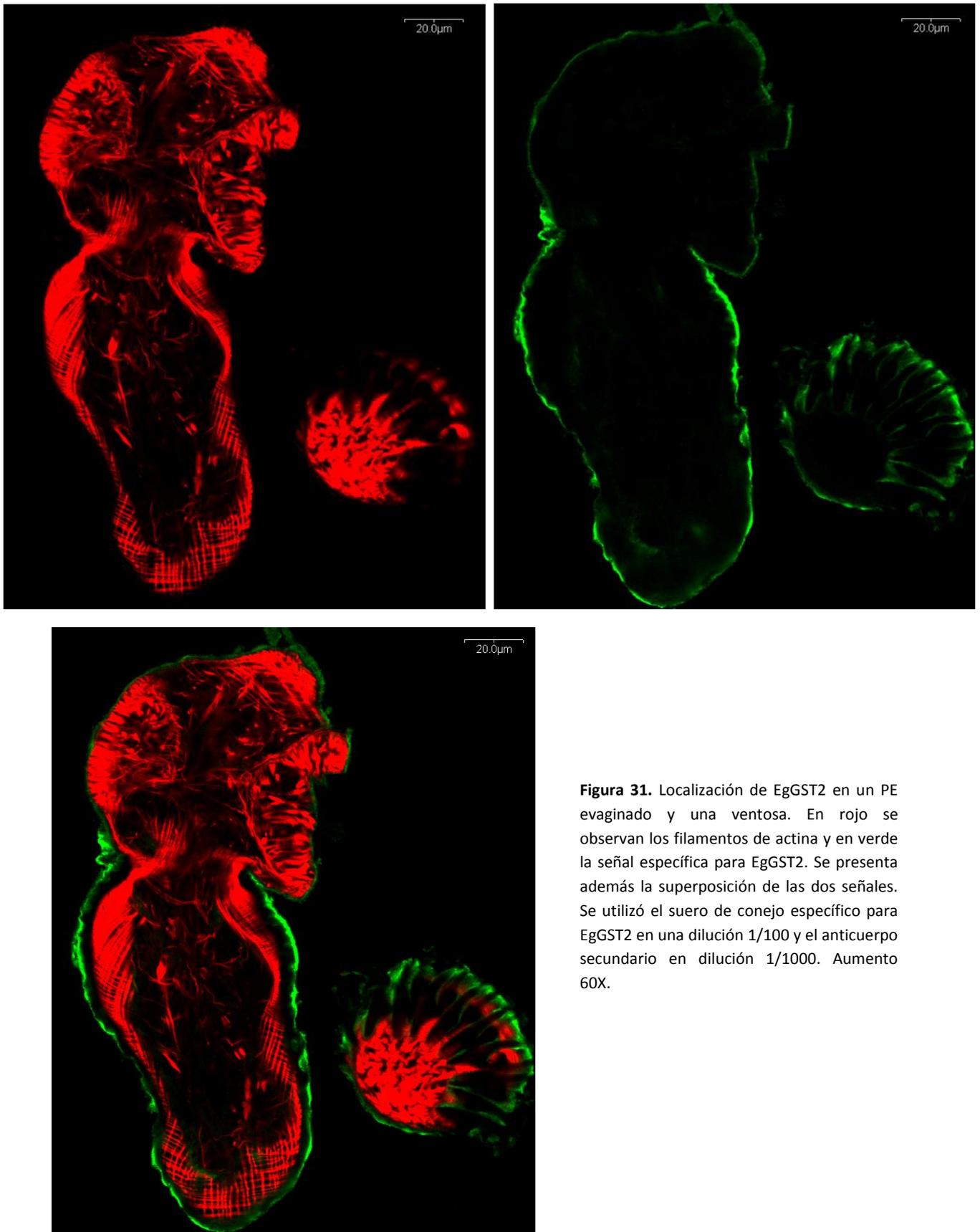


Figura 31. Localización de EgGST2 en un PE evaginado y una ventosa. En rojo se observan los filamentos de actina y en verde la señal específica para EgGST2. Se presenta además la superposición de las dos señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST2 en una dilución 1/100 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

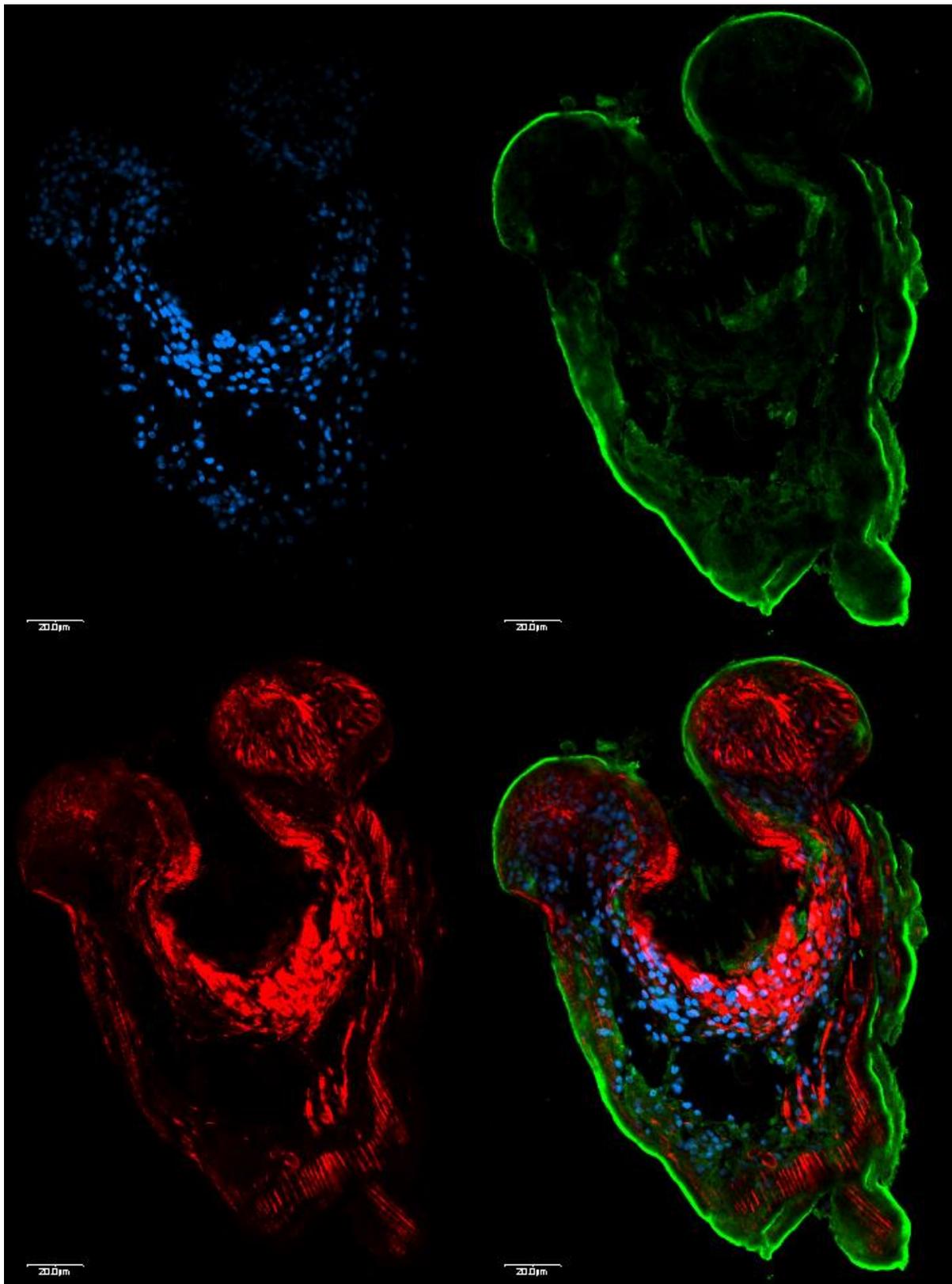


Figura 32. Localización de EgGST2 en PEs parcialmente evaginados. Se muestra la localización de los núcleos celulares (azul), filamentos de actina (rojo) y la señal específica para EgGST2. Se incluye además la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST2 en una dilución 1/100 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

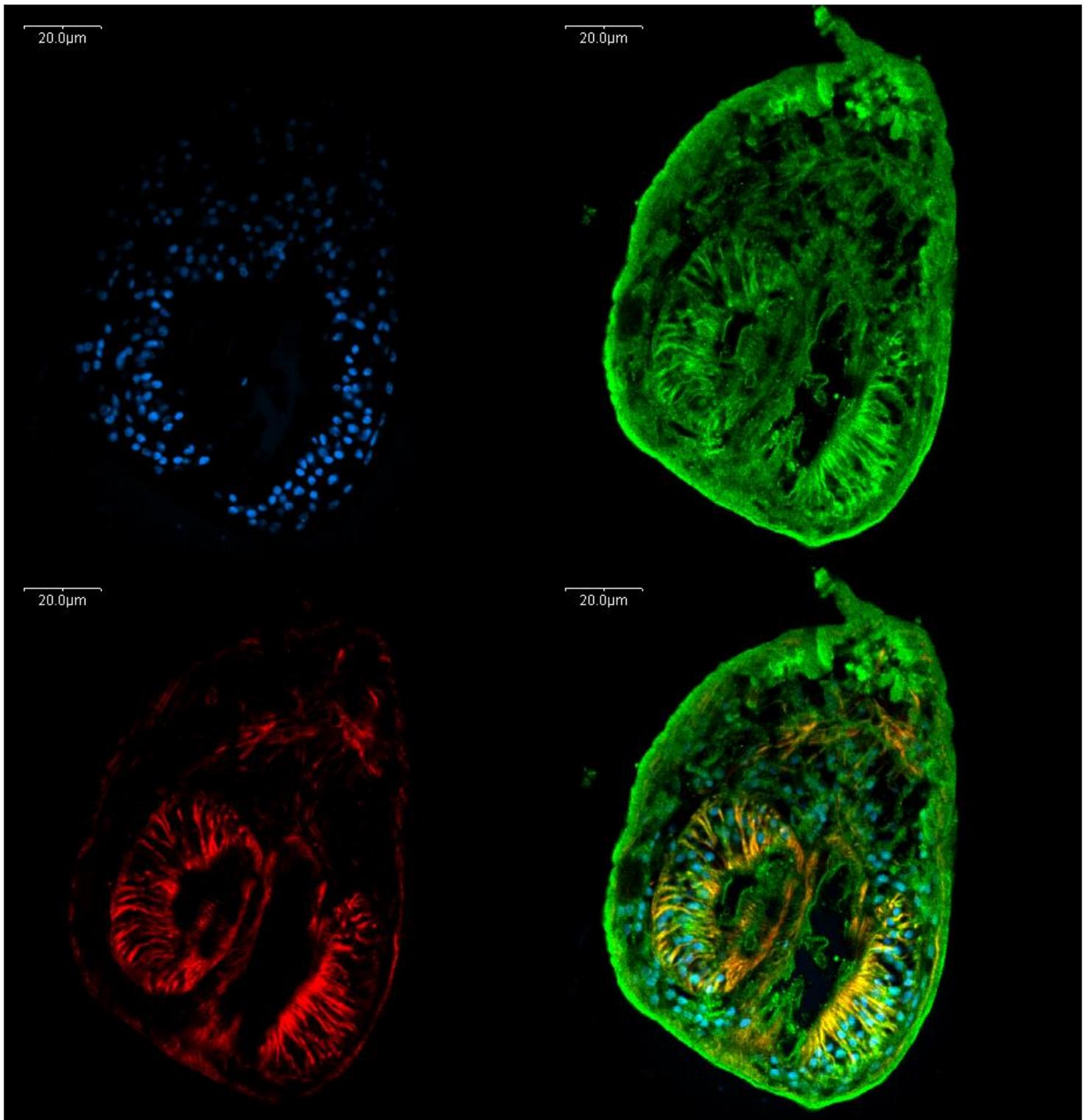


Figura 33. Localización de EgGST3 en PEs invaginados (corte transversal). En azul se visualizan los núcleos celulares, en rojo la actina y en verde la señal específica para EgGST3. Se observa también la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST3 en una dilución de 1/500 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

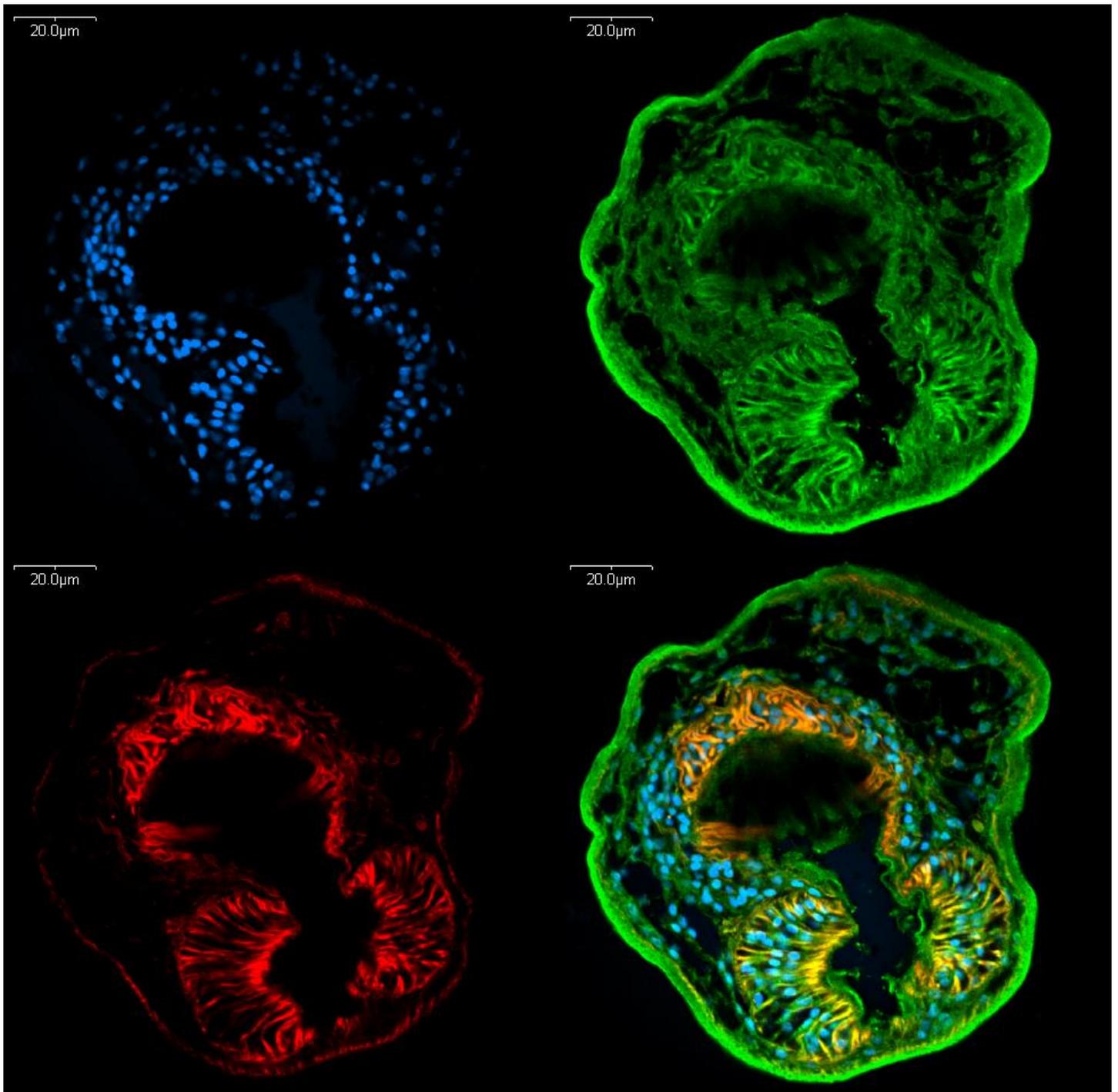


Figura 34. Localización de EgGST3 en PEs invaginados. En azul se visualizan los núcleos celulares, en rojo la actina y en verde la señal específica para EgGST3. Se observa también la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST3 en una dilución de 1/500 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

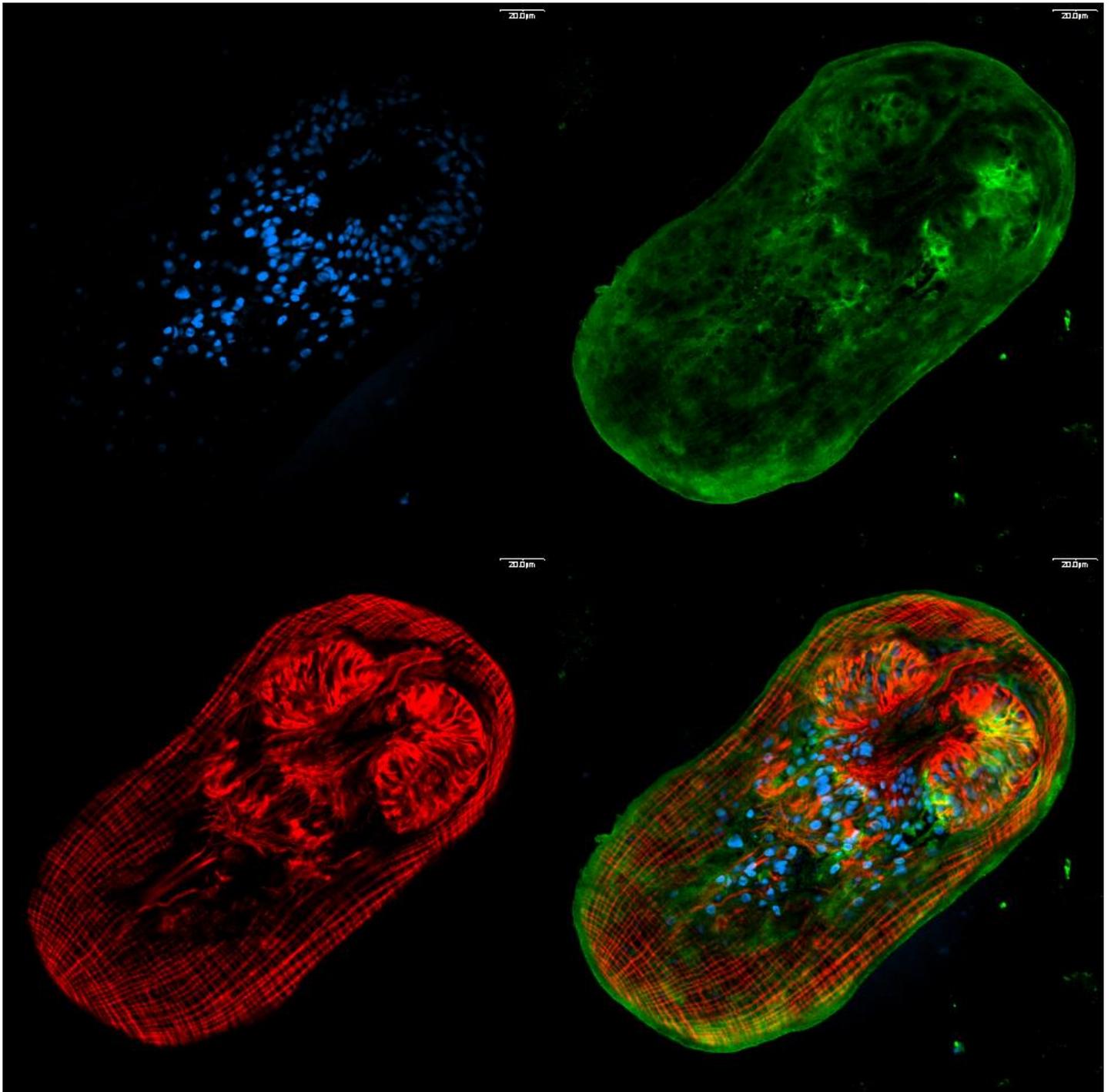


Figura 35. Localización de EgGST3 en PEs invaginados. En azul se visualizan los núcleos celulares, en rojo la actina y en verde la señal específica para EgGST3. Se observa también la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST3 en una dilución de 1/500 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

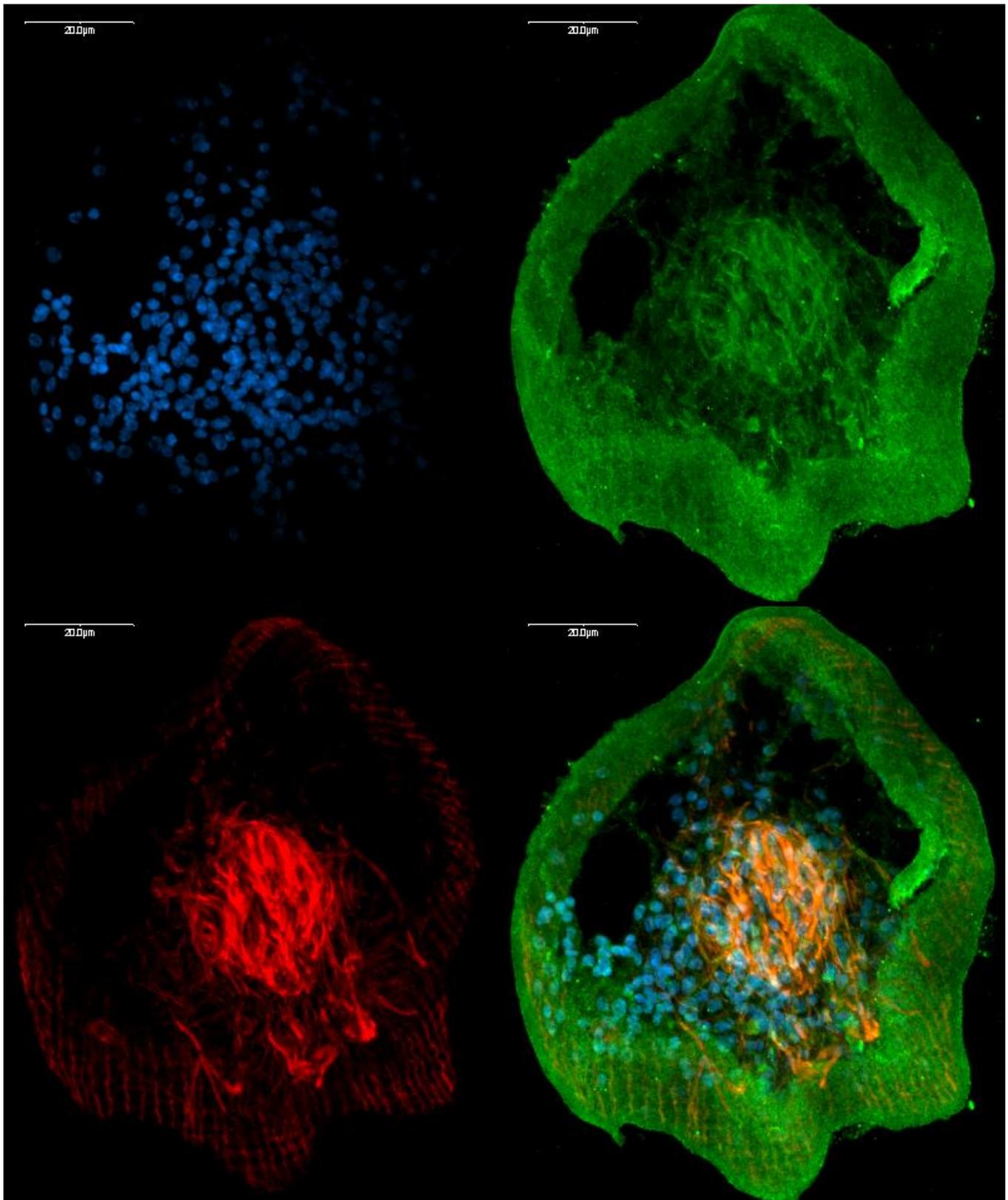


Figura 36. Localización de EgGST3 en el tegumento de PEs invaginados. En azul se visualizan los núcleos celulares (DAPI), en rojo la actina (faloidina marcada) y en verde la señal específica para EgGST. Se observa también la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST3 en una dilución de 1/500 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

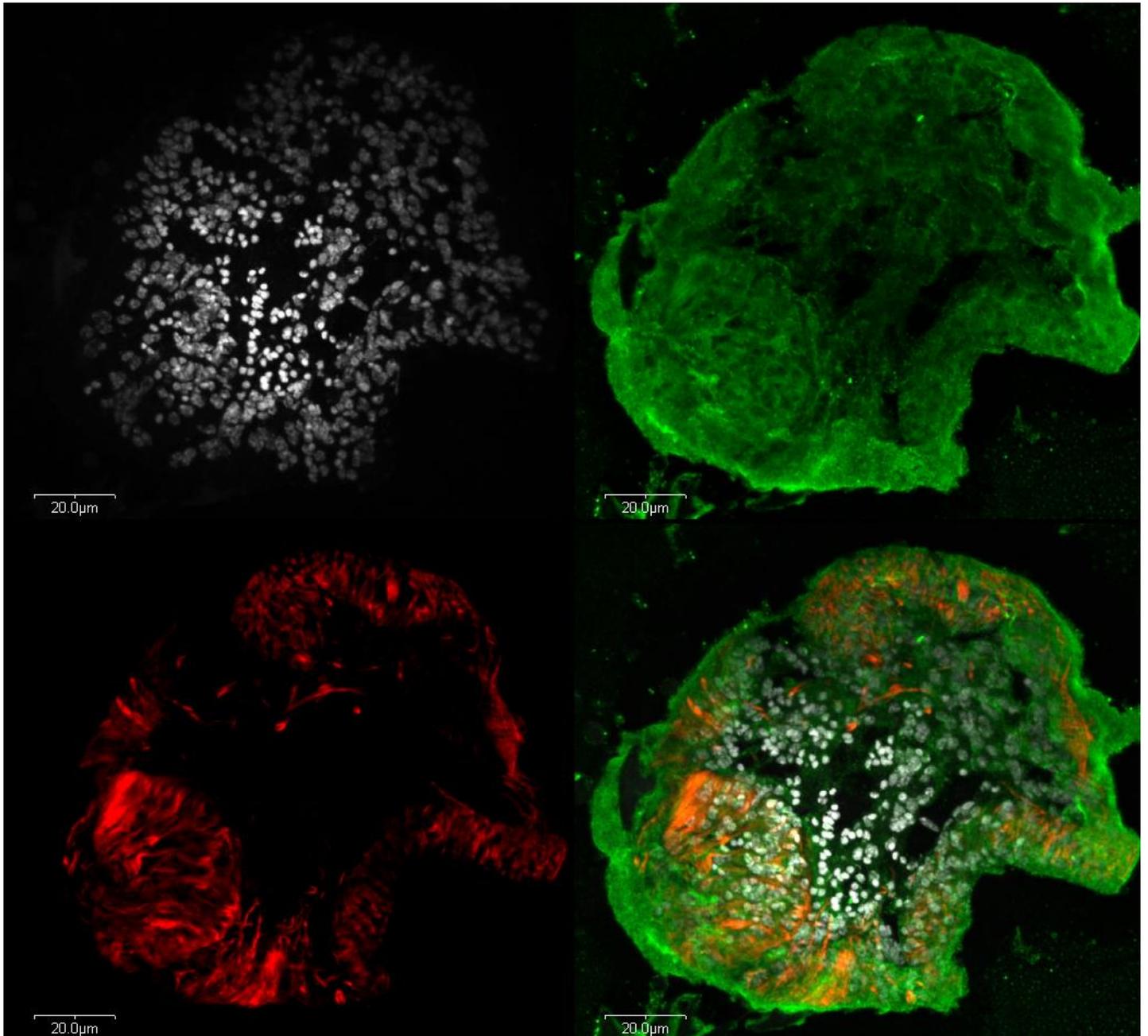


Figura 37. Localización de EgGST3 en el escólex de un parásito evaginado. En blanco se encuentran los núcleos celulares (DAPI) y en rojo la actina (faloidina marcada). En verde observamos la señal específica para EgGST3. Se presenta además la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST3 en una dilución de 1/500 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

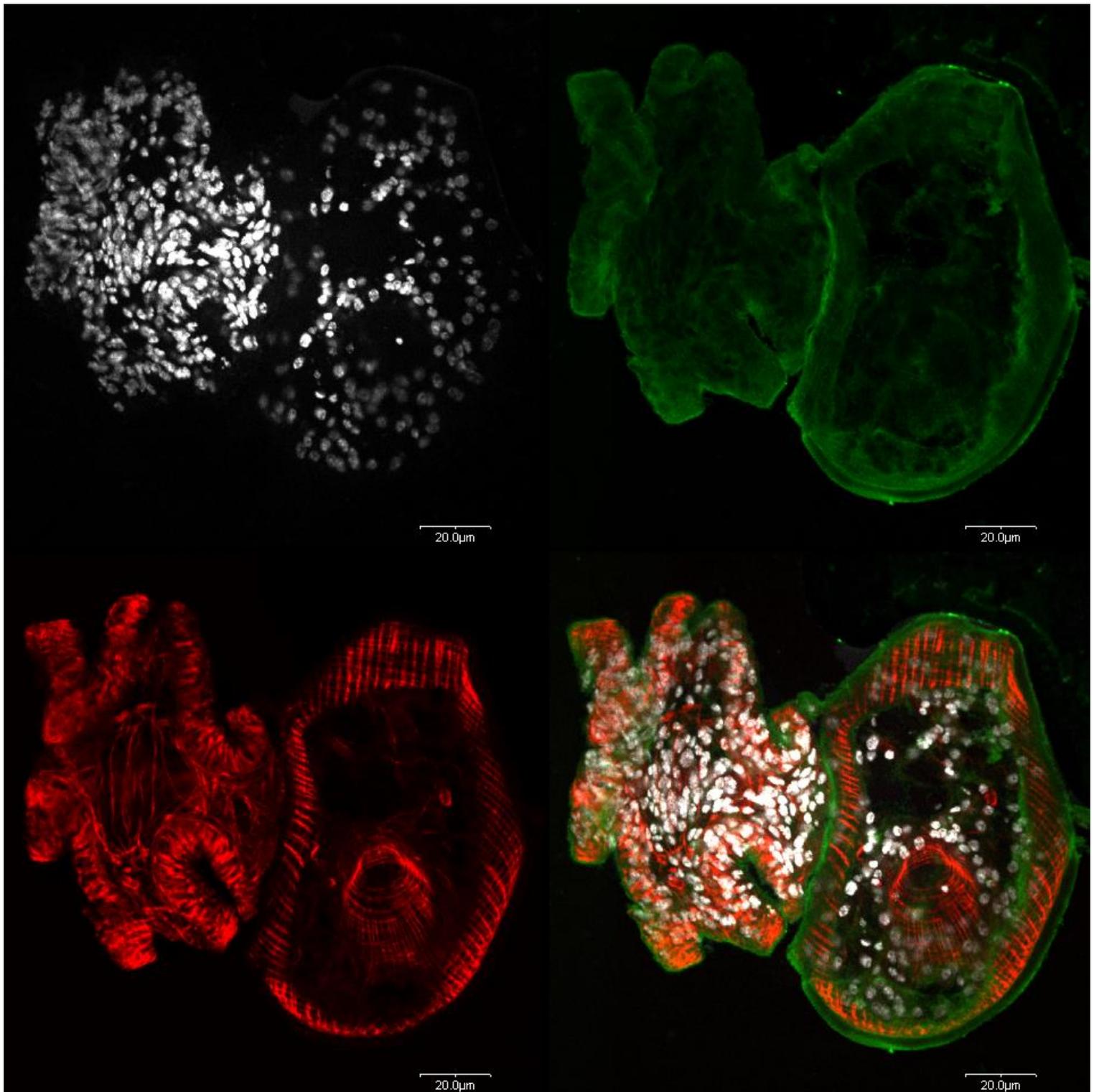


Figura 38. Localización de EgGST3 en un PE invaginado y uno evaginado. En blanco se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI y en rojo la actina con faloidina marcada. En verde se encuentra la señal específica para EgGST3. Se muestra además la superposición de las tres señales. Se utilizó el suero de conejo específico para EgGST3 en una dilución de 1/500 y el anticuerpo secundario en dilución 1/1000. Aumento 60X.

6.1.3.4. Localización de EgGST3

La subunidad EgGST3 se distribuye en todo el organismo del PE invaginado, tanto en el parénquima como en las ventosas y en el tegumento, aunque en algunas regiones este último es el que presenta una señal más intensa (Figura 33, 34, 35 y 36). Si bien no hemos logrado obtener un plano longitudinal del parásito evaginado, obtuvimos un plano transversal a nivel del escólex, en el que se observa una distribución uniforme de esta subunidad en las ventosas, el parénquima que queda entre ellas y el tegumento que las rodea (Figura 37 y 38). Un aspecto que vale la pena mencionar, es que, a diferencia de lo observado con las otras dos EgGSTs, la señal específica para EgGST3 se superpone con la correspondiente para la actina (Figura 39), tanto en los parásitos invaginados como evaginados, y podría indicar que ambas proteínas co-localizan.

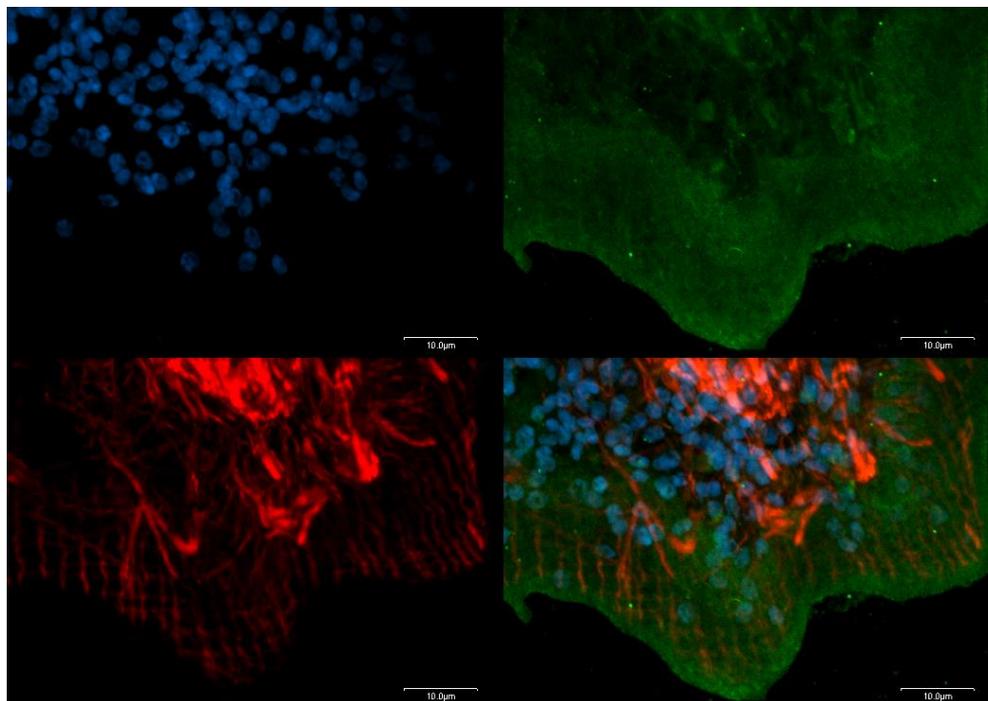


Figura 39. Localización de EgGST3. Vista ampliada (aumento 120X) de una región de un PE invaginado donde se observa la superposición de la señal específica de EgGST3 con la correspondiente a la actina y en algunos puntos a los núcleos.

El análisis de la secuencia de EgGST3 predice un 85,6% de probabilidades de que dicha proteína sea citosólica. De todas formas, EgGST3 podría localizarse en otros compartimientos celulares, aunque las probabilidades de que esto ocurra son mucho menores: 8,4% de probabilidad de estar en el núcleo, 3,3% de estar en la mitocondria, 2,1% en los peroxisomas, 0,3% en la membrana y 0,1% en los lisosomas. Igualmente, en la figura 39 se puede observar

que la señal específica de EgGST3 se superpone en algunas zonas con la señal correspondiente a los núcleos celulares, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que EgGST3 se encuentre en dicho compartimiento.

6.3. Discusión

Los cestodos parásitos, y en particular *E. granulosus*, han perfeccionado diferentes mecanismos a lo largo de la evolución, que les permiten ingresar, establecerse y sobrevivir en sus hospederos, protegiéndose al mismo tiempo de la respuesta generada por el sistema inmune de estos. Es así que los helmintos parásitos presentan diversas características morfológicas desarrolladas y optimizadas para poder cumplir con dichos objetivos. La estructura de los diferentes estadios de *E. granulosus* ha sido estudiada desde hace ya varias décadas (Morseth D. J., 1967). Las metodologías utilizadas se centraron en la observación del parásito por microscopía óptica u electrónica, tanto de transmisión como de barrido. Esto ha permitido identificar en el parásito diferentes regiones y las estructuras que las componen, analizando las posibles funciones que cumplirían a lo largo del ciclo de vida de *E. granulosus*. Este trabajo se centró particularmente en la estructura de los PEs y su relación con los componentes del quiste hidático en el que se originan. Se estudiaron entonces algunos aspectos de la morfología de los PEs, necesarios para posteriormente analizar la distribución de las EgGSTs y la relación de ésta con las posibles funciones de estas enzimas parasitarias.

Nuestro laboratorio dispone de un suministro regular de quistes hidáticos, principalmente de origen bovino y ovino, de los cuales podemos obtener PEs. Sin embargo, no tenemos acceso a la forma adulta del parásito. De todas formas, hemos trabajado con PEs recién extraídos del quiste, los cuales presentan el escólex invaginado, así como con parásitos evaginados, obtenidos al mantener a los PEs en cultivo como se describe en Materiales y Métodos. En dichas condiciones, se observó que en cuestión de minutos u horas, los parásitos comenzaban a moverse activamente, y ya a las 24 horas había un número importante de parásitos evaginados. Si bien estos parásitos no son adultos, el proceso de evaginación del escólex es uno de los requerimientos para la maduración de los mismos y su pasaje al estadio adulto en el intestino del hospedero definitivo (Smyth J. D. y col., 1967). Probablemente, las condiciones en las que trabajamos con este parásito distan mucho de las que existen *in vivo* en el interior del hospedero. Es decir, el desarrollo del parásito, incluyendo la evaginación del escólex, podría estar influenciado por una gran diversidad de factores, que son en parte desconocidos, y que por lo tanto, no pueden ser reproducidos *in vitro*. En particular, no se conocen con exactitud los factores que estimulan *in vivo* la evaginación del escólex. Se ha

propuesto que uno de estos estímulos lo constituirían la bilis y las enzimas digestivas liberadas en el duodeno del hospedero (Smyth J. D. y col., 1967). *In vitro*, se han obtenido PEs evaginados tratando a los parásitos extraídos de quistes hidáticos con tripsina, pancreatina y bilis obtenida de perros, luego de una incubación con pepsina (Smyth J. D. y col., 1967). Se ha reportado además que las hormonas sexuales producidas por el hospedero pueden afectar el desarrollo de los helmintos parásitos. En este sentido, se ha descrito que la progesterona estimula la evaginación del escólex de *T. solium in vitro* (Escobedo G. y col., 2010).

Se procedió entonces a analizar la distribución de las EgGSTs. Los parásitos fueron observados primeramente por microscopía óptica y luego se utilizaron maracadores fluorescentes para los filamentos de actina y los núcleos celulares que fueron visualizados por microscopía confocal. Ambas estrategias permitieron observar a grandes rasgos las características morfológicas detalladas previamente para *E. granulosus* (Galindo M. y col., 2008). El marcado de la actina permitió observar un citoesqueleto sumamente organizado, cuyos filamentos se distribuyen y ordenan en forma desigual entre las diferentes regiones del parásito. No hay disponible información previa sobre este aspecto de la estructura de *E. granulosus* en la literatura. De todas formas, este alto grado de organización de los filamentos de actina se ha descrito también en otros helmintos parásitos (Mair G. R. y col., 1998; Ambrosio J. R. y col., 2003; Tansatit T. y col., 2006). Por ejemplo, en *T. solium*, cestodo cercanamente relacionado a *E. granulosus*, se han realizado estudios de la distribución de la actina en el parásito, observándose una prevalencia de la misma en las regiones de las ventosas, la base del rostelo, la pared de la vesícula del cisticerco y el canal espiral por donde se producirá la evaginación del escólex (Ambrosio J. R. y col., 2003). Se identificaron fibras radiales formando parte de las ventosas y otras más desorganizadas en la región que rodea los ganchos, encontrándose en el tejido circundante fibras tanto longitudinales como transversales (Ambrosio J. R. y col., 2003). Dicho patrón de distribución de las fibras musculares en *T. solium* coincide a grandes rasgos con los resultados obtenidos en este trabajo para *E. granulosus*. A su vez, y dado que el proceso de evaginación del escólex no está sincronizado para todos los parásitos, se lograron visualizar PEs en diferentes etapas de dicho proceso (

Figura 40 40), las cuales coinciden con lo descrito previamente para *E. multilocularis*.

Este altamente organizado citoesqueleto, podría haber sido adquirido por los helmintos parásitos en el transcurso de la evolución como una estrategia para optimizar los mecanismos que les permiten ingresar en su hospedero, establecerse en el mismo y desarrollarse, completando así su ciclo de vida. En este sentido, las diferencias encontradas en la organización de los filamentos de actina en cada región del parásito podrían corresponderse

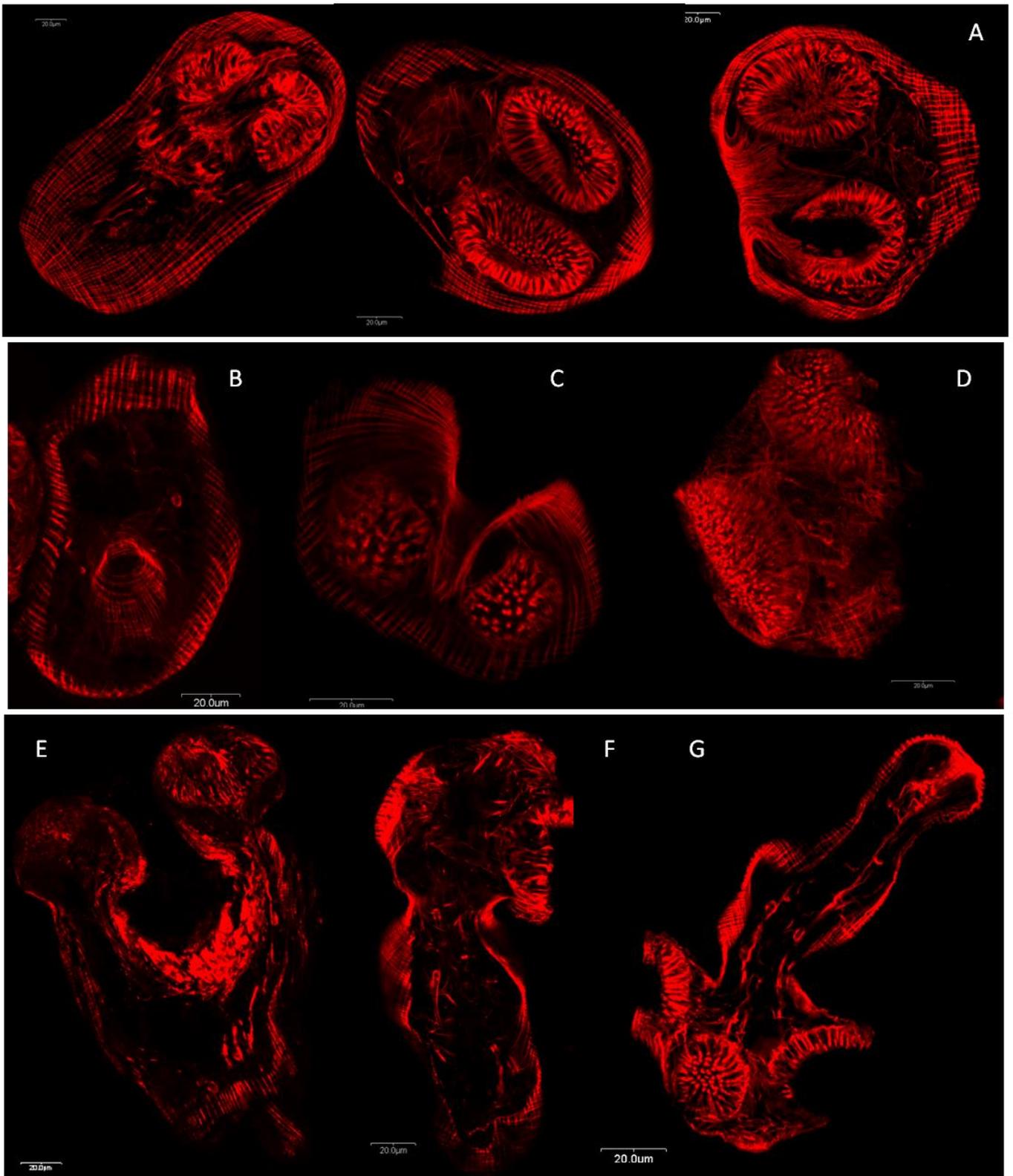


Figura 40. Distribución de la actina en diferentes etapas del proceso de evaginación del escólex de *E. granulosus*. La actina fue detectada por incubación de los cortes de PEs con faloidina marcada y microscopía confocal. A: PEs con el escólex invaginado. B: canal por el que el escólex saldrá al exterior del parásito. C: posición de las ventosas, primeras estructuras en salir, respecto al canal. D: ventosas en un PE en proceso de evaginación. E: vista de un PE en el que las ventosas han salido al exterior. F y G: parásitos evaginados. Las imágenes A (derecha), B, E, F y G fueron tomadas a un aumento de 60X, las imágenes A (izquierda y centro) 90X y las C y D 120X.

con los diferentes roles que cumple cada una de ellas en los mecanismos mencionados y con la etapa del desarrollo en la que se encuentra el parásito. A su vez, estas diferencias podrían estar relacionadas con la expresión de diferentes variantes de la actina en cada región. Se ha descrito en varios helmintos la presencia de varias isoformas de esta proteína, como por ejemplo en *T. solium*, en donde se identificaron, hasta el momento, dos genes, y se detectaron por electroforesis bidimensional y *Western-blot*, siete spots correspondientes a la actina (Ambrosio J. R. y col., 2003). En el caso de *E. granulosus*, se ha propuesto la presencia de al menos tres genes de actina. Estos genes presentan porcentajes de identidad entre el 79 y 81% a nivel de secuencia de nucleótidos, y entre 85 y 90% a nivel de aminoácidos (da Silva C. M. y col., 1993). Este nivel de identidad dificulta la discriminación entre las diferentes formas de la actina expresadas en cada región del parásito, cuando se emplean técnicas, por ejemplo, de hibridación *in situ* o de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-actina específicos para cada una de ellas. Más aún, se han descrito en PEs, varias isoformas de cada uno de los dos genes aplicando estrategias proteómicas (Monteiro K. M. y col., 2010).

Por otra parte, teniendo en cuenta la importancia del citoesqueleto para estos parásitos y su estructura sumamente organizada, se podría pensar en sus componentes como blancos para posibles drogas antihelmínticas. De hecho, algunos de los compuestos utilizados en el tratamiento de infecciones por helmintos, actúan afectando, entre otras cosas, la organización del citoesqueleto (Tansatit T. y col., 2006). Por ejemplo, los benzimidazoles, fármacos utilizados a nivel humano y veterinario, y ciertos derivados, afectan la formación de los microtúbulos (Perez-Serrano J. y col., 1995; Cumino A. C. y col., 2009). Entre estos fármacos se encuentran el albendazol y su derivado el albendazol sulfóxido. La exposición de PEs de *E. granulosus* en cultivo a estos dos antihelmínticos, por separado o combinados, induce la muerte de los parásitos. Este efecto se corresponde además con una modificación de la señal específica de la tubulina visualizada por inmunohistoquímica, lo que apoyaría la idea de que la acción de estas drogas se basa en la desorganización del citoesqueleto (Perez-Serrano J. y col., 1995). Se ha propuesto que estos antihelmínticos actuarían uniéndose directamente a los monómeros de tubulina, impidiendo su polimerización. Se observó además una disminución de la cantidad de tubulina en el parásito, y en el caso del flubendazol, un derivado halogenado de los benzimidazoles, también una disminución de la expresión de la β -tubulina a nivel de ARNm en *E. granulosus* luego de una incubación con esta droga (Cumino A. C. y col., 2009). La deficiencia de microtúbulos ha sido asociada con la inhibición de la síntesis de proteínas en las células del tegumento, y la alteración de los sistemas de transporte intra- e intercelular, así como el ingreso de glucosa a las células afectando los depósitos de glucógeno (Ingold K. y col.,

1999; Cumino A. C. y col., 2009). Este último efecto es particularmente relevante ya que el glucógeno es la principal reserva de energía en el parénquima de los helmintos parásitos.

Además, algunos estudios analizan los efectos de ciertas drogas antihelmínticas sobre los filamentos de actina de los parásitos (Markoski M. M. y col., 2006). Por ejemplo, se ha descrito que el tratamiento con praziquantel de *M. corti*, tanto en su estadio larvario (tetratiridio) como en el parásito segmentado, produce la ruptura de los filamentos de actina, principalmente a nivel del tegumento (Markoski M. M. y col., 2006). Esto provoca inicialmente perforaciones y la aparición de vesículas en el tegumento que finalmente culminan con su desprendimiento. Conder y cols. (1981) estudiando los efectos del praziquantel sobre adultos de *E. granulosus*, observaron la pérdida de los ganchos, la alteración de la estructura de las ventosas y la pérdida de integridad del tegumento. De todas formas, no se han estudiado los cambios que sufren los filamentos de actina luego del tratamiento con esta droga. Se ha propuesto que el efecto del praziquantel sobre los filamentos de actina se debería a la activación de la gelsolina, una proteína fragmentadora de los filamentos de actina (Markoski M. M. y col., 2006). Todos estos aspectos le dan gran importancia al estudio de la actina de los parásitos, en particular, su organización y distribución, así como su potencial como blanco de nuevas drogas antihelmínticas.

Por otra parte, la distribución de los núcleos celulares concuerda con lo descrito previamente para este cestodo (Martinez C. y col., 2005). Se ha observado que ya desde el surgimiento de las vesículas que darán lugar a los PEs maduros a partir de la capa germinativa, existe una distribución desigual de los núcleos celulares. Los mismos parecen concentrarse en las regiones que darán lugar a las ventosas y a la zona del rostelo que contiene los ganchos. Así, existirían conjuntos de células determinadas que se diferenciarán para dar origen a las diferentes estructuras del parásito. Se ha propuesto que la identificación de las moléculas involucradas en este proceso de diferenciación celular y, por lo tanto, de desarrollo de los PEs, podría contribuir al diseño racional de drogas que permitan la interrupción del ciclo de vida del parásito (Martinez C. y col., 2005).

De esta forma, las metodologías empleadas nos permitieron visualizar las características morfológicas del parásito, lo que resultó de gran importancia para el estudio posterior de la localización de las EgGSTs. Dicho estudio es de relevancia ya que la distribución de estas proteínas está íntimamente relacionada con las funciones que cada una de ellas podría cumplir en el parásito. Así, conocer la ubicación de las EgGSTs podría contribuir para comprender los posibles roles de estas enzimas en la infección. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran algunas diferencias en los patrones de expresión de cada una de las EgGSTs, lo que nos podría hacer pensar que su contribución al establecimiento y mantenimiento de la

infección sería al menos ligeramente diferente. Como se mencionó en capítulos anteriores, las tres EgGSTs fueron detectadas en PEs, hecho que concuerda además con resultados obtenidos previamente por nuestro grupo. En este sentido, se había detectado en PEs, tanto a nivel de mRNA como de la proteína, a EgGST1 (Fernandez C. y Hormaeche C. E., 1994; Fernandez V. y col., 2000) y EgGST2 (Arbildi P., 2013). Además, se había aislado de PEs el mRNA de EgGST3.

Por otro lado, sólo EgGST1 se localizó en la capa germinativa de la pared del quiste y en líquido hidático. Vale la pena mencionar que en estudios previos realizados por Monteiro y cols. (2010), en los que se utilizaron herramientas proteómicas para la identificación de proteínas parasitarias, tampoco se detectaron EgGST2 y EgGST3 en capa germinativa ni en líquido hidático. Mientras que, en dicho estudio así como en otros similares (Aziz A. y col., 2011), sí se describió la presencia de EgGST1 en líquido hidático proveniente de quistes desarrollados tanto en bovinos, como en ovinos y humanos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. De todas formas, se debe tener en cuenta que la ausencia de EgGST2 y EgGST3 tanto en la capa germinativa como en el líquido puede deberse a que la sensibilidad de las metodologías utilizadas no sea suficiente para detectarlas. De hecho, EgGST3 fue identificada en el transcriptoma de la capa germinativa (Parkinson J. y col., 2012), por lo que no podemos descartar que la proteína sea expresada allí. Además, el líquido hidático presenta altas concentraciones de proteínas del hospedero, lo que suma una dificultad para la detección de proteínas parasitarias poco representadas (Monteiro K. M. y col., 2010). Es por esto que se decidió estudiar la presencia de las EgGSTs en productos de excreción-secreción de PEs *in vitro*. Esta estrategia ya había sido previamente utilizada por otros grupos (Carmena D. y col., 2004) y recientemente fue retomada por Virginio y cols. (2012), logrando identificar proteínas posiblemente liberadas por el parásito que hasta el momento no se habían podido detectar en líquido hidático. A diferencia del estudio realizado por Virginio y cols., en este trabajo hemos detectado a las tres EgGSTs en los productos de excreción-secreción de PEs. Estas discrepancias podrían deberse a las condiciones de cultivo utilizadas en cada caso, que podrían afectar cualitativa y cuantitativamente las proteínas secretadas, así como a los distintos métodos utilizados para la detección de las proteínas, que en nuestro caso implicó el reconocimiento de las EgGSTs por anticuerpos específicos para cada una de ellas. De todas formas, este resultado debe ser analizado con precaución, ya que no implica que las EgGSTs sean efectivamente secretadas. Es decir, las condiciones en las que se mantuvieron los PEs en cultivo distan mucho de ser las que estos parásitos encontrarán al ingresar y establecerse en el cuerpo de su hospedero, por lo que, que en dichas condiciones hayan sido secretadas no implica que lo deban ser *in vivo*. Lo que este resultado nos permite decir es que, los PEs podrían ser capaces de liberar estas proteínas al exterior, si se dieran las

condiciones adecuadas para que ello suceda. En este sentido, ciertas proteínas intracelulares podrían ser liberadas al exterior por la descamación del tegumento parasitario (Virginio V. G. y col., 2012). Igualmente, se debe tener en cuenta que con el correr de las horas la viabilidad de los parásitos en cultivo disminuye, y si bien los cultivos fueron controlados periódicamente para evitar este hecho, no podemos descartar que la presencia de las EgGSTs en los sobrenadantes se deba a la liberación del contenido celular de parásitos muertos. Todos estos aspectos nos generaron además una dificultad para seleccionar controles adecuados para el experimento. En este sentido, se ha descrito la presencia tanto del AgB como del Ag5 en líquido hidático y se ha calificado a ambas proteínas como secretadas. Sin embargo, esto no necesariamente implica que sean secretadas por PEs en cultivo. De hecho, Virginio y cols. (2012) no detectaron al Ag5 en productos de ES, y sólo encontraron el AgB en una de las muestras analizadas con la estrategia de trabajo empleada. Así, podríamos pensar en utilizar estas proteínas como un control positivo pero si en el experimento no se detectan, no implica que no sean secretadas. Esto dificulta la elección de un control positivo. Por otro lado, proteínas que generalmente son asociadas con localizaciones intracelulares, como la actina, han sido detectadas en ES (Virginio V. G. y col., 2012), por lo que tampoco es sencillo seleccionar un control negativo.

Asimismo, se han descrito ciertas diferencias en la composición de los productos de excreción-secreción de PEs provenientes de quistes alojados en el hígado o en los pulmones del hospedero (Carmena D. y col., 2004). Se ha propuesto que estas diferencias podrían deberse a las presiones que cada uno de estos entornos ejerce sobre el parásito, que lo estimulan a producir y secretar diferentes tipos de proteínas. Si bien en este trabajo no se realizó una comparación de la presencia de las EgGSTs en los productos de excreción-secreción de PEs de quistes hepáticos o pulmonares, podría ser un punto a estudiar en un futuro. Esto podría contribuir al estudio de posibles estímulos que el parásito recibiría en el interior de su hospedero que pudieran afectar la expresión y secreción de las EgGSTs y de los roles que estas enzimas cumplirían en el parásito.

Como se mencionó anteriormente, las tres EgGSTs son expresadas en PEs, por lo que se decidió estudiar la distribución de cada subunidad en el parásito por inmunofluorescencia. Un primer aspecto a destacar está relacionado con los controles incluidos en los experimentos. El control negativo consistió en la incubación de los cortes con buffer de incubación en lugar de un anticuerpo primario, y luego con el anticuerpo secundario utilizado con todas las muestras del experimento. De esta forma, lo que estaremos observando con este control es la contribución de las interacciones inespecíficas del anticuerpo secundario con los tejidos del parásito y la autofluorescencia del mismo. En dicho control se observó una señal distribuida a

lo largo de todo el parásito pero muy tenue en comparación con el suero pre-inmune. De esta forma, decidimos utilizar este control como referencia para la localización de las señales específicas de las EgGSTs. Con respecto a la localización de las tres subunidades, se observaron diferencias en los patrones de distribución de cada una de ellas. Por un lado, EgGST1 fue detectada en el parénquima de los PEs invaginados. Previamente, se ha reportado la caracterización de EgGST1, analizando, entre otros aspectos, los posibles sustratos utilizados por la enzima (Harispe L. y col., 2010). Dicho estudio permitió detectar actividad glutatión transferasa frente a *trans*-non-2-enal y *trans, trans*-deca-2,4-dienal, compuestos con grupos carbonilo reactivos que podrían generarse como productos secundarios de la peroxidación lipídica, así como actividad glutatión peroxidasa frente al peróxido orgánico hidroperóxido de cumeno. De esta forma, EgGST1 podría estar involucrada en defender al parásito de los posibles daños causados por las especies reactivas producidas por su propio metabolismo. Esta posibilidad se ve apoyada por la ubicación de EgGST1, que al distribuirse en gran parte del parásito, podría proteger a una parte importante de sus células de los efectos nocivos de los compuestos oxidantes y sus derivados. Asimismo, dichos compuestos también pueden ser generados como consecuencia de la respuesta inmune del hospedero. De esta forma, EgGST1 podría cumplir un importante rol en la defensa del parásito, evitando que los compuestos nocivos generados por el hospedero alcancen a las células del mismo. Además, la presencia de EgGST1 también en la capa germinativa de la pared del quiste y en líquido hidático podría estar relacionada con esa función protectora cuando el parásito se encuentra en el interior de su hospedero intermediario.

Por otra parte, en el hospedero definitivo, EgGST1 se encuentra en una región más externa, contigua al tegumento del parásito evaginado. Los ambientes a los que se enfrenta el parásito en su hospedero intermediario y en el definitivo son diferentes, lo que puede a su vez generar diferentes mecanismos de protección por parte del parásito. Esto podría repercutir en el patrón de expresión de EgGST1 en ambas condiciones, ya que el parásito va a responder de manera diferente en función de los estímulos que reciba de su hospedero.

Se ha descrito la presencia de otras GSTs de clase Mu en el parénquima de los parásitos, principalmente adultos. Este es el caso de una enzima de 26kDa de *S. japonicum*, que fue localizada en las células entre las glándulas vitelinas en las hembras y en la región por debajo de la capa de fibras musculares de los machos (Gobert G. N. y col., 1998). Esta GST, al igual que EgGST1, es capaz de conjugar glutatión a productos de la peroxidación de lípidos, y presenta actividad peroxidasa frente a peróxidos lipídicos. De todas formas, también se ha descrito la presencia de GSTs de clase Mu en el tegumento, y que incluso podrían ser secretadas, como por ejemplo, una GST de 26kDa de *S. mansoni* (Walker J. y col., 1993).

Mientras tanto, EgGST2 se localiza principalmente en el tegumento, tanto en los parásitos invaginados como evaginados. Hasta el momento no hemos logrado expresar EgGST2 en forma recombinante, y por lo tanto, no conocemos los sustratos sobre los que puede actuar y las actividades enzimáticas que puede presentar. De todas formas, la localización de EgGST2 en la región más externa del organismo, en la interface hospedero-parásito, podría ser importante teniendo en cuenta las funciones descritas para las GSTs de clase Sigma de parásitos, en particular, la producción de compuestos con efectos inmunomoduladores como las prostaglandinas. Se han reportado estudios donde se sugiere la localización de GSTs parasitarias de clase Sigma en el tegumento, parénquima y órganos reproductores de los parásitos (Taylor J. B. y col., 1988; Hong S. J. y col., 2002). Por ejemplo, una GST de clase Sigma del trematodo *C. sinensis*, ha sido localizada en la región subtegumentaria del parásito adulto, y en menor medida en el sincitio que da lugar al tegumento, así como en los órganos reproductores y en los huevos localizados en el interior del útero (Hong S. J. y col., 2002). Además, una GST de *F. hepatica*, FhGST-S1, fue localizada en el parénquima y tegumento del parásito adulto, así como en parte del aparato reproductor como son las células vitelinas y los huevos (LaCourse E. J. y col., 2012). Por otra parte, una GST de *O. volvoulus*, OvgGST1, se encuentra principalmente en la región más externa del parásito, es decir, en el sincitio que da lugar a la hipodermis (Liebau E. y col., 1994). Se describió la presencia tanto de FhGST-S1 como de OvgGST1 en los sobrenadantes de cultivos de estos parásitos, por lo que estas enzimas podrían ser secretadas. Como ya hemos mencionado, la presencia de esta clase de GSTs en la interface hospedero-parásito estaría relacionada con su capacidad de influir sobre las células del sistema inmune, afectando la respuesta generada. Mientras tanto, su presencia en los órganos reproductores estaría vinculada con un posible rol en la reproducción de los parásitos (LaCourse E. J. y col., 2012). Se ha detectado a FhGST-S1 en los huevos de *F. hepatica*, lo que sugiere que esta enzima podría participar en el desarrollo de los mismos y en la embriogénesis. Dicha acción de FhGST-S1 podría deberse a la producción de PGD2, la cual ha sido relacionada con funciones en el proceso de reproducción de diversos organismos (LaCourse E. J. y col., 2012). En este trabajo no tuvimos a disposición parásitos adultos, por lo que no hubo posibilidad de observar si EgGST2 se encuentra en los órganos reproductores desarrollados, pero no debe ser descartado.

Finalmente, EgGST3 se localiza en todo el organismo del parásito incluyendo ventosas y tegumento. Como se ha discutido en secciones anteriores, si bien el origen de EgGST3 aún debe ser confirmado, esta subunidad presenta, en la región del sitio activo que posee los residuos catalíticos, un mayor porcentaje de identidad con la clase Omega. Dicha clase estaría involucrada en la protección y regulación de la actividad de numerosas proteínas en

condiciones de estrés oxidativo a través de reacciones de glutationilación/deglutinationilación. Así, la presencia de EgGST3 en todo el parásito podría deberse a la necesidad de protección de las proteínas parasitarias de las especies oxidantes producidas tanto en las células del propio parásito como por el sistema inmune del hospedero. Hasta el momento, sólo se dispone de información sobre la localización de OVGST3, la GST de clase Omega de *O. volvulus*, en gusanos adultos. La misma se encuentra distribuida en la envoltura que rodea a los embriones en desarrollo. Se ha planteado que las proteínas presentes en la cubierta de los huevos, como parece ser OVGST3, actuarían como sensores que indicarían posibles cambios en el estado redox en el embrión a medida que éste se desplaza hacia la región proximal del útero (Liebau E. y col., 2008).

Un elemento que llama la atención en la localización de EgGST3, es que la señal específica para esta proteína parece coincidir con la señal de la actina. Hasta el momento no se ha descrito la interacción de las GSTs parasitarias con la actina. Sin embargo, se ha observado una relación entre esta proteína y los CLIC (Canal intracelular de cloruro). Los CLIC son proteínas citosólicas relacionadas con las GSTs de clase Omega. Sus funciones aún se están estudiando, pero se ha propuesto que estas proteínas podrían integrarse en las membranas y actuar como canales para permitir el flujo de iones cloruro a través de las mismas (Ponsioen B. y col., 2009). Se ha observado que CLIC-4 interacciona en el cerebro con un complejo formado por la dinamina-I, la actina y la tubulina, por lo que se ha propuesto que podría estar implicado en el tráfico de membrana y la organización del citoesqueleto. Se ha descrito además que CLIC-4 es dirigido hacia la membrana plasmática, en un proceso que requiere la polimerización de la actina (Ponsioen B. y col., 2009). Una vez en la membrana, CLIC-4 parecería no afectar directamente el movimiento de cloruro, pero sí podría tener actividades enzimáticas que dependen de la presencia de un residuo de cisteína conservado con las GSTs de clase Omega. Considerando esta información en conjunto con los resultados obtenidos en este trabajo que indican que EgGST3 estaría relacionada con la clase Omega, se podría pensar que esta proteína podría, de forma similar a CLIC-4, asociarse con el citoesqueleto, y en particular con la actina, cumpliendo funciones aún no determinadas.

Por otro lado, los datos obtenidos acerca de la localización de las EgGSTs podrían contribuir con posibles respuestas a preguntas planteadas a lo largo de este trabajo, en particular, aquellas relacionadas con la existencia de los homodímeros EgGST2-2 y EgGST3-3. Como se mencionó previamente, EgGST2 parece localizarse únicamente en el tegumento del parásito, mientras que EgGST3 lo hace en prácticamente todo el organismo, incluyendo el parénquima, las ventosas y el tegumento. La presencia de EgGST3 en regiones donde EgGST2 parece no expresarse estaría indicando que allí se produciría el homodímero EgGST3-3. Otro

aspecto a resaltar, es que ambas subunidades parecen coincidir en el tegumento, por lo que la enzima heterodimérica sólo podría expresarse en dicha región. De todas formas, sería interesante analizar con más precisión en qué regiones ambas proteínas co-localizan. Esto se podría llevar a cabo marcando los anticuerpos específicos para cada una de las EgGSTs con un fluoróforo diferente y analizar si las señales de los mismos se superponen en alguna región del parásito.

Vale la pena mencionar que, si bien EgGST2 se localiza en el tegumento, donde podría formar un heterodímero con EgGST3, no podemos descartar que en dicha región también se exprese el homodímero EgGST2-2.

Otro aspecto manejado en este trabajo, es la localización subcelular de las EgGSTs. Si bien los estudios realizados sugieren una localización principalmente citosólica para las tres subunidades, hay algunos indicios que sugerirían su ubicación en otros compartimientos celulares. Se ha observado que en algunas regiones del parásito, la señal específica tanto para EgGST1 como EgGST3 en las inmunofluorescencias coincide con la señal correspondiente al DAPI, marcador de los núcleos celulares. Además, los estudios bioinformáticos realizados sugieren que existen pequeñas probabilidades de que las EgGSTs se encuentren en el núcleo, mitocondrias e incluso en las membranas plasmáticas.

Si bien se habla de la familia de las “GSTs citosólicas”, se ha descrito la presencia de algunas de estas enzimas, principalmente de mamíferos, en otros compartimientos celulares (Stella L. y col., 2007). En este sentido, la información disponible en helmintos es muy escasa. No se ha descrito la localización subcelular de GSTs parasitarias específicas, aunque sí se ha observado actividad glutatión transferasa en diferentes fracciones (Ahmad R. y col., 2008). Con respecto a las GSTs de mamíferos, una enzima de clase Alfa humana, la GSTA4-4, fue detectada tanto en el citosol como en la membrana plasmática y la mitocondria. Su presencia en la membrana y la mitocondria sería importante ya que esta enzima inactiva ciertos productos de la peroxidación lipídica mediante su actividad glutatión transferasa y peroxidasa. Además, se ha observado la presencia de GSTs de clase Mu humana, de rata y de ratón en la mitocondria. Teniendo toda esta información en cuenta, junto con los resultados de este trabajo, no podemos descartar que EgGST1, de clase Mu y con actividad frente a productos de peroxidación lipídica, se encuentre en la membrana o la mitocondria. Por otra parte, se han detectado GSTs de clase Alfa, entre ellas GSTA4-4, Mu, Pi y Omega en el núcleo celular. Si bien no se han establecido los roles que cada una de estas clases de enzimas juega en este compartimiento, se las ha relacionado con la inactivación de hidroperóxidos de ADN generados como consecuencia de la exposición a condiciones de estrés oxidativo (Tan K. H. y col., 1988). De todas formas, la presencia de las EgGSTs en estos organelos debe ser

confirmada. Una primera aproximación para hacerlo es realizar un fraccionamiento subcelular con extractos de PEs seguido de un *Western-blot* utilizando los anticuerpos específicos para cada una de las subunidades. Además, se podría realizar un estudio de la ultraestructura del parásito por microscopía electrónica, lo que permitiría analizar las estructuras con mayor detalle, localizando a cada EgGST utilizando los anticuerpos específicos para cada una de ellas.

En suma, podemos decir que las tres EgGSTs presentan patrones de distribución diferentes, los cuales podrían estar relacionados con diferencias en las posibles funciones de estas enzimas. Además, en el caso de EgGST1 se observó un cambio en su distribución luego de la evaginación del escólex, que podría estar relacionado con la exposición del parásito a las especies oxidantes producidas por el hospedero. Si bien las funciones de las EgGSTs, y en particular de EgGST2 y EgGST3, deben ser estudiadas en mayor profundidad, el análisis de la localización de estas enzimas, en conjunto con los datos acerca de su posible origen y la comparación con proteínas de la misma clase en otros helmintos parásitos, nos ha permitido tener una primera aproximación a los potenciales roles de las EgGSTs. Resta aún determinar las posibles reacciones catalizadas por estas enzimas y los efectos que dichas actividades podrían tener sobre el parásito y también sobre su hospedero durante la infección.

Capítulo 7. Discusión general

El helminto parásito *E. granulosus* es causante de la hidatidosis en animales y en el hombre. Las infecciones por este cestodo están distribuidas en todo el mundo, causando grandes problemas sanitarios así como importantes pérdidas económicas. En este sentido, se vuelve necesario encontrar estrategias que permitan controlar estas infecciones. Estos organismos han desarrollado mecanismos que les permiten adaptarse y sobrevivir en sus diferentes hospederos y así completar su ciclo de vida. Para esto, disponen de un conjunto de moléculas que les dan la posibilidad de obtener los nutrientes y compuestos que requieren para su supervivencia, así como de defenderse de la respuesta inmune del hospedero. Así, la identificación y caracterización de estas moléculas parasitarias, y el estudio de la regulación de su expresión y su actividad, pueden aportar datos significativos sobre la interacción hospedero-parásito, que permitan el desarrollo de posibles estrategias para el control de las infecciones por *E. granulosus*. Entre estas moléculas podrían encontrarse las GSTs. Se han descrito una gran variedad de posibles funciones de las glutatión transferasas, las cuales varían de una clase a otra (Board P. G. y Menon D., 2013). Históricamente, se ha propuesto a las GSTs parasitarias como el principal sistema de detoxificación de los parásitos, debido a la carencia o escasa actividad de otros sistemas detoxificantes (Cvilink V. y col., 2009). En este sentido, se han identificado GSTs de clases Mu y Pi en helmintos, que serían importantes para la inactivación de productos de la peroxidación lipídica generados en presencia de compuestos oxidantes (Liebau E. y col., 1996a; Liebau E. y col., 1996b; Harispe L. y col., 2010). Más recientemente, se han reconocido otras funciones de las GSTs que podrían ser sumamente relevantes para los parásitos. En particular, se han descrito algunas GSTs de clase Sigma de helmintos que presentan actividad prostaglandina sintasa (Angeli V. y col., 2001; Herve M. y col., 2003; Sommer A. y col., 2003). Este hecho sería importante ya que las prostaglandinas producidas por las GSTs parasitarias podrían actuar como moduladores de la respuesta inmune del hospedero, tal como se ha descrito en el caso de *S. mansoni* (Angeli V. y col., 2001). Esta clase de GSTs parasitarias también podrían entrar en contacto directo con las células del sistema inmune del hospedero, afectando su activación y funciones efectoras, como se ha descrito para una enzima de *F. hepatica* (Dowling D. J. y col., 2010). Además, se han identificado enzimas de clase Omega que presentan actividad tioltransferasa, la cual ha sido relacionada con la regulación de la función de ciertas proteínas en condiciones de estrés oxidativo a través de la glutatiónilación-deglutatiónilación de las mismas (Girardini J. y col., 2002; Liebau E. y col., 2008). Estos roles de las GSTs parasitarias serían de gran importancia

para estos organismos, lo que ha llevado a colocar a estas enzimas como candidatas para el desarrollo de vacunas así también como posibles blancos de drogas antihelmínticas (Torres-Rivera A. y Landa A., 2008). Teniendo esto en cuenta nos preguntamos, ¿Cuáles son los roles de las EgGSTs en el parásito? ¿Cuál es la importancia de estas enzimas para *E. granulosus*? ¿La inactivación o neutralización de su actividad podría tener algún efecto sobre el parásito que pudiera ser de utilidad para el control de las infecciones? En busca de respuestas, nuestro grupo previamente caracterizó una GST de clase Mu de este parásito, EgGST1. Esta enzima es capaz de conjugar GSH a compuestos generados como consecuencia de la peroxidación lipídica, y presenta además actividad peroxidasa frente a peróxidos orgánicos (Harispe L. y col., 2010). Además, se identificó una enzima de clase Sigma, EgGST2, la cual no ha sido caracterizada aún (Iriarte A. y col., 2012; Arbildi P., 2013). El presente trabajo tiene como objetivo continuar el estudio de las EgGSTs, centrándose principalmente en una nueva subunidad, EgGST3, y en una enzima heterodimérica formada por ésta y EgGST2.

Primeramente, se realizó un análisis de la secuencia aminoacídica de EgGST3 encontrándose que ésta no puede ser agrupada con ninguna de las clases de GSTs anteriormente descritas. Esta enzima presenta características similares a las GSTs de clase Sigma y de clase Omega, que podrían determinar sus actividades enzimáticas, y por lo tanto los roles que cumpliría en el parásito. Hasta el momento no podemos establecer cuáles son estos roles, ya que no hemos obtenido la proteína recombinante en forma soluble y enzimáticamente activa en cantidades suficientes para realizar su caracterización. Igualmente, en función del análisis de secuencia y los estudios filogenéticos, y teniendo en cuenta que no se han encontrado GSTs de clase Omega en cestodos, podemos pensar que EgGST3 podría cumplir las funciones de esta clase de enzimas en *E. granulosus* (Iriarte A. y col., 2012). Esto implicaría que EgGST3 podría ser importante en la protección celular en condiciones de estrés oxidativo, como las generadas por la respuesta inmune del hospedero. Este hecho podría relacionarse además con la localización de EgGST3 en el parásito, ya que esta subunidad se encuentra distribuida a lo largo de todo el organismo. Esta ubicación le permitiría contrarrestar los potenciales efectos nocivos de las especies oxidantes en todo el parásito.

Por otra parte, EgGST3 fue localizada en la interface hospedero-parásito, ya que está presente en el tegumento de los PEs y además podría, si se dieran las condiciones apropiadas, ser secretada por el parásito. Teniendo en cuenta esta localización y que EgGST3 presenta a nivel de secuencia algunos elementos similares a las enzimas de clase Sigma, no podemos descartar que presente actividad prostaglandina sintasa. De esta forma, podría estar involucrada también en la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Igualmente, todas estas posibles funciones de EgGST3 deben ser confirmadas.

Por otra parte, en este trabajo se describe la producción por parte de *E. granulosus*, de una enzima heterodimérica formada por las subunidades EgGST2 y EgGST3. Dicha enzima fue expresada en *E. coli* y se comenzó con el análisis de su actividad enzimática. Hoy en día, sólo podemos afirmar que rEgGST2-3 podría estar involucrada en la detoxificación de compuestos potencialmente nocivos para el parásito, en particular, productos de la peroxidación lipídica. De igual forma que se propuso para EgGST3, podemos pensar que EgGST2-3 podría presentar actividad tioltransferasa y prostaglandina sintasa, aunque esto también debe ser confirmado.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, nos planteamos algunos objetivos para llevar a cabo a corto plazo. Por un lado, queda pendiente la caracterización de EgGST3 para poder profundizar en sus posibles funciones. Para esto, debemos obtener la proteína recombinante soluble y funcional, para lo cual nos proponemos producir rEgGST3 en un sistema eucariota. Vale la pena mencionar que nuestro grupo (Lic. Verónica López, trabajo de maestría) ya ha comenzado a trabajar para cumplir este objetivo. Una vez obtenida la enzima, sería importante analizar sus actividades enzimáticas, en particular, la capacidad de conjugarse GSH a productos de peroxidación de lípidos así como también realizar ensayos de actividad tioltransferasa. Asimismo, nos planteamos analizar si EgGST3 presenta actividad prostaglandina sintasa y glutatión peroxidasa. También sería importante realizar estos ensayos de actividad con rEgGST2-3.

Por otra parte, además de las actividades descritas anteriormente, las GSTs pueden unir diferentes compuestos, sin utilizarlos como sustratos de sus actividades enzimáticas (Hayes J. D. y col., 2005). Esto le permitiría a las GSTs parasitarias tomar y/o transportar ciertos compuestos provenientes del hospedero, necesarios para el funcionamiento de su organismo, o “secuestrar” otros que puedan ser nocivos para el mismo. De esta forma, otro objetivo, sería el estudio de esta función “ligandina” de las EgGSTs. Para esto, debemos en primera instancia seleccionar un conjunto de compuestos cuya unión por parte de estas proteínas pueda ser relevante para el parásito. Posteriormente, se podría analizar por espectroscopía de fluorescencia si dichos compuestos pueden unirse a cada EgGST, y finalmente realizar ensayos de actividad GST para determinar si la unión tiene algún efecto en ésta. En este sentido, la Lic. López ha iniciado recientemente estos estudios con la enzima heterodimérica rEgGST2-3 utilizando algunos inhibidores de la actividad GST incluyendo antihelmínticos.

Todos estos estudios permitirían acercarnos un poco más a las funciones de las EgGSTs. De todas formas, determinar cuál es la importancia de las mismas para el parásito. Esto implicaría analizar el efecto que tendría sobre el parásito la inhibición de la actividad glutatión transferasa. Así, podríamos establecer si alguna de estas enzimas podría ser candidata para el desarrollo de vacunas o drogas que permitan prevenir o controlar las infecciones por *E.*

granulosus. Por un lado, sabemos que la actividad de rEgGST1 y de rEgGST2-3 se ve inhibida por diferentes compuestos. En el caso de EgGST1, se ha observado una inhibición por parte de cibacron blue y cloruro de trifenilestaño, dos inhibidores modelo de las GSTs, así como por drogas antihelmínticas como el hexaclorofeno y la raxoxamida (Harispe L. y col., 2010). Mientras tanto, rEgGST2-3 es inhibida por los antihelmínticos mebendazol, closantel, bitionol y hexaclorofeno. Si bien la inhibición de la actividad GST podría contribuir al mecanismo de acción de estos fármacos, éstos podrían estar afectando a varias proteínas, por lo que no podemos concluir que el efecto observado sobre los parásitos se deba exclusivamente a la inhibición de las EgGSTs. De hecho, se ha descrito que el principal efecto de varias drogas antihelmínticas es impedir la polimerización del citoesqueleto (Tansatit T. y col., 2006). De esta forma, si bien es probable que cualquier fármaco tenga varios blancos biológicos, se podría pensar en desarrollar nuevos compuestos que puedan, entre otros efectos, inhibir específicamente a las GSTs parasitarias. En este sentido, una posible aproximación implica el estudio bioinformático de la interacción de la proteína con potenciales inhibidores. Estudios de este tipo se han realizado con GSTs de otros helmintos, entre ellos los nematodos *Brugia malayi* y *Wuchereria bancrofti* (Saeed M. y col., 2013). A partir de la estructura tridimensional de la proteína o de un modelo de la misma, se analizó la interacción con diferentes drogas. En particular, se determinaron los residuos involucrados en la unión y la afinidad de la misma. Se ha planteado que la información obtenida a partir de estos estudios, que debe ser validada experimentalmente, podría ser utilizada para el diseño de nuevos fármacos con actividad antihelmíntica (Saeed M. y col., 2013). Por ejemplo, se podrían desarrollar análogos de estos compuestos, estructuralmente similares, y comparar su capacidad de inhibición de las GSTs parasitarias. Teniendo todo esto en cuenta, se podrían plantear estrategias similares para aplicar con las EgGSTs, para lo cual sería importante contar con la estructura tridimensional de cada una de ellas, más allá de contar con algunos modelos moleculares. La cristalización y determinación de la estructura de estas enzimas es otro de nuestros objetivos, y ya se ha puesto en marcha el trabajo con rEgGST2-3.

Por otra parte, obtuvimos evidencia de que pacientes con equinocosis quística producen anticuerpos específicos que reconocen el heterodímero rEgGST2-3. Hasta el momento no hemos determinado si los mismos son específicos para EgGST2 o EgGST3, o para ambas debido al escaso volumen de las muestras de sueros de pacientes disponibles. Sería importante entonces tratar de ampliar el número de muestras analizadas para confirmar nuestros resultados y poder determinar la especificidad de los anticuerpos detectados. Vale la pena mencionar que Monteiro y cols. (2010) detectaron anticuerpos específicos para EgGST1 en sueros de pacientes. La producción de anticuerpos específicos para las tres subunidades es

coherente con los datos obtenidos en este trabajo acerca de la localización de estas proteínas. Los mismos indican que tanto EgGST2 como EgGST3 se encuentran en la interfase hospedero-parásito, en particular, en el tegumento y en productos de excreción-secreción de PEs, y EgGST1 se encuentra además en el líquido hidático y en la capa germinativa de la pared del quiste, por lo que podrían estar expuestas a las células del sistema inmune del hospedero.

Considerando la producción de anticuerpos específicos para las EgGSTs por parte de pacientes con equinocosis quística, podríamos proponer a estas enzimas como candidatas para el desarrollo de vacunas. Esto implicaría analizar si los anticuerpos generados contra estas proteínas podrían inhibir la/las actividades de las EgGSTs, ya que esto podría resultar en un efecto nocivo para el parásito, impidiendo su establecimiento en el hospedero. Primeramente se podría determinar *in vitro* si la interacción de las EgGSTs con sus correspondientes anticuerpos específicos produce una inhibición de la actividad o impide la función “ligandina” de estas proteínas. Luego se podría trabajar *in vivo* con ratones, a los que se les administraría una de las EgGSTs para luego infectarlos con PEs por vía intraperitoneal. De esta forma, se podrían evaluar parámetros relacionados con la infección como el número de quistes desarrollados o su tamaño en el grupo de ratones a los que previamente se les administró la EgGST, en comparación con ratones que no tuvieron contacto con dicha proteína antes de la infección. Esto permitiría determinar si la neutralización de las EgGSTs por anticuerpos específicos podría ser importante para el control de las infecciones por *E. granulosus*. Vale la pena mencionar que, la estudiante Rosina Giorgi realizó este trabajo y no observó una correlación directa entre la inhibición de la actividad GST por los anticuerpos específicos y la protección a la infección.

Finalmente, nos podríamos preguntar si la detección de estos anticuerpos específicos para las EgGSTs producidos por parte de los hospederos, podrían ser utilizados para el diagnóstico de equinocosis quística. Se podría pensar en desarrollar por ejemplo técnicas de ELISA o *Western-blot* que permitieran detectar estos anticuerpos. Nuevamente, esto implicaría analizar un mayor número de muestras de pacientes con una infección confirmada por *E. granulosus* así como de personas no infectadas para poder determinar la especificidad y sensibilidad del método desarrollado.

De esta forma, podemos decir que el presente estudio contribuyó en parte a conocer con un poco más de profundidad a las glutatión transferasas de *E. granulosus*, quedando aún varios aspectos por analizar y mucho trabajo por hacer.

Conclusiones

En este trabajo se abordaron diferentes estrategias con el objetivo de establecer las posibles funciones de las glutatión transferasas de *E. granulosus* así como su relevancia a nivel fisiológico para el parásito. Se presentó una nueva GST parasitaria, EgGST3, que no puede ser incluida en ninguna de las clases de GSTs citosólicas previamente descritas. Su sitio activo presenta similitud al de las GSTs de clase Omega, sugiriendo que EgGST3 podría presentar algunas de las actividades características de esta clase de enzimas. Esto no pudo ser confirmado ya que no se logró expresar la enzima soluble y funcionalmente activa en *E. coli*.

Además, se describió la producción *in vivo* en PEs, de una enzima heterodimérica formada por EgGST2 y EgGST3 (EgGST2-3). La enzima recombinante rEgGST2-3 cataliza la conjugación del GSH con un producto secundario de la peroxidación lipídica. Esto podría ser importante 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. Resta analizar si EgGST2-3 presenta actividad prostaglandina sintasa y/o tioltransferasa, que podrían ser relevantes para *E. granulosus* en el contexto de una infección.

Por otra parte, se estudió la localización de las EgGSTs en PEs, observándose que las tres subunidades se encuentran en la región más externa del organismo, el tegumento, aunque EgGST1 y EgGST3 se distribuyen además en todo el parénquima del parásito. Además, las tres subunidades podrían ser secretadas por los PEs en determinadas condiciones.

Finalmente, se detectaron en los sueros de pacientes infectados por *E. granulosus* anticuerpos específicos para EgGST2 y/o EgGST3. Esto indicaría que estas enzimas se encuentran en la interface hospedero-parásito, apoyando los resultados obtenidos en los estudios de la localización de las EgGSTs. De esta forma, sus actividades podrían afectar directa o indirectamente la respuesta inmune del hospedero y los mecanismos de evasión de la misma por parte del parásito.

En resumen, los resultados obtenidos indicarían que EgGST3 y la enzima heterodimérica EgGST2-3 podrían ser importantes para el parásito en el contexto de una infección a través de diferentes mecanismos, los cuales no hemos establecido totalmente. La importancia asignada a estas enzimas, hace que sean consideradas como posibles blancos de nuevas drogas antihelmínticas o candidatas para el desarrollo de vacunas, como se ha observado con otras GSTs de helmintos parásitos. Igualmente, restan varios aspectos de las EgGSTs por estudiar antes de pensar en la posibilidad de utilizarlas en una posible estrategia para el control o prevención de las infecciones por *E. granulosus*.

Referencias bibliográficas

- Ahmad, R., A. K. Srivastava y R. D. Walter (2008). "Purification and biochemical characterization of cytosolic glutathione-S-transferase from filarial worms *Setaria cervi*." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **151**(3): 237-245.
- Alvarez, F., B. Garat, H. Musto, M. Picon y R. Ehrlich (1993). "Tendencias in *Echinococcus* sp. codon usage." Mem Inst Oswaldo Cruz **88**(2): 345-346.
- Ambrosio, J. R., O. Reynoso-Ducoing, H. Hernandez-Sanchez, D. Correa-Pina, L. Gonzalez-Malerva, M. Cruz-Rivera y A. Flisser (2003). "Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms." Cell Biol Int **27**(9): 727-733.
- Angeli, V., C. Faveeuw, O. Roye, J. Fontaine, E. Teissier, A. Capron, I. Wolowczuk, M. Capron y F. Trottein (2001). "Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection." J Exp Med **193**(10): 1135-1147.
- Angelucci, F., P. Baiocco, M. Brunori, L. Gourlay, V. Morea y A. Bellelli (2005). "Insights into the catalytic mechanism of glutathione S-transferase: the lesson from *Schistosoma haematobium*." Structure **13**(9): 1241-1246.
- Angov, E. (2011). "Codon usage: nature's roadmap to expression and folding of proteins." Biotechnol J **6**(6): 650-659.
- Antoniou, M. y Y. Tselentis (1993). "Studies on *Echinococcus granulosus* using the scanning electron microscope. II. The hooks." Parasitol Res **79**(7): 543-546.
- Arbildi, P. (2013). Tesis de Maestría en Química: Glutación transferasas en *Echinococcus granulosus*: Identificación, estudios cinéticos y de expresión. . Cátedra de Inmunología, Facultad de Química. Montevideo, Universidad de la República.
- Arbildi, P., La Rocca S., Fernández, V. (2011). Glutathione Transferases in helminth parasites. Research in helminths. A. Esteves. Kerala, India, Transworld Research Network: 57 - 72.
- Asojo, O. A., K. Homma, M. Sedlacek, M. Ngamelue, G. N. Goud, B. Zhan, V. Deumic, O. Asojo y P. J. Hotez (2007). "X-ray structures of Na-GST-1 and Na-GST-2 two glutathione S-transferase from the human hookworm *Necator americanus*." BMC Struct Biol **7**: 42.
- Atkinson, H. J. y P. C. Babbitt (2009). "Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold." Biochemistry **48**(46): 11108-11116.
- Awasthi, Y. C., R. Sharma, A. Sharma, S. Yadav, S. S. Singhal, P. Chaudhary y S. Awasthi (2008). "Self-regulatory role of 4-hydroxynonenal in signaling for stress-induced programmed cell death." Free Radic Biol Med **45**(2): 111-118.
- Aziz, A., W. Zhang, J. Li, A. Loukas, D. P. McManus y J. Mulvenna (2011). "Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans." J Proteomics **74**(9): 1560-1572.

- Belley, A. y K. Chadee (1995). "Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation?" Parasitol Today **11**(9): 327-334.
- Bendtsen, J. D., L. J. Jensen, N. Blom, G. Von Heijne y S. Brunak (2004). "Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion." Protein Eng Des Sel **17**(4): 349-356.
- Benedek, G. B. y F. M. H. Villars (2000). Physics With Illustrative Examples From Medicine and Biology: Statistical Physics, Springer New York.
- Berenguer, J. G. (2007). Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario, Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.
- Blom, N., S. Gammeltoft y S. Brunak (1999). "Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites." J Mol Biol **294**(5): 1351-1362.
- Board, P. G., M. Coggan, G. Chelvanayagam, S. Eastal, L. S. Jermin, G. K. Schulte, D. E. Danley, L. R. Hoth, M. C. Griffor, A. V. Kamath, M. H. Rosner, B. A. Chrnyk, D. E. Perregaux, C. A. Gabel, K. F. Geoghegan y J. Pandit (2000). "Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases." J Biol Chem **275**(32): 24798-24806.
- Board, P. G. y D. Menon (2013). "Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology." Biochim Biophys Acta **1830**(5): 3267-3288.
- Bowden, G. A. y G. Georgiou (1990). "Folding and aggregation of beta-lactamase in the periplasmic space of Escherichia coli." J Biol Chem **265**(28): 16760-16766.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Briesemeister, S., J. Rahnenfuhrer y O. Kohlbacher (2010a). "Going from where to why--interpretable prediction of protein subcellular localization." Bioinformatics **26**(9): 1232-1238.
- Briesemeister, S., J. Rahnenfuhrer y O. Kohlbacher (2010b). "YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization." Nucleic Acids Res **38**(Web Server issue): W497-502.
- Brock, J., P. G. Board y A. J. Oakley (2013). "Structural insights into omega-class glutathione transferases: a snapshot of enzyme reduction and identification of a non-catalytic ligand site." PLoS One **8**(4): e60324.
- Brondyk, W. H. (2009). "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein." Methods Enzymol **463**: 131-147.
- Brophy, P. M., C. Southan y J. Barrett (1989). "Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*." Biochem J **262**(3): 939-946.
- Budke, C. M., P. Deplazes y P. R. Torgerson (2006). "Global socioeconomic impact of cystic echinococcosis." Emerg Infect Dis **12**(2): 296-303.
- Burgess, R. R. (2009). "Refolding solubilized inclusion body proteins." Methods Enzymol **463**: 259-282.

Caragea, C., J. Sinapov, A. Silvescu, D. Dobbs y V. Honavar (2007). "Glycosylation site prediction using ensembles of Support Vector Machine classifiers." *BMC Bioinformatics* **8**: 438.

Carmena, D., J. Martinez, A. Benito y J. A. Guisantes (2004). "Characterization of excretory-secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis." *Parasitology* **129**(Pt 3): 371-378.

Cumino, A. C., M. C. Elissondo y G. M. Denegri (2009). "Flubendazole interferes with a wide spectrum of cell homeostatic mechanisms in *Echinococcus granulosus* protoscoleces." *Parasitol Int* **58**(3): 270-277.

Cvilink, V., J. Lamka y L. Skalova (2009). "Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths." *Drug Metab Rev* **41**(1): 8-26.

Chemale, G., R. Morphew, J. V. Moxon, A. L. Morassuti, E. J. Lacourse, J. Barrett, D. A. Johnston y P. M. Brophy (2006). "Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*." *Proteomics* **6**(23): 6263-6273.

da Fonseca, R. R., W. E. Johnson, S. J. O'Brien, V. Vasconcelos y A. Antunes (2010). "Molecular evolution and the role of oxidative stress in the expansion and functional diversification of cytosolic glutathione transferases." *BMC Evol Biol* **10**: 281.

da Silva, C. M., Henrique, B. Ferreira, M. Picon, N. Gorfinkiel, R. Ehrlich y A. Zaha (1993). "Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*." *Mol Biochem Parasitol* **60**(2): 209-219.

Diaz, A., C. Casaravilla, J. E. Allen, R. B. Sim y A. M. Ferreira (2011a). "Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* II: immunology." *Trends Parasitol* **27**(6): 264-273.

Diaz, A., C. Casaravilla, F. Irigoien, G. Lin, J. O. Previato y F. Ferreira (2011b). "Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus* I: structure." *Trends Parasitol* **27**(5): 204-213.

Dill, K. A., S. B. Ozkan, M. S. Shell y T. R. Weikl (2008). "The protein folding problem." *Annu Rev Biophys* **37**: 289-316.

Dixon, D. P., P. G. Steel y R. Edwards (2011). "Roles for glutathione transferases in antioxidant recycling." *Plant Signal Behav* **6**(8): 1223-1227.

Do, C. B., M. S. Mahabhashyam, M. Brudno y S. Batzoglou (2005). "ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment." *Genome Res* **15**(2): 330-340.

Dowling, D. J., C. M. Hamilton, S. Donnelly, J. La Course, P. M. Brophy, J. Dalton y S. M. O'Neill (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." *Infect Immun* **78**(2): 793-801.

Dunker, A. K. y R. R. Rueckert (1969). "Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel." *J Biol Chem* **244**(18): 5074-5080.

Escobedo, G., I. Camacho-Arroyo, O. T. Hernandez-Hernandez, P. Ostoa-Saloma, M. Garcia-Varela y J. Morales-Montor (2010). "Progesterone induces scolex evagination of the human

parasite *Taenia solium*: evolutionary implications to the host-parasite relationship." J Biomed Biotechnol **2010**: 591079.

Fernandez, C., W. F. Gregory, P. Loke y R. M. Maizels (2002). "Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences." Mol Biochem Parasitol **122**(2): 171-180.

Fernandez, C. y C. E. Hormaeche (1994). "Isolation and biochemical characterisation of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protoscoleces." Int J Parasitol **24**(7): 1063-1066.

Fernandez, V., C. Chalar, C. Martinez, H. Musto, A. Zaha y C. Fernandez (2000). "*Echinococcus granulosus*: molecular cloning and phylogenetic analysis of an inducible glutathione S-transferase." Exp Parasitol **96**(3): 190-194.

Fernandez, V., A. Zavala y H. Musto (2001). "Evidence for translational selection in codon usage in *Echinococcus* spp." Parasitology **123**(Pt 2): 203-209.

Ferre, F. y P. Clote (2006). "DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W182-185.

Frova, C. (2006). "Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives." Biomol Eng **23**(4): 149-169.

Galindo, M., M. J. Gonzalez y N. Galanti (2002). "*Echinococcus granulosus* protoscolex formation in natural infections." Biol Res **35**(3-4): 365-371.

Galindo, M., G. Schadebrodt y N. Galanti (2008). "*Echinococcus granulosus*: cellular territories and morphological regions in mature protoscoleces." Exp Parasitol **119**(4): 524-533.

Gause, W. C., J. F. Urban, Jr. y M. J. Stadecker (2003). "The immune response to parasitic helminths: insights from murine models." Trends Immunol **24**(5): 269-277.

Girardini, J., A. Amirante, K. Zemzoumi y E. Serra (2002). "Characterization of an omega-class glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities." Eur J Biochem **269**(22): 5512-5521.

Gobert, G. N., D. J. Stenzel y D. P. McManus (1998). "Immunolocalisation of the glutathione S-transferases, GST-26 and GST-28, within adult *Schistosoma japonicum*." Int J Parasitol **28**(9): 1437-1443.

Graslund, S., P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. dhe-Paganon, H. W. Park, A. Savchenko, A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S. H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C. Y. Kim, L. W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schutz, U.

Heinemann, S. Yokoyama, K. Bussow y K. C. Gunsalus (2008). "Protein production and purification." Nat Methods **5**(2): 135-146.

Gronwald, J. W. y K. L. Plaisance (1998). "Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum." Plant Physiol **117**(3): 877-892.

Hall, T. A. (1999). "BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symp **41**: 95-98.

Harispe, L., G. Garcia, P. Arbildi, L. Pascovich, C. Chalar, A. Zaha, C. Fernandez y V. Fernandez (2010). "Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*." Acta Trop **114**(1): 31-36.

Hayes, J. D., J. U. Flanagan y I. R. Jowsey (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol Toxicol **45**: 51-88.

Hayes, J. D. y D. J. Pulford (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance." Crit Rev Biochem Mol Biol **30**(6): 445-600.

Herve, M., V. Angeli, E. Pinzar, R. Wintjens, C. Faveeuw, S. Narumiya, A. Capron, Y. Urade, M. Capron, G. Riveau y F. Trottein (2003). "Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion." Eur J Immunol **33**(10): 2764-2772.

Hong, S. J., J. R. Yu y S. Y. Kang (2002). "Ultrastructural localization of 28 kDa glutathione S-transferase in adult *Clonorchis sinensis*." Korean J Parasitol **40**(4): 173-176.

Ingold, K., P. Bigler, W. Thormann, T. Cavaliero, B. Gottstein y A. Hemphill (1999). "Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against In vitro-cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes." Antimicrob Agents Chemother **43**(5): 1052-1061.

Iriarte, A., P. Arbildi, S. La-Rocca, H. Musto y V. Fernandez (2012). "Identification of novel glutathione transferases in *Echinococcus granulosus*. An evolutionary perspective." Acta Trop **123**(3): 208-216.

Joachim, A. y B. Ruttkowski (2011). "Prostaglandin D(2) synthesis in *Oesophagostomum dentatum* is mediated by cytosolic glutathione S-transferase." Exp Parasitol **127**(2): 604-606.

Klein, S. L. (2004). "Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection." Parasite Immunol **26**(6-7): 247-264.

Kortemme, T. y T. E. Creighton (1995). "Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family." J Mol Biol **253**(5): 799-812.

Kuzmich, S., L. A. Vanderveer y K. D. Tew (1991). "Evidence for a glycoconjugate form of glutathione S-transferase pl." Int J Pept Protein Res **37**(6): 565-571.

LaCourse, E. J., S. Perally, R. M. Morphew, J. V. Moxon, M. Prescott, D. J. Dowling, S. M. O'Neill, A. Kipar, U. Hetzel, E. Hoey, R. Zafra, L. Buffoni, J. Perez Arevalo y P. M. Brophy (2012). "The

- Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *Fasciola hepatica*." PLoS Negl Trop Dis **6**(5): e1666.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson y D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Liebau, E., V. H. Eckelt, G. Wildenburg, P. Teesdale-Spittle, P. M. Brophy, R. D. Walter y K. Henkle-Duhrsen (1997). "Structural and functional analysis of a glutathione S-transferase from *Ascaris suum*." Biochem J **324** (Pt 2): 659-666.
- Liebau, E., M. L. Eschbach, W. Tawe, A. Sommer, P. Fischer, R. D. Walter y K. Henkle-Duhrsen (2000). "Identification of a stress-responsive *Onchocerca volvulus* glutathione S-transferase (Ov-GST-3) by RT-PCR differential display." Mol Biochem Parasitol **109**(2): 101-110.
- Liebau, E., J. Hoppner, M. Muhlmeister, C. Burmeister, K. Luersen, M. Perbandt, C. Schmetz, D. Buttner y N. Brattig (2008). "The secretory omega-class glutathione transferase OvGST3 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus*." FEBS J **275**(13): 3438-3453.
- Liebau, E., V. Muller, R. Lucius, R. D. Walter y K. Henkle-Duhrsen (1996a). "Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*." Mol Biochem Parasitol **77**(1): 49-56.
- Liebau, E., G. Wildenburg, P. M. Brophy, R. D. Walter y K. Henkle-Duhrsen (1996b). "Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24 kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*." Mol Biochem Parasitol **80**(1): 27-39.
- Liebau, E., G. Wildenburg, R. D. Walter y K. Henkle-Duhrsen (1994). "A novel type of glutathione S-transferase in *Onchocerca volvulus*." Infect Immun **62**(11): 4762-4767.
- Lindblom, T. H. y A. K. Dodd (2006). "Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*." J Exp Zool A Comp Exp Biol **305**(9): 720-730.
- Mair, G. R., A. G. Maule, C. Shaw, C. F. Johnston y D. W. Halton (1998). "Gross anatomy of the muscle systems of *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluorescence and confocal microscopy." Parasitology **117** (Pt 1): 75-82.
- Makino, T., G. Skretas y G. Georgiou (2011). "Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria." Microb Cell Fact **10**: 32.
- Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." Microbiol Rev **60**(3): 512-538.
- Marchiondo, A. A. y F. L. Andersen (1984). "Light microscopy and scanning electron microscopy of the in vitro evagination process of *Echinococcus multilocularis* protoscolices." Int J Parasitol **14**(2): 151-157.

- Markoski, M. M., E. S. Trindade, G. Cabrera, A. Laschuk, N. Galanti, A. Zaha, H. B. Nader y H. B. Ferreira (2006). "Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda)." Parasitol Int **55**(1): 51-61.
- Martinez-Alonso, M., N. Gonzalez-Montalban, E. Garcia-Fruitos y A. Villaverde (2009). "Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies." Microb Cell Fact **8**: 4.
- Martinez, C., R. Paredes, R. P. Stock, A. Saralegui, M. Andreu, C. Cabezon, R. Ehrlich y N. Galanti (2005). "Cellular organization and appearance of differentiated structures in developing stages of the parasitic platyhelminth *Echinococcus granulosus*." J Cell Biochem **94**(2): 327-335.
- McTigue, M. A., D. R. Williams y J. A. Tainer (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." J Mol Biol **246**(1): 21-27.
- Meyer, E. E., K. J. Rosenberg y J. Israelachvili (2006). "Recent progress in understanding hydrophobic interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(43): 15739-15746.
- Monteiro, K. M., M. B. Cardoso, C. Follmer, N. P. da Silveira, D. M. Vargas, E. W. Kitajima, A. Zaha y H. B. Ferreira (2012). "Echinococcus granulosus antigen B structure: subunit composition and oligomeric states." PLoS Negl Trop Dis **6**(3): e1551.
- Monteiro, K. M., M. O. de Carvalho, A. Zaha y H. B. Ferreira (2010). "Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host." Proteomics **10**(10): 1985-1999.
- Morello, A., Y. Repetto y A. Atias (1982). "Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*." Comp Biochem Physiol B **72**(3): 449-452.
- Morseth, D. J. (1967). "Fine structure of the hydatid cyst and protoscolex of *Echinococcus granulosus*." J Parasitol **53**(2): 312-325.
- Nguyen, H. A., Y. A. Bae, E. G. Lee, S. H. Kim, S. P. Diaz-Camacho, Y. Nawa, I. Kang y Y. Kong (2010). "A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode." Int J Parasitol **40**(9): 1097-1106.
- O'Leary, K. A. y J. W. Tracy (1991). "*Schistosoma mansoni*: glutathione S-transferase-catalyzed detoxication of dichlorvos." Exp Parasitol **72**(4): 355-361.
- Parkinson, J., J. D. Wasmuth, G. Salinas, C. V. Bizarro, C. Sanford, M. Berriman, H. B. Ferreira, A. Zaha, M. L. Blaxter, R. M. Maizels y C. Fernandez (2012). "A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: implications for parasite biology and host adaptation." PLoS Negl Trop Dis **6**(11): e1897.
- Perally, S., E. J. Lacourse, A. M. Campbell y P. M. Brophy (2008). "Heme transport and detoxification in nematodes: subproteomics evidence of differential role of glutathione transferases." J Proteome Res **7**(10): 4557-4565.
- Perez-Serrano, J., G. Denegri, N. Casado, G. Bodega y F. Rodriguez-Caabeiro (1995). "Anti-tubulin immunohistochemistry study of *Echinococcus granulosus* protoscolices incubated with albendazole and albendazole sulfoxide in vitro." Parasitol Res **81**(5): 438-440.

- Petersen, T. N., S. Brunak, G. von Heijne y H. Nielsen (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nat Methods **8**(10): 785-786.
- Ponsioen, B., L. van Zeijl, M. Langeslag, M. Berryman, D. Littler, K. Jalink y W. H. Moolenaar (2009). "Spatiotemporal regulation of chloride intracellular channel protein CLIC4 by RhoA." Mol Biol Cell **20**(22): 4664-4672.
- Precious, W. Y. y J. Barrett (1989). "Xenobiotic metabolism in helminths." Parasitol Today **5**(5): 156-160.
- Remoue, F., J. C. Mani, M. Pugniere, A. M. Schacht, A. Capron y G. Riveau (2002). "Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-kilodalton glutathione S-transferase." Infect Immun **70**(2): 601-605.
- Repetto, Y. A., J. Letelier, M.E and Morello A. (1986). "Glutathione S-transferase activity in intact protoscolices of *Echinococcus granulosus*." Biochemical Society Transactions **14**: 132-133.
- Riveau, G., D. Deplanque, F. Remoue, A. M. Schacht, H. Vodougnon, M. Capron, M. Thiry, J. Martial, C. Libersa y A. Capron (2012). "Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis." PLoS Negl Trop Dis **6**(7): e1704.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer y J. J. Clare (1992). "Foreign gene expression in yeast: a review." Yeast **8**(6): 423-488.
- Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck (2003). "MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models." Bioinformatics **19**(12): 1572-1574.
- Saeed, H. M., M. H. Mostafa, P. J. O'Connor, J. A. Rafferty y M. J. Doenhoff (2002). "Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms." FEBS Lett **519**(1-3): 205-209.
- Saeed, M., M. H. Baig, P. Bajpai, A. K. Srivastava, K. Ahmad y H. Mustafa (2013). "Predicted binding of certain antifilarial compounds with glutathione-S-transferase of human Filariids." Bioinformation **9**(5): 233-237.
- Sambrook, J. y D. W. Russel, Eds. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandig, H., J. E. Pease y I. Sabroe (2007). "Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD2 and its metabolites in leukocyte function." J Leukoc Biol **81**(2): 372-382.
- Sharma, R., Y. Yang, A. Sharma, S. Awasthi y Y. C. Awasthi (2004). "Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis." Antioxid Redox Signal **6**(2): 289-300.
- Sharp, P. M., L. R. Emery y K. Zeng (2010). "Forces that influence the evolution of codon bias." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1544): 1203-1212.
- Shuxian, L., H. Yongkang, S. Guangchen, L. Xing-song, X. Yuxin y D. P. McManus (1997). "Anti-fecundity immunity to *Schistosoma japonicum* induced in Chinese water buffaloes (*Bos*

buffelus) after vaccination with recombinant 26 kDa glutathione-S-transferase (reSjc26GST)." Vet Parasitol **69**(1-2): 39-47.

Singh, S. M. y A. K. Panda (2005). "Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins." J Biosci Bioeng **99**(4): 303-310.

Siracusano, A., F. Delunardo, A. Teggi y E. Ortona (2012). "Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story." Clin Dev Immunol **2012**: 639362.

Siracusano, A., R. Rigano, E. Ortona, E. Profumo, P. Margutti, B. Buttari, F. Delunardo y A. Teggi (2008). "Immunomodulatory mechanisms during Echinococcus granulosus infection." Exp Parasitol **119**(4): 483-489.

Smyth, J. D., H. J. Miller y A. B. Howkins (1967). "Further analysis of the factors controlling strobilization, differentiation, and maturation of Echinococcus granulosus in vitro." Exp Parasitol **21**(1): 31-41.

Sommer, A., R. Rickert, P. Fischer, H. Steinhart, R. D. Walter y E. Liebau (2003). "A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from Onchocerca volvulus is the production of prostaglandin D2." Infect Immun **71**(6): 3603-3606.

Sorensen, H. P. (2010). "Towards universal systems for recombinant gene expression." Microb Cell Fact **9**: 27.

Sorensen, H. P. y K. K. Mortensen (2005a). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli." J Biotechnol **115**(2): 113-128.

Sorensen, H. P. y K. K. Mortensen (2005b). "Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli." Microb Cell Fact **4**(1): 1.

Stamatakis, M., C. Sargedi, C. Stefanaki, C. Safioleas, I. Matthaipoulou y M. Safioleas (2009). "Anthelmintic treatment: an adjuvant therapeutic strategy against Echinococcus granulosus." Parasitol Int **58**(2): 115-120.

Stella, L., V. Pallottini, S. Moreno, S. Leoni, F. De Maria, P. Turella, G. Federici, R. Fabrini, K. F. Dawood, M. L. Bello, J. Z. Pedersen y G. Ricci (2007). "Electrostatic association of glutathione transferase to the nuclear membrane. Evidence of an enzyme defense barrier at the nuclear envelope." J Biol Chem **282**(9): 6372-6379.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0." Mol Biol Evol **24**(8): 1596-1599.

Tan, K. H., D. J. Meyer, N. Gillies y B. Ketterer (1988). "Detoxification of DNA hydroperoxide by glutathione transferases and the purification and characterization of glutathione transferases of the rat liver nucleus." Biochem J **254**(3): 841-845.

Tansatit, T., S. Sahaphong, S. Riengrojpitak, V. Viyanant y P. Sobhon (2006). "Immunolocalization of cytoskeletal components in the tegument of the 3-week-old juvenile and adult Fasciola gigantica." Vet Parasitol **135**(3-4): 269-278.

Taylor, J. B., A. Vidal, G. Torpier, D. J. Meyer, C. Roitsch, J. M. Balloul, C. Southan, P. Sondermeyer, S. Pemble, J. P. Lecocq y et al. (1988). "The glutathione transferase activity and

tissue distribution of a cloned Mr28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*." EMBO J **7**(2): 465-472.

Terpe, K. (2006). "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **72**(2): 211-222.

Tew, K. D., Y. Manevich, C. Grek, Y. Xiong, J. Uys y D. M. Townsend (2011). "The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer." Free Radic Biol Med **51**(2): 299-313.

Tew, K. D. y D. M. Townsend (2011). "Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification." Drug Metab Rev **43**(2): 179-193.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Res **25**(24): 4876-4882.

Thompson, R. C. A. (1995). Biology and systematics of *Echinococcus*. The biology of Echinococcus and hydatid disease

R. C. A. Thompson, Lymbery A.J. Wallingford, UK, CAB International: 1-50.

Torres-Rivera, A. y A. Landa (2008). "Glutathione transferases from parasites: a biochemical view." Acta Trop **105**(2): 99-112.

Towbin, H., T. Staehelin y J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Townsend, D. M. (2007). "S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response." Mol Interv **7**(6): 313-324.

Townsend, D. M., Y. Manevich, L. He, S. Hutchens, C. J. Pazoles y K. D. Tew (2009). "Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress." J Biol Chem **284**(1): 436-445.

Tsai, I. J., M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garcarrubio, A. Sanchez-Flores, K. L. Brooks, A. Tracey, R. J. Bobes, G. Fragoso, E. Sciotto, M. Aslett, H. Beasley, H. M. Bennett, J. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T. A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernandez, P. W. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S. S. Hung, L. Kamenetzky, J. A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. Macchiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddiford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J. D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, X. Cai, X. Soberon, P. D. Olson, J. P. Lacleste, K. Brehm y M. Berriman (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism." Nature **496**(7443): 57-63.

van Rossum, A. J., J. R. Jefferies, F. A. Rijsewijk, E. J. LaCourse, P. Teesdale-Spittle, J. Barrett, A. Tait y P. M. Brophy (2004). "Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*." Infect Immun **72**(5): 2780-2790.

Vargas-Parada, L. y J. P. Lacleste (1999). "Role of the calcareous corpuscles in cestode physiology: a review." Rev Latinoam Microbiol **41**(4): 303-307.

- Vibanco-Perez, N., L. Jimenez, G. Mendoza-Hernandez y A. Landa (2002). "Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*." Parasitol Res **88**(5): 398-404.
- Virginio, V. G., K. M. Monteiro, F. Drumond, M. O. de Carvalho, D. M. Vargas, A. Zaha y H. B. Ferreira (2012). "Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces." Mol Biochem Parasitol **183**(1): 15-22.
- Walker, J., P. Crowley, A. D. Moreman y J. Barrett (1993). "Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*." Mol Biochem Parasitol **61**(2): 255-264.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova y G. J. Gatto, Jr. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." Angew Chem Int Ed Engl **44**(45): 7342-7372.
- Whitbread, A. K., A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmuck, M. Coggan y P. G. Board (2005). "Characterization of the omega class of glutathione transferases." Methods Enzymol **401**: 78-99.
- WHO (2001). WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern, World Health Organization, World Organisation for Animal Health.
- WHO (2011). Report of the WHO Informal Working Group on cystic and alveolar echinococcosis surveillance, prevention and control, with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health World Health Organization.
- WHO (2014). "Neglected Tropical Diseases. A statistical update - Latest data available."
- Xue, Y., J. Ren, X. Gao, C. Jin, L. Wen y X. Yao (2008). "GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy." Mol Cell Proteomics **7**(9): 1598-1608.
- Zhan, B., S. Liu, S. Perally, J. Xue, R. Fujiwara, P. Brophy, S. Xiao, Y. Liu, J. Feng, A. Williamson, Y. Wang, L. L. Bueno, S. Mendez, G. Goud, J. M. Bethony, J. M. Hawdon, A. Loukas, K. Jones y P. J. Hotez (2005). "Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*." Infect Immun **73**(10): 6903-6911.
- Zhang, W., H. Wen, J. Li, R. Lin y D. P. McManus (2012). "Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update." Clin Dev Immunol **2012**: 101895.
- Zheng, H., W. Zhang, L. Zhang, Z. Zhang, J. Li, G. Lu, Y. Zhu, Y. Wang, Y. Huang, J. Liu, H. Kang, J. Chen, L. Wang, A. Chen, S. Yu, Z. Gao, L. Jin, W. Gu, Z. Wang, L. Zhao, B. Shi, H. Wen, R. Lin, M. K. Jones, B. Brejova, T. Vinar, G. Zhao, D. P. McManus, Z. Chen, Y. Zhou y S. Wang (2013). "The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*." Nat Genet **45**(10): 1168-1175.

Anexo

Clase	Acceso GeneBank (Proteína)	Organismo
Pi	ACO10825	<i>Caligus rogercresseyi</i>
	NP_571809	<i>Danio rerio</i>
	NP_000843	<i>Homo sapiens</i>
	NP_038569	<i>Mus musculus</i>
	NP_036709	<i>Rattus norvegicus</i>
	CAD33920	<i>Xenopus laevis</i>
	AAX20373	<i>Unio tumidus</i>
	ACM16805	<i>Venerupis philippinarum</i>
	CAA73325	<i>Brugia malayi</i>
	CAA31979	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	AAA53575	<i>Onchocerca volvulus</i>
ABA42914	<i>Trichinella spiralis</i>	
Alfa	AAH60914	<i>Danio rerio</i>
	NP_001103201	<i>Danio rerio</i>
	CAA73482	<i>Homo sapiens</i>
	NP_000838.3	<i>Homo sapiens</i>
	AAA37754	<i>Mus musculus</i>
	NP_001100310	<i>Rattus norvegicus</i>
	NP_001089496	<i>Xenopus laevis</i>
	ADK11695	<i>Strongylocentrotus intermedi</i>
XP_002740017	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	
Mu	ACO15225	<i>Caligus clemensi</i>
	ACF35504	<i>Dermacentor variabilis</i>
	NP_001103586	<i>Danio rerio</i>
	AAA60963	<i>Homo sapiens</i>
	CAD01094	<i>Xenopus laevis</i>
	AAH08790	<i>Homo sapiens</i>
	NP_034490	<i>Mus musculus</i>
	AAD00603	<i>Rattus norvegicus</i>
	ACJ06748	<i>Crassostrea ariakensis</i>
	AAB46369.3	<i>Clonorchis sinensis</i>
	AAB66318	<i>Echinococcus granulosus</i>
	CAA59739	<i>Echinococcus multilocularis</i>
	ACF59730	<i>Fasciola hepatica</i>
	AAD23997	<i>Fasciola gigantica</i>
	AAB59203	<i>Schistosoma japonicum</i>
XP_002582203	<i>Schistosoma mansoni</i>	
AAM64045	<i>Taenia solium</i>	

Sigma	ADG65347	<i>Bombus ignitus</i>
	NP_725653	<i>Drosophila melanogaster</i>
	AAP91748	<i>Ciona intestinalis</i>
	AAH20734	<i>Homo sapiens</i>
	BAA96845	<i>Mus musculus</i>
	BAA22898	<i>Rattus norvegicus</i>
	AAM82563	<i>Xenopus laevis</i>
	XP_785609	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
	CAA53218	<i>Ascaris suum</i>
	AAB65417	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	AAD17488	<i>Clonorchis sinensis</i>
	Deducida de ARNm (contig 3458)	<i>Echinococcus multilocularis</i>
	Deducida de ARNm ADQ89757.1	<i>Echinococcus granulosus</i>
	ABI79450	<i>Fasciola hepatica</i>
	AAL23713	<i>Opisthorchis viverrini</i>
	AAB63382	<i>Paragonimus westermani</i>
	AAC00518	<i>Schistosoma japonicum</i>
	CAA28796	<i>Schistosoma mansoni</i>
	ACN88552	<i>Taenia solium</i>
Omega	NP_648235	<i>Drosophila melanogaster</i>
	XP_967412	<i>Tribolium castaneum</i>
	NP_001007373	<i>Danio rerio</i>
	NP_034492	<i>Mus musculus</i>
	ACI32122	<i>Rattus norvegicus</i>
	NP_004823	<i>Homo sapiens</i>
	NP_001084924	<i>Xenopus laevis</i>
	XP_002738514	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>
	ACJ06747	<i>Crassostrea ariakensis</i>
	ABO26601	<i>Haliotis discus discus</i>
	CAX74405	<i>Schistosoma japonicum</i>
	AAO49385	<i>Schistosoma mansoni</i>
GST3	Deducida de ARNm ADQ89758.1	<i>Echinococcus granulosus</i>
	Deducida de ARNm (contig 1718)	<i>Echinococcus multilocularis</i>

Tabla 10. Secuencias utilizadas en la construcción del árbol filogenético de las GSTs presentado en la Figura 2. Se indica el número de acceso de cada proteína en el GeneBank y el organismo del que proviene la misma. Las secuencias de EmGST2 y EmGST3 fueron deducidas a partir de la secuencia obtenida del genoma de *E. multilocularis* (Sanger Institute).