

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZACION PARCIAL DEL SISTEMA DE
GLUTATION Y DE TIORREDOXINA EN
EL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

ALBERTO GUEVARA FLORES



DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA

MEXICO, D. F.

ABRIL DE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 09 de febrero del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Guevara Flores Alberto**, con número de cuenta 90262920, con la tesis titulada: "Caracterización parcial del sistema de glutatión y de tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*", bajo la dirección del(a) **Dra. Irene Patricia del Arenal Mena**.

Presidente:	Dr. Abraham Landa Piedra
Vocal:	Dr. Juan Luis Rendón Gómez
Secretario:	Dra. Irene Patricia del Arenal Mena
Suplente:	Dr. Wilhem Hansberg Torres
Suplente:	Dr. José Edgardo Escamilla Marván

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 12 de abril de 2004.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Alberto Guevara Flores

FECHA: 21 de Abril del 2004

FIRMA: 

APOYO RECIBIDO:

Beca para la realización de estudios de maestría otorgada por
CONACYT (2001-2003)

Este trabajo fue financiado por la DGAPA/UNAM IN212600 y IN236002

JURADO:

Dr. Abraham Landa Piedra

Dr. Juan Luis Rendón Gómez

Dra. Irene Patricia del Arenal Mena

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Dr. José Edgardo Escamilla Marván

AGRADECIMIENTOS

A mi padre:

Quien ha sido mi guía en muchos sentidos en la vida, por enseñarme con el ejemplo la responsabilidad, por las alegrías, por su apoyo y por su manera particular de mostrar su cariño.

A mis hermanos:

A ustedes gracias, por creer en mí, por brindarme su apoyo, por su cariño y por las alegrías compartidas durante este pequeño espacio de tiempo que es finito, pero imborrable.

A la Dra. I. Patricia del Arenal:

Por ser mi maestra durante todo este proceso de formación académica universitaria, por ser mi amiga al escuchar mis comentarios en los momentos buenos y difíciles, por ser cuasimadre apoyándome en todo.

A el Dr. Juan Luis Rendón:

Por asesorarme de manera importante en la realización de este trabajo, y por sus pláticas en el laboratorio que hacen más ameno el trabajo.

Al comité tutorial:

A mi tutora, la Dra. I. Patricia del Arenal, a los miembros del comité tutorial, la Dr. Juan Luis Rendón y al Dr. Wilhelm Hansberg, a todos ellos gracias por sus valiosos comentarios durante el transcurso de este trabajo y por su ayuda en la revisión del mismo.

A los integrantes del jurado de tesis:

A el Dr. José Edgardo Escamilla y al Dr. Abraham Landa, por sus importantes comentarios y sugerencias.

A la ayuda técnica:

A el Dr. Oscar Flores y al Dr. Guillermo Mendoza, por su colaboración y asesoramiento en algunas técnicas empleadas.

A mis amigos:

Aurelio, Pablo, Claudio, Oscar, Patricia, Enna, Deyanira, Adrian, Giovanni, Rodolfo y Alicia Cea, por creer en mi, por brindarme su apoyo y amistad en las buenas y en las malas, ustedes, que han influido en mi formación académica y que han sido importantes en mi vida.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resúmen	2
Summary	2
CAPITULO I	
1.0.- Generalidades de los céstodos	3
1.1.0.- Ultraestructura	4
1.1.1.- <i>Taenia crassiceps</i> y ciclo de vida	5
1.2.- El oxígeno	7
1.3.- Especies de oxígeno reactivas (EOR) y antioxidantes	8
1.3.1.- Mecanismos antioxidantes no enzimáticos	8
1.3.2.- Mecanismos antioxidantes enzimáticos	9
1.4.- Los sistemas redox de la célula	11
1.4.1.- El glutatión y síntesis	12
1.4.2.- La tiorredoxina	13
1.4.3.- Las peroxidasas de los dos sistemas	13
1.4.3.1.- Peroxidasa del glutatión	13
1.4.3.2.- Peroxidasa de tiorredoxina	13
1.4.4.- Las reductasas de los dos sistemas	14
1.4.4.1.- Reductasa del glutatión	14
1.4.4.2.- Reductasa de tiorredoxina	15
1.5.- Reductasa de glutatión y tiorredoxina (TGR)	16
1.6.- ROS y Enzimas antioxidantes en los helmintos	16
CAPITULO II	
2.0.- Hipótesis	19
2.1.1.- Objetivo general	19
2.1.2.- Objetivos particulares	19
CAPITULO III	
3.0.- Reactivos	20
3.1.- Material biológico	20
3.1.1.- Cultivo y obtención de los cisticercos	20
3.1.2.- Obtención de las fracciones celulares del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	20
3.2.- Ensayos enzimáticos	22
3.2.1.- La actividad de la reductasa del glutatión	22
3.2.2.- La actividad de la peroxidasa del glutatión	22
3.3.- Determinación del glutatión por HPLC	23
3.4.- Obtención de una fracción soluble total del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	24
3.5.- Ensayo enzimático para cuantificar glutatión total	25
3.6.- Determinación de la actividad de la γ - glutamil-cisteína sintetasa	25
3.7.- Ensayo para la inhibición de la "TGR" con auranofin	26
3.8.- Purificación parcial de la tiorredoxina del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	27
3.8.1.- Detección de la tiorredoxina	27
3.8.2.- Determinación de la concentración de proteína	28
3.8.3.- Electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS	28
3.9.- Secuencia del sitio activo de la tiorredoxina	28

CAPITULO IV	
4.0.- El glutatión en el cisticerco	30
4.0.1.- Identificación y cuantificación del glutatión	30
4.1.- Glutatión total por un método enzimático	32
4.2.- La γ -glutamylcisteína sintetasa	34
4.3.- Peroxidasa del glutatión	34
4.4.- Reductasa del glutatión	35
4.5.- Identificación de la TGR	37
4.6.- Purificación de la tiorredoxina	40
CAPITULO V	
5.0.- Conclusiones	49
CAPITULO VI	
6.0.- Referencias	50

ABREVIATURAS

A.M: amortiguador mitocondrial

CAT: catalasa

DTNB: ditionitrobenceno

DTT: ditionitrotol

ϵ : coeficiente de extinción molar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: ácido etilenglicoltetraacético

EOR: especies de oxígeno reactivas

FDNB: fluoro-dinitrobenceno

g : fuerza centrífuga relativa

Gpx: peroxidasa de glutatión

G.R: reductasa de glutatión

Gpx: peroxidasa de glutatión

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂ : peróxido de hidrógeno

Hepes: ácido hidroxietilpiperazina etanosulfónico

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

kDa: kilodalton

MOPS: ácido morfolino propanosulfónico

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NEM: N-etilmaleimida

nm: nanómetro

PBDS: ácido disulfónico batofenantrolina

PBS: amortiguador de fosfato salino

PCA: ácido perclórico

P.M: peso molecular

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoruro

PVDF: polivinilideno fluoruro

pp: precipitado

SDS: duodecil sulfato de sodio

SOD: superóxido dismutasa

Ste: Sobrenadante

Trx: tiorredoxina

TrxR: reductasa de tiorredoxina

TGR: reductasa de tiorredoxina y glutatión

γ -Glu-Glu: gamma glutamil-glutamato

Alberto Guevara Flores. Caracterización parcial del sistema de glutatión y de tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Directora de tesis: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena.

Resumen

Los organismos aeróbicos están expuestos a las especies de oxígeno reactivas. Estos compuestos son eliminados por los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos. En el caso de los helmintos parásitos las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la peroxidasa de glutatión presentan actividades bajas o incluso están ausentes. Recientemente se ha descrito una nueva familia de enzimas antioxidantes, las peroxirredoxinas (peroxidasa de tiorredoxina) que se sabe juegan un papel relevante en la depuración del H_2O_2 .

El cisticerco de *Taenia crassiceps* tiene una actividad baja de catalasa y de peroxidasa del citocromo c. Por lo cual, decidimos estudiar el sistema de glutatión (GSH, GSSG, la peroxidasa y la reductasa del glutatión). Se cuantificó el glutatión en este parásito y se observó que los niveles están en el intervalo micromolar, a diferencia de la concentración milimolar encontrada en los mamíferos. La actividad enzimática de la peroxidasa y de la reductasa del glutatión, medidas en los extractos crudos resultaron tener una actividad específica baja, del orden de 10 nmoles de $NADP^+$ /min/mg de proteína.

Algunos datos del laboratorio revelaron que la actividad de la reductasa del glutatión presenta características cinéticas que la asocian a una reductasa de tiorredoxina-glutatión (TGR), que es dependiente de selenio semejante a la reportada por Alger. H y Williams. D, (2002). La inhibición de la actividad con concentraciones nanomolares de auranofin y su capacidad de utilizar otros sustratos que contienen disulfuros, como lo hacen otras reductasas de tiorredoxinas apoya dicha propuesta.

Lo anterior despertó el interés por purificar la tiorredoxina del cisticerco. Se purificó alrededor de ~180 veces con un rendimiento de ~ 63 %. Además se logró identificar el sitio activo de la tiorredoxina.

Se discute la probabilidad de que el sistema de tiorredoxina este jugando un papel importante para la depuración del H_2O_2 .

Alberto Guevara Flores. Partial characterization of the glutathione and thioredoxin systems from cysticerci of *Taenia crassiceps*.
Thesis director: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena.

Summary

Aerobic organisms are exposed to reactive oxygen species. High levels of these compounds are eliminated by nonenzymatic and enzymatic antioxidant systems. In parasitic helminths antioxidant enzymes like superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase present, display low activities or are even absent. Recently, a new family of antioxidant enzyme family has been described, the peroxiredoxins (thioredoxin peroxidase). These enzymes play an excellent role in the depuration of H_2O_2 .

The cysticerci of *Taenia crassiceps* present low activity of catalase and cytochrome c peroxidase. We studied the glutathione system (GSH, GSSG, and peroxidase and reductase of glutathione). Micromolar glutathione levels were determined in this parasite, which are below the concentration found in mammals. Glutathione peroxidase and reductase, activities in crude fractions were about 10 nmoles of NADP+/min/mg protein.

Glutathione reductase activity has kinetic characteristics which are associated to thioredoxin glutathione reductase (TGR), a selenium dependent enzyme reported by Alger. H and Williams. D. (2002). Activity inhibition by nanomolar concentrations of auranofin and the capacity to use other substrates that contain disulphurs like a thioredoxins reductases supports this proposal.

We purified the cysticercus thioredoxin around ~180 times with a yield of ~ 63 %. In addition we identify the active site of the thioredoxin.

What suggests, that the system plays an important role in the depuration of H_2O_2 .

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.0.- Generalidades de los céstodos

Los helmintos son parásitos cuyas formas adultas pueden vivir en hospederos vertebrados. Son diversos en sus estructuras corporales, ciclos de vida, fisiología, etc. filogenéticamente son complejos, desde el punto de vista de su embriología, se pueden dividir en:

* Acelomados (sin cavidad corporal), como son los platihelminfos

* Pseudocelomados (con cavidad corporal), como son los nemátodos y los acantocéfalos.

Dentro de los platihelminfos se encuentra la clase céstoda. Esta se distingue porque todos sus integrantes son parásitos. Generalmente los adultos son endoparásitos del aparato digestivo de algún vertebrado, la presencia de estructuras especializadas del gusano adulto aplanado adaptado para una existencia endoparásita (Whitfield, 1982).

Casi todos los céstodos estudiados hasta ahora tienen un ciclo de vida que pasa por uno, dos o más hospederos intermediarios hasta llegar al estado adulto. Hay sólo algunas excepciones que tienen un ciclo de vida directo. En dichos casos es en el hospedero definitivo generalmente es un vertebrado, en donde se lleva a cabo la reproducción sexual del parásito. En los hospederos intermediarios, que pueden ser invertebrados o vertebrados según el caso, frecuentemente se pueden llevar a cabo la reproducción asexual (gemación). Debido a su naturaleza hermafrodita un adulto puede producir millones de huevos, durante su vida reproductiva, de los cuales sólo unos pocos llegan a su fase adulta.

La estructura corporal de un céstodo en su estado adulto se divide en tres regiones características que son: escólex, cuello y estróbilo. (figura 1A)

A) El escólex o la "cabeza," puede estar equipada con una variedad de estructuras de fijación que sirven para mantener al animal en el intestino del hospedero. Tales estructuras pueden ser ventosas, canales, botridios, ganchos, espinas, o combinaciones de éstas.

B) El cuello es una zona relativamente indiferenciada, entre el escólex y el estróbilo, y que puede variar en longitud. Contiene células germinales que aparentemente son las que originan y forman los nuevos proglótidos.

C) El estróbilo es una estructura situada después del cuello que consiste en una serie lineal de segmentos llamados proglótidos. Los que están situados en la parte más cercana al cuello son proglótidos inmaduros ya que sus órganos reproductivos no son funcionales. Los proglótidos intermedios son sexualmente maduros y los últimos se encuentran generalmente grávidos o llenos de huevos (figura 1B). En algunas especies los proglótidos grávidos se desprenden periódicamente del estróbilo y se liberan junto con la materia fecal del hospedero (Smyth and McManus, 1989a).

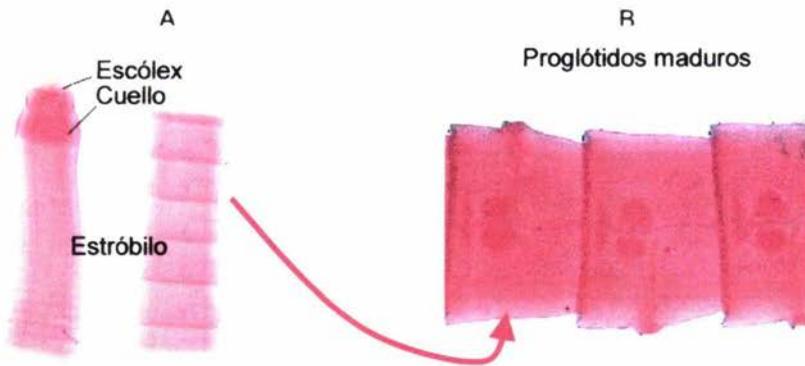


Figura 1. Imagen general de una *Taenia*. Tomada de Pappas PW y Wardrop S.M de la dirección www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/taenia.html

1.1.0.- Ultraestructura

Los cestodos carecen de boca y de intestino, por lo que el material nutritivo debe pasar a través de la superficie del cuerpo (tegumento). A través del tegumento se eliminan los materiales de desecho. El tegumento absorbe los nutrientes en forma muy similar a lo que ocurre en la mucosa intestinal de los vertebrados. El tegumento está cubierto por pequeñas proyecciones llamadas microtricas, las cuales cubren completamente la superficie del organismo y son similares, en este aspecto, a las microvellosidades del epitelio intestinal. Se ha propuesto que las microtricas sirven para aumentar la superficie de absorción. Dado un

aspecto en conjunto se han denominado borde en cepillo (Smyth y Mcmanus, 1989). Debajo de la membrana se encuentra el sincicio del tegumento. Este contiene una gran cantidad de cuerpos electrodensos, mitocondrias y vesículas que contribuyen a la formación del glicocálix (Schmidt y Roberts, 1981). En la parte inferior del sincicio se encuentra una membrana basal y por debajo de ésta se localiza el parénquima celular que contiene fibras musculares que son ricas en mitocondrias, (Fig.2) (Gray, 1984).

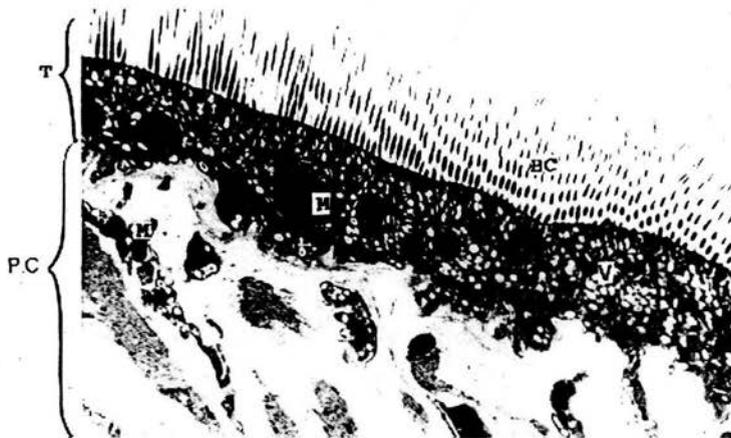


Figura 2. Micrografía de corte transversal de un cisticerco de *T. crassiceps*, en el cual se muestra el "Tegumento" (T), contiene: una zona membranal formando un borde en cepillo (B.C), mitocondrias (M), vesículas (V), y el parénquima celular (P.C).

1.1.1.- *Taenia crassiceps* y ciclo de vida.

La *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un parásito común del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en Europa. Su estado larvario, conocido como *Cisticercus longicollis* (Rudolphi, 1819), se encuentra a menudo bajo la piel y en las cavidades corporales de diversas especies de pequeños roedores, (Freeman, 1962). La clasificación para este parásito es la siguiente.

Clasificación:

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Género: *Taenia*

Especie: *crassiceps*

Ciclo de vida:

En la etapa final de su ciclo de vida, las *Taenias* adultas viven y maduran sexualmente en el intestino del zorro rojo (*Vulpes vulpes*), que es el hospedero definitivo. Ahí pueden producir millones de huevos, de los cuales sólo unos pocos llegan a la fase adulta. Los huevos son infectivos cuando salen del hospedero definitivo, pero sólo eclosionan en oncosferas (embriones) cuando son ingeridos por los roedores (hospederos intermediarios), (Cheng, 1987). Los embriones penetran a través de las células epiteliales del intestino de los roedores y son transportados mediante el sistema sanguíneo o linfático hasta el músculo. Así se desarrollan en larvas [cisticercos o metacéstodos, (Smith y McManus, 1989)] (figura 3). Finalmente, cuando el zorro se alimenta de roedores infectados, los cisticercos se desarrollan en el intestino del carnívoro, cerrando así el ciclo de vida.

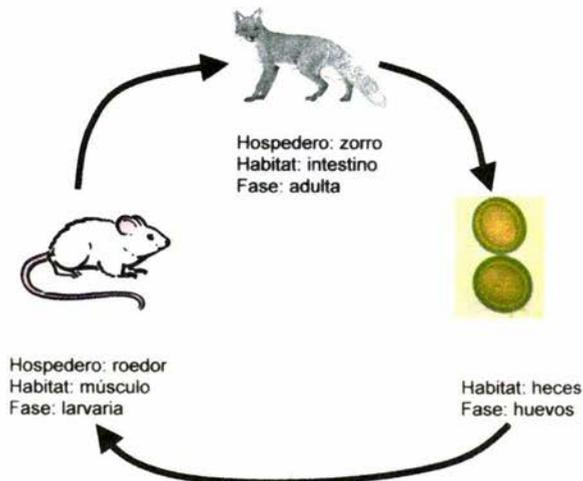


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

Debido a su capacidad reproductiva asexual, se ha logrado obtener con facilidad la fase larval. Se obtiene inoculando cisticercos en el peritoneo del ratón (hospedero). Ahí se reproducen asexualmente hasta saturar el espacio de la cavidad corporal del ratón. Aproximadamente 6 meses después se sacrifica el hospedero para recuperar los cisticercos (Fig.4).

El hecho de que este parásito que es pariente cercano de *Taenia solium*, no infecte al ser humano, así como su capacidad para reproducirse asexualmente, lo hace atractivo como modelo experimental, siendo factible su cultivo en el ratón en una forma segura y económica.

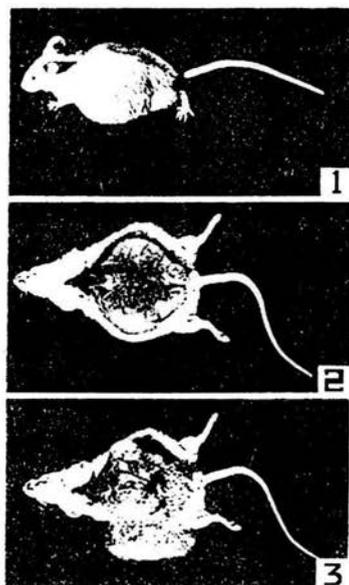


Figura 4. Ratón infectado por cisticercos de *Taenia crassiceps* 1) un ratón, seis meses después de la infección, 2) ratón con el abdomen expuesto, 3) ratón con el abdomen expuesto mostrando los cisticercos.

1.2.- El oxígeno

La presencia del O_2 en los organismos aerobios permite una oxidación completa de un gran número de moléculas (carbohidratos, lípidos, aminoácidos) lo que resulta en una eficiencia energética que es mayor comparada con la de la vida anaerobia.

El O_2 realiza una reducción completa al aceptar cuatro electrones para formar dos moléculas de agua. Esta reducción se lleva a cabo por la citocromo c oxidasa que a la vez transporta protones a través de la membrana. Simultáneamente se sintetiza ATP por el gradiente protón-motriz (Skulachev. 1996).

Cuando el O_2 alcanza concentraciones que exceden los niveles normales en el organismo, se vuelve tóxico.

1.3.- Las EOR y los Antioxidantes

El O_2 también puede realizar una reducción incompleta. Al aceptar sólo un electrón se forma el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Esto sucede en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria se liberan y generan el $O_2^{\bullet -}$. Esto ocurre principalmente en el complejo I [NADH deshidrogenasa (Turrens y col. 1980)] y en el ciclo de las quinonas (Boveris y col. 1976). Algunas oxidasas también producen $O_2^{\bullet -}$, como la oxidasa de xantina y la oxidasa del NADPH entre otras. El superóxido formado es dismutado por la superóxido dismutasa (SOD), produciendo la mayor parte del H_2O_2 que se forma en la célula. Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, que puede provenir de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y el ión hidroxilo (OH^-) (reacción de Fenton).

Estas EOR causan daño en las macromoléculas biológicas (las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos), y esto conduce en algunas ocasiones a la muerte celular. Los organismos aeróbicos requieren tener mecanismos que disminuyan el daño molecular causado por las EOR. Han desarrollado sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, los cuales actúan para prevenir y reparar los daños derivados de las EOR.

1.3.1.- Mecanismos antioxidantes no enzimáticos

La vitamina C (ácido ascórbico) se encuentra en la mayoría de las frutas y los vegetales. Esta es generalmente abundante en la mayoría de los tejidos de las frutas. Tiene dos hidroxilos iónizables que hacen de este un excelente agente reductor.

La vitamina E (alfa-tocoferol) es un compuesto que se encuentra en los aceites vegetales y es esencial para el hombre. Se absorbe junto con otras grasas formando parte de los quilomicrones.

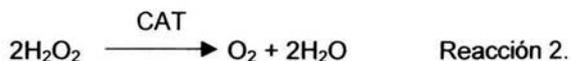
El glutatión (GSH) es un tripéptido con un residuo de cisteína que puede realizar una oxidación/reducción, es hidrosoluble y la forma que predomina del glutatión es el estado reducido (GSH), con una relación [GSH]/[GSSG] de 100:1, lo que sugiere que actúa protegiendo a la célula contra la oxidación (Meister, 1995).

1.3.2.- Mecanismos antioxidantes enzimáticos

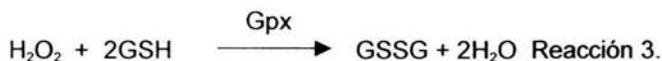
Las principales enzimas antioxidantes son la dismutasa del superóxido, la catalasa y la peroxidasa del glutatión. La SOD cataliza la transformación del $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 (reacción 1).



La catalasa es una de las enzimas más eficientes que se conocen. Responsable de la detoxificación del H_2O_2 , produciendo O_2 y $2H_2O$ (reacción 2).



La peroxidasa del glutatión comparte el sustrato (H_2O_2) con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípoperóxidos y otros hidroperóxidos orgánicos cataliza la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH) y H_2O_2 en presencia del GSH, (Matés y Sánchez. 1999) (reacción 3).



Las peroxirredoxinas han recibido una atención considerable en los últimos años como una nueva familia de proteínas antioxidantes, dentro de éstas están las peroxidases de tiorredoxina. Reducen el H_2O_2 e hidroperóxidos por medio de la oxidación/reducción de grupos tioles que están presentes en estas enzimas. Son ubicuas y han sido identificadas en levaduras, plantas y en células animales, incluyendo protozoarios y helmintos parásitos. Aunque su localización es principalmente en el citosol, también se han encontrado dentro de la mitocondria, cloroplastos y peroxisomas, asociadas al núcleo y a las membranas. Esta proteína es la segunda o tercera más abundante en los eritrocitos (Wood y col. 2003). De hecho, estas enzimas también parecen ser abundantes en los nemátodos parásitos que están expuestos a un medio oxidativo (Henkle-Dührsen y Kampkötter. 2001).



La Fig. 5. representa esquemáticamente los sistemas oxidantes y antioxidantes en las células. La figura muestra como el anión superóxido se produce dentro de la célula. La formación del $\text{O}_2^{\bullet -}$ en la mitocondria es debida a los electrones que se liberan de la cadena respiratoria y en el citosol es debida a algunas enzimas que contienen flavina que ceden un electrón al O_2 . Como se mencionó anteriormente dos moléculas del anión superóxido son dismutadas por las superóxido dismutasas para formar el peróxido de hidrógeno; este último puede ser metabolizado enzimáticamente a oxígeno molecular y agua por medio de la catalada o por las peroxidases de glutatión o de tiorredoxina (Nordberg y Arnér. 2001).

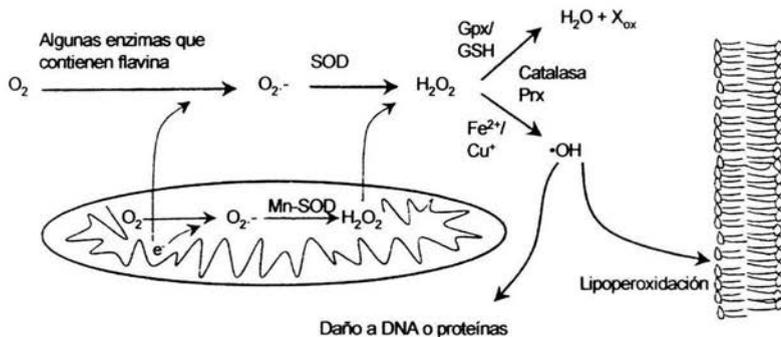


Fig 5. Esquema simplificado de los sistemas oxidativo y antioxidante en las células.

En los organismos superiores el peróxido de hidrógeno es destruido por la catalasa, la peroxidasa del glutatión y las peroxirredoxinas. Hansberg en el 2002 reportó las constantes cinéticas de estas tres enzimas: la catalasa ($K_m = 20 \text{ mM}$ y $K_{cat}/K_m = 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), la peroxidasa de glutatión ($K_m = 25 \text{ } \mu\text{M}$ y $K_{cat}/K_m = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y la peroxirredoxina ($K_m = <60 \text{ } \mu\text{M}$ y $K_{cat}/K_m = \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Esto indica que la peroxirredoxina es la menos eficiente para la depuración de H_2O_2 , resultando cuestionable su importancia como peroxidasa.

1.4.- Los sistemas redox de la célula

El estado redox de la célula es importante pues regula varias funciones dentro de la misma. Los cambios en el estado redox de la célula, inducidos por estímulos externos o internos puede conllevar a alteraciones en la función celular. Se ha propuesto que el glutatión y la tiorredoxina son los dos sistemas reductores más importantes que mantienen el equilibrio redox dentro de la célula eucariótica (Das y White. 2002). Algunos autores han considerado que estos dos sistemas redox funcionan en paralelo, (Das y White. 2002). En la figura. 6 se representa el esquema en donde se observa la semejanza entre los dos sistemas.

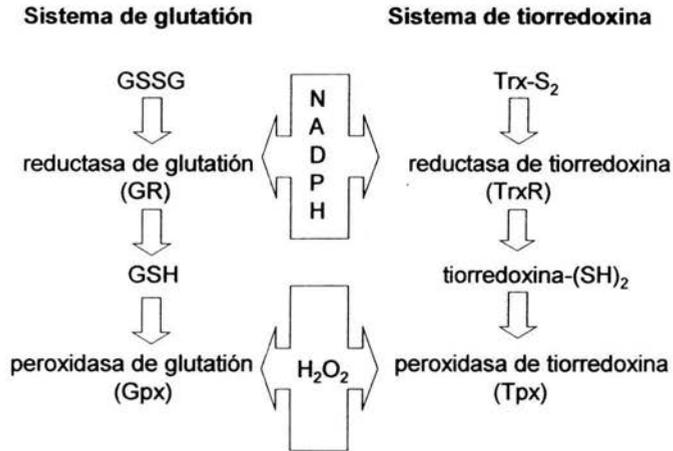


Figura 6. Muestra de forma comparativa los dos principales sistemas de regulación redox dentro de la célula eucariótica.

1.4.1.- El glutatión y síntesis

El tiol más abundante en la célula es el glutatión. Es un tripéptido, L - γ glutamil - L - cisteinilglicina y se encuentra ampliamente distribuido en los organismos, en concentraciones que van desde 0.1 a 10 mM. Su localización es soluble y se encuentra principalmente en la forma reducida por la reductasa del glutatión. El grupo SH de la cisteína es el que experimenta una oxidación/reducción y es, por lo tanto, el responsable de la función redox del glutatión. La relación de GSH:GSSG en los organismos es de 100:1. Este equilibrio, aunado a su elevada concentración, sugiere un papel central en la célula, en la regulación del equilibrio redox (Meister, 1995). El GSH ha sido relacionada con varias funciones celulares como son: ser sustrato de la peroxidasa de glutatión para la depuración del H₂O₂, regula del ciclo celular y la expresión de genes entre otras (Dickinson y Forman, 2002).

Síntesis:

El glutatión es sintetizado in vivo por la acción consecutiva de dos enzimas: la γ -GluCys sintetasa, que usa como sustratos el glutamato y la cisteína para formar el dipéptido γ -GluCys, el cual es combinado con una glicina en una reacción catalizada por la glutatión sintetasa para generar el GSH. El ATP es el otro sustrato indispensable para ambas enzimas. Los niveles intracelulares del glutatión son regulados por una inhibición por producto (GSH) de la γ -GluCys sintetasa (Richman y Meister. 1975; Mirsa y Griffith. 1998).

1.4.2.- La tiorredoxina

Las tiorredoxinas son proteínas redox pequeñas de ~12 KDa que se han encontrado en organismos de todos los reinos. Tienen un sitio activo altamente conservado (WCGPCK). Los dos residuos de cisteína en el sitio activo experimentan una oxidación /reducción, formando la Trx-S₂ y la Trx-(SH)₂ (Powis y Montfort. 2001). La concentración de la tiorredoxina en el plasma esta alrededor de 6 nM (Nakamura y col. 1997). Esta proteína está involucradas en un gran número de funciones celulares como son: abastecer de equivalentes reductores para la reductasa de ribonucleótido, regula factores de transcripción, estimula el crecimiento celular, inhibe la apoptosis, se ha encontrado un incremento en los niveles de tiorredoxina en mucho tumores humanos (Powis y Montfort. 2001). También abastece de equivalentes reductores a la peroxidasa de tiorredoxina para depurar el H₂O₂. Las tiorredoxinas proveen de citoprotección contra el estrés oxidativo (Fernando y col. 1992) atrapando a el H₂O₂.

1.4.3.- Las peroxidasas

1.4.3.1.- Peroxidasa del glutatión

La peroxidasa de glutatión es una enzima que ha sido descrita en los animales, en las plantas, en los protozoarios y en algunos hongos y bacterias. Existen variantes dependientes e independientes de selenio. Reducen el H₂O₂ y los hidroperóxidos orgánicos usando el GSH como un agente reductor. Se han descrito seis isoformas de la enzima en los mamíferos, de

las cuales al menos dos son homotetraméricas, con una selenocisteína por subunidad (Nordberg y Arnér. 2001; Henkle-Dührsen y Kampkötter. 2001) El peso molecular por subunidad entre las diferentes isoformas esta entre 18 y 25 KDa. Las subunidades por separado no presentan actividad catalítica, con excepción de la isoforma de Gpx monomérica que también posee un átomo de Se.

1.4.3.2.- Peroxidasa de tiorredoxina

Las peroxirredoxinas (PRXs) son una nueva familia de enzimas que incluyen a las peroxidases de una y dos cisteínas. Las PRXs se distinguen de otras peroxidases porque no tienen cofactores metálicos u otros grupos prostéticos. Dentro de este grupo se encuentran las peroxidases de tiorredoxina (Tpx) de dos cisteínas, las cuales se ha reportado que reducen el H_2O_2 con el uso de electrones que provienen del sistema de tiorredoxina (Henkle-Dührsen y Kampkötter. 2001) y su peso molecular esta alrededor de 25 KDa. (Jeong y col. 1999).

1.4.4.- Las disulfuro reductasas

Son flavoproteínas que actúan sobre disulfuros en presencia de un donador de equivalentes reductores, sea el NADH ó el NADPH.

1.4.4.1.- Reductasa del glutatión

La reductasa del glutatión (G.R) está ampliamente distribuida entre las bacterias, los hongos, las plantas, los protozoarios y los animales (Williams jr. 1976; Holmgren. 1980; Carlberg. 1981), pero no es ubicua. Se encuentra en forma de monómero, dímero u oligómero, dependiendo de la especie. Sin embargo, se puede decir que la forma más común de la enzima es el homodímero con subunidades de ~ 55 KDa. Esta enzima, al igual que la reductasa de la tiorredoxina, esta organizada en tres dominios estructurales: el primero une el NADPH, el segundo une el FAD y el tercer dominio que tiene un disulfuro reducible en el extremo amino terminal y sirve como un acarreador intermediario de hidrógenos para la reducción del disulfuro de glutatión (Metzler. 2001). Hasta el momento no se conoce un inhibidor específico para esta enzima. Se ha encontrado principalmente soluble, tanto en citosol como en la fracción soluble mitocondrial.

1.4.4.2.- Reductasa de la tiorredoxina

Las reductasas de tiorredoxina (TrxR) son flavoproteínas que se han encontrado ampliamente distribuidas en todos los organismos hasta ahora estudiados. Una diferencia entre la TrxR de células de mamífero y las que han sido encontradas en bacterias, hongos y plantas (Williams y col. 2000), es que la segunda están compuestas de dos subunidades idénticas de 35 KDa, con un disulfuro redox-activo. Estas TrxRs más pequeñas son más específicas por la tiorredoxina de la misma especie. En contraste, la TrxR de células de mamífero está compuesta por dos subunidades idénticas de 55 KDa y tiene la capacidad de utilizar varios sustratos que contienen disulfuros. Adicionalmente a los dominios que presenta la reductasa del glutatión, esta enzima tiene una secuencia altamente conservada – GCUG- en el extremo carboxilo terminal en cada subunidad; donde “U” corresponde a un residuo de selenocisteína, que en presencia del residuo de cisteína puede formar un puente selenonil-sulfuro cuando la enzima esta oxidada. La reducción de este puente forma un selenoltiol, generando el sitio activo de la TrxR capaz de reducir a una tiorredoxina oxidada y otros sustratos (Vlamiš-Gardikas y Holmgren. 2002).

Por otro lado, algunos autores proponen que la reductasa de tiorredoxina de mayor tamaño utiliza una amplia variedad de sustratos debido a la presencia de la selenocisteína (Zhong y col. 2000). Esta información sugiere que por eso la reductasa de glutatión es muy específica por el disulfuro del glutatión (GSSG).

Adicionalmente, la reductasa de tiorredoxina es más sensible al inhibidor de selenoproteínas (auranofin) en concentraciones nanomolares (Gromer y col. 1998).

En mamíferos, el sistema de glutatión y el de tiorredoxina están presentes tanto en el citosol como en la mitocondria, debido a la existencia de genes que codifican para las isoenzimas de ambos sistemas, o bien por la existencia de un procesamiento alternativo de un gene. Esto último ocurre en las variantes citosólica y mitocondrial de la TrxR de *Drosophila* en donde las dos isoformas derivan del mismo gene, cuyo transcrito sufre un “empalme alternativo”, procesamiento alternativo.

1.5.- La tioredoxina-glutación reductasa (TGR)

Recientemente se ha descrito una enzima más compleja, que tiene una alta especificidad para la tioredoxina y el glutatión. Por lo que se llamo reductasa de tioredoxina y glutatión (TGR). Es una selenoproteína que posee actividad de reductasa de tioredoxina, reductasa de glutatión y de glutarredoxina. Teniendo una amplia especificidad por diferentes sustratos disulfuros debido a una fusión de los dominios de TrxR y de la glutarredoxina. Esta enzima se ha reportado en células de testículo de ratón (Sun Qi-An y col. 2001), *Schistosoma mansoni* (Alger y Williams. 2002), *Echinococcus granulosus* (Agorio y col. 2003) y en *Taenia crassiceps* (Rendón y col 2004).

1.6.- EOR y Enzimas antioxidantes en los helmintos

Los helmintos deben de tener un sistema de protección eficiente contra el H_2O_2 generado por el sistema inmune del hospedero para poder vivir dentro del mismo. Adicionalmente los helmintos se tienen que proteger de las especies que produce su propio metabolismo. Se ha demostrado experimentalmente que diversos parásitos helmintos, producen cantidades ostensibles de peróxido de hidrógeno. (Cheng. 1987, Cheah y Chance. 1970). Sin embargo, no se sabe si esto mismo ocurre *in vivo* (Paul y Barret, 1980).

En el cisticerco de *Taenia crassiceps* se ha demostrado que produce ~ 10 nmoles de H_2O_2 $min^{-1} mg^{-1}$ de proteína durante la respiración mitocondrial utilizando el NADH como sustrato (datos del laboratorio), que es un valor semejante a lo reportado en otros céstodos (Batra y col. 1992).

Callahan, y col., en 1988, midieron la actividad de algunas enzimas antioxidantes, como la SOD, la CAT y la GPx en diferentes helmintos (con el estado adulto en su mayoría). Sus datos se muestran en la Tabla 1. Las actividades de catalasa y de peroxidasa de glutatión son bajas comparadas con la de los mamíferos. La superóxido dismutasa se encuentra en la mayoría de los helmintos, lo que sugiere que hay una producción de peróxido de hidrógeno en estos organismos.

Los datos que se muestran (tabla 1).

Tabla 1. Enzimas antioxidantes en algunos helmintos.

ORGANISMO HELMINTOS	ACTIVIDAD		
	SOD (U/ mg de proteína)	CATALASA (U/mg de proteína)	GSH-Px (mU/ mg de proteína)
<i>Trichinella spiralis</i> larva recién nacida	6.8	0	0
adultos	19.2	0	16
larva muscular	15.0-30.8	0	36
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> Adultos	15.34	1.13	29
<i>Nematospiroides dubius</i> Adultos	31.63	3.78	23
<i>Onchocerca cervicalis</i> Microfilarias	29.5	0.0004	9
Adultos	27.6	0.0001	6.8
<i>Taenia taeniformis</i> Adultos	34.29	ND*	ND*
<i>Hymenolepis diminuta</i> Adultos	7.9	0	0
<i>Moniezia expansa</i> Adultos	9.5	0	0
<i>Fasciola hepatica</i>	ND*	0	ND*

Adaptado de Callahan y col. 1988

* N.D. no detectado

1 unidad de SOD es la cantidad de enzima requerida para inhibir la reducción del citocromo c un 50%.

1 unidad de catalasa es la cantidad de enzima requerida para descomponer un 50% de 20 mmol de peróxido de hidrógeno en un minuto.

1 unidad de GSH-px – es la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de glutatión reducido en un minuto a 25°C.

La ausencia de la catalasa (Rubio. 1996) y la peroxidasa del citocromo c (Guevara. 2001), en el cisticerco de *Taenia crassiceps*, sugiere que otra enzima es la encargada de depurar el H₂O₂. Las peroxirredoxinas son una familia de enzimas que también llevan a cabo la reducción del H₂O₂, pero datos en la literatura indican que tiene una eficiencia catalítica baja (~ 2 ordenes de magnitud) comparada con la peroxidasa de glutatión (Hansberg. 2002). Esto sugiere que la peroxidasa de glutatión puede estar jugando un papel importante en la depuración del H₂O₂.

En los helmintos sólo existen reportes aislados de los componentes del sistema como son: la presencia de la peroxidasa de glutatión en *Schistosoma mansoni* (Mei y LoVerde. 1995). Se ha identificado una variante de la Gpx en *Brugia pahangi* fue llamada gp29 (Maizels y col. 1989). Sin embargo, Ou Xiu y col., en 1995 no encontró la actividad de

peroxidasa de glutación en extractos crudos de *Brugia malayi*. McCallum y Barrett en 1995 purificaron un tipo de reductasa de glutación del céstodo *Moniezia expansa*.

Sin embargo, en la literatura se muestra que el sistema de tiorredoxina ha sido mejor caracterizado entre los parásitos.

Como en el protozooario *Plasmodium falciparum* en donde se ha caracterizado el sistema de tiorredoxina que comprende la peroxidasa, la tiorredoxina y la reductasa de tiorredoxina (Kanzok. 2002).

En los helmintos parece que la reductasa de tiorredoxina es remplazada por una reductasa de tiorredoxina y glutación (TGR), por ej. en el trematodo *Schistosoma mansoni* se conoce muy bien el sistema de tiorredoxina que comprende la peroxidasa (Kwatia y col. 2000), la tiorredoxina (Alger y col. 2002) y la reductasa de tiorredoxina y glutación (Alger y Williams. 2002). En el céstodo *Echinococcus granulosus* pariente cercano de *Taenia crassiceps* se terminó de caracterizar el sistema de tiorredoxina que comprende la peroxidasa (Salinas y col. 1998), la tiorredoxina (Chalar y col. 1999) y la reductasa de tiorredoxina y glutación (Agorio y col.2003). La TGR en los helmintos se ha propuesto que puede estar remplazando a la reductasa de tiorredoxina y a la reductasa de glutación en estos parásitos.

El sistema de tiorredoxina de *Echinococcus granulosus* ya ha sido reportado, lo cual hace sugerir que este sistema puede estar presente en *Taenia crassiceps*. En cambio del sistema de glutación prácticamente no se sabe nada en los cestodos. Por un lado, resulta interesante identificar y caracterizar los sistemas de glutación y el de tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Y por el otro, determinar el mecanismo que utiliza el parásito para depurar el H_2O_2 .

CAPITULO II. HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES

2.0.- HIPÓTESIS

Siendo el sistema de glutatión y el de tiorredoxina los dos principales sistemas redox dentro de las células, consideramos que ambos sistemas se encuentran en el cisticerco y que deben de tener un papel esencial en la depuración del H_2O_2 en *Taenia crassiceps*.

2.1.- OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar los sistemas redox de glutatión y de la tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*.

2.2.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Cuantificar la concentración del glutatión tanto GSH como GSSG en el cisticerco de *T. crassiceps*.
- 2) Identificar y localizar la actividad de la reductasa de glutatión y de la reductasa de tiorredoxina en el cisticerco de *T. crassiceps*.
- 3) Identificar y localizar la actividad de la peroxidasa de glutatión y la peroxidasa de tiorredoxina.
- 4) Purificar a la tiorredoxina del cisticerco de *T. crassiceps*.

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.0.- Reactivos

PMSF: fenil-metil-sulfonyl-fluoruro; BPDS: ácido disulfónico batofenantrolina; NEM: *N*-etilmaleimida; γ - glu-glu: glutamil-glutamato; DTNB: ácido ditionitrobenzoico; GSH: Glutati3n; GSSG: disulfuro de glutati3n; EGTA: ácido tetraacético-etilenglicol; EDTA: ácido etilenoaminotetraacético; FDNB: fluoro-dinitrobenzeno; H₂O₂ c: per3xido de cúmeno; MOPS: ácido morfolin-propanosulf3nico; y DTT: ditionitroetanol de la compa1a SIGMA. auranofin de la compa1a INC Biomedicals

PCA: ácido percl3rico; ácido acético glacial grado HPLC de la compa1a BAKERS

3.1.- Material biol3gico:

3.1.1.- Cultivo y obtenci3n de los cisticercos

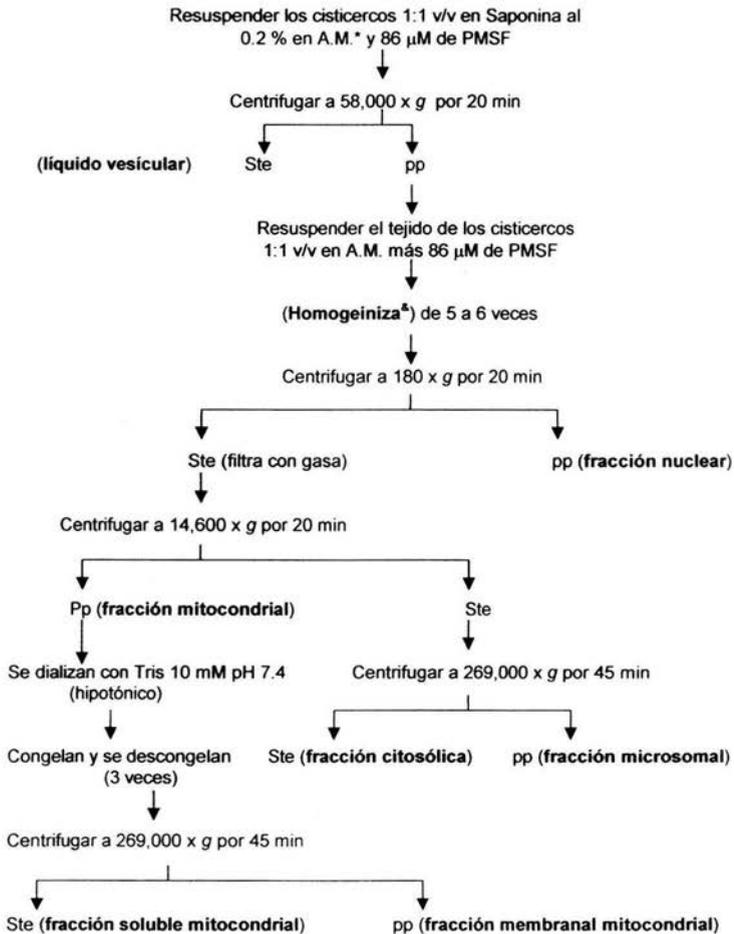
Se utiliz3 la larva (cisticerco) de *T. crassiceps* de la cepa HYG. Se inocularon ratones hembras de la cepa Balb/c de entre 6 a 8 semanas de edad con un peso de 15-18 g. A cada rat3n se le inocul3 en la cavidad intraperitoneal 20 cisticercos j3venes con el esc3lex poco desarrollado. Aproximadamente seis meses despu3s, la cavidad intraperitoneal alcanza una densidad m3xima de cisticercos. Los ratones se sacrifican y se extraen los cisticercos, los cuales se lavan de 5 a 6 veces con una soluci3n amortiguadora de fosfatos-salina (PBS) 10 mM, pH 7.4.

3.1.2.- Obtenci3n de las fracciones celulares del cisticerco de *T. crassiceps*

Los cisticercos se resuspenden 1:1 v/v en A.M* en presencia de PMSF 86 μ M y saponina al 0.2 % para obtener las diferentes fracciones (Fig.7). Se centrifugan los cisticercos a 58,000 x g por 20 min y el sobrenadante obtenido l3quido vesicular se recupera y el precipitado se homogeneiza de 5 a 6 veces con un v3stago de tefl3n Potter-Elvehjen. El homogeneizado, se centrifuga tres 3 veces a 180 x g por 20 min. El precipitado corresponde a la fracci3n nuclear y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 14,600 x g por 15 min. El precipitado obtenido representa la fracci3n mitocondrial. Y el sobrenadante se centrifuga a

269,000 x g por 45 min. El precipitado constituye la fracción microsomal y el sobrenadante a la fracción citosólica.

Por último, para romper las mitocondrias se les dializa contra un medio hipotónico y posteriormente se les somete a un ciclo congelación/descongelación. Las mitocondrias rotas se centrifugan a 269,000 x g por 45 min. El precipitado constituye la fracción membranal mitocondrial y el sobrenadante la fracción soluble mitocondrial.



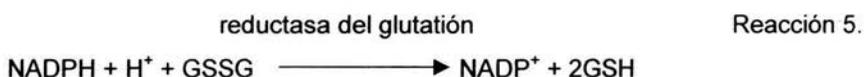
* Amortiguador para mitocondrias: Hapes 10 mM, sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM y 0.1 % albúmina desgrasada, pH 7.4 & Homogeinizar con un vástago de teflón Potter-Elvehjen.

Figura 7. Diagrama de flujo para obtener las diferentes fracciones subcelulares (en negritas).

3.2.- Ensayos enzimáticos

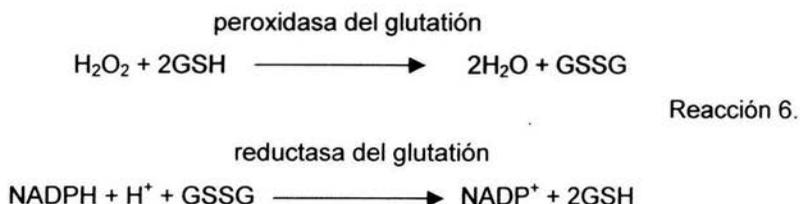
3.2.1.- La actividad de la reductasa del glutatión

La actividad de la reductasa del glutatión se midió por el método de Worthington D.J y Rosemeyer M.A (1976) con algunas modificaciones en la concentración de los reactantes. El ensayo en 1 ml contiene: 100 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 7.4), 40 μ M de GSSG, 35 μ M de NADPH y la muestra biológica. Se midió velocidad de reacción por el decremento en absorbencia del NADPH a 340 nm (reacción 5).



3.2.2.- La actividad de la peroxidasa del glutatión

La actividad de la peroxidasa de glutatión se midió por el método de Paglia y Valentine (1967). Este método se basa en una reacción acoplada, en donde el GSSG producido por la actividad de la peroxidasa del glutatión en presencia de peróxido, es transformado a GSH por la reductasa del glutatión de espinaca (comercial) en presencia del NADPH. El ensayo en 1 ml contiene: 100 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.4., 100 μ M de NADPH, 125 μ M de peróxido de cumeno, 5 μ g de reductasa del glutatión de espinaca, 4.5 mM de GSH y la muestra biológica. Se determinó la velocidad de reacción por el decremento de la absorbencia del NADPH a 340 nm (reacción 6).



3.3.- Procesamiento y determinación del glutatión con HPLC

Las muestras se procesaron de acuerdo con el método de Asensi y col. (1994): los cisticercos fueron tratados con un volumen igual de PCA al 12 % que contiene 2 mM de BPDS y 40 mM de NEM, (1^{er} derivatizante) y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjen con un vástago de teflón a 3,000 rpm de 5 a 6 veces. La suspensión resultante se centrifugo a 58,200 x g por 20 min; del sobrenadante ácido obtenido se toman 500 µl y se le agregan 50 µl de una solución de estándar interno (1 mM y – glutamilglutamato preparado en 0.3 % de PCA). La muestra se lleva a un pH de 8 – 8.5 con 2 mM de hidróxido de potasio contenido en 0.3 M de MOPS para prevenir el exceso de alcalinización. Nuevamente las muestras son centrifugadas a 58,200 x g por 20 min; del sobrenadante se toma una alícuota de 25 µl y se coloca en un tubo eppendorf que tiene 50 µl 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno al 1 % (2^{do} derivatizante) que esta disuelto en etanol; después de 45 min en la oscuridad y a temperatura ambiente se detiene la reacción con lisina 40 mM. A continuación, las muestras son secadas con nitrógeno gaseoso y se almacenan en la oscuridad a - 20°C. Antes de realizar el análisis en la HPLC, las muestras son disueltas en 50 µl de metanol al 80 % (Fase móvil A) y finalmente 30 µl son inyectas en la HPLC (Figura 8).

Para la cromatografía fue utilizada una columna de spherisorb-NH₂ (20 X 0.4 cm), manteniendo el flujo a 1 ml/min durante la corrida de acuerdo con Fariss y Reed (1980).

Solvente A: metanol al 80 %

Solvente B: 0.5 M solución de acetato de sodio (ver abajo) en metanol al 64 %.

189 ml de ácido acético glacial	}	Solución de acetato de sodio
61 ml de agua		
136 g de acetato de Sodio		

Después de la inyección de la muestra derivatizada, la fase móvil fue mantenida a 80 % de A y 20 % de B por 5 min seguido por un gradiente lineal hasta 1 % de A, 99 % B. Entonces la fase se mantuvo hasta que el GSSG eluyó de la columna. Los componentes se detectan a 365 nm.

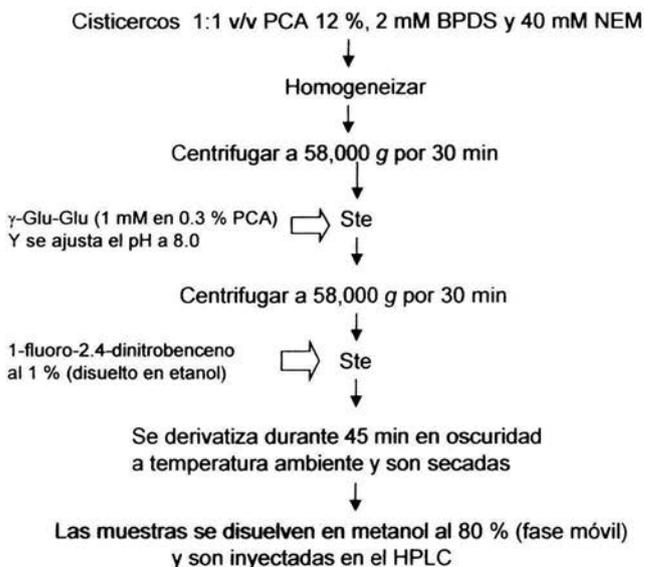


Figura 8. Diagrama de flujo para aislar y cuantificar el GSSG y el GSH en el cisticerco de *T. crassiceps*

3.4.- Obtención de una fracción soluble total del cisticerco de *T. crassiceps*

Los cisticercos se resuspenden 1:1 (v/v) con PCA al 12 %. Posteriormente se centrifugan a 58,000 x g por 30 min. El precipitado se elimina y el sobrenadante se rotula como "sobrenadante total" como se muestra en el figura 9.

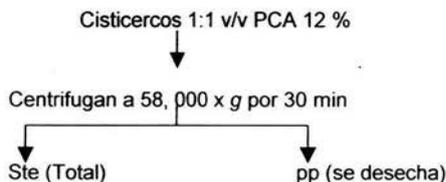


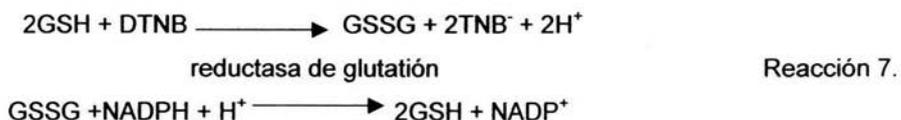
Figura 9. Obtención de una fracción soluble total del cisticerco de *T. crassiceps*

3.5.- Ensayo enzimático para cuantificar glutatión total

Se utilizó una fracción soluble total del cisticercos de *T. crassiceps* (fig.10) y se ajustó el pH a 7.4. En seguida, se realizó un ensayo enzimático por el método descrito por Tietzel, (1969) y Theodorus y col. (1985), en donde se lleva a cabo una reacción simultánea de la actividad química y la enzimática. .

Se realiza la reducción del GSSG por la reductasa del glutatión (100 mU) en presencia de NADPH (250 μ M). El GSH formado se hace reaccionar con DTNB (75 mM en 0.5 % NaHCO_3) generándose GSSG y el TNB^- que absorbe a 412 nm. Después de mezclar todos los reactantes en la cubeta durante los primeros minutos se registra un incremento lineal de la absorbencia (reacción 7).

El ensayo es calibrado con un estándar de GSSG. Se usa una cantidad de muestra biológica cuya concentración de glutatión esté dentro de la curva de calibración del GSSG estándar.



3.6.- Determinación de la actividad de la sintetasa del γ - glutamil-cisteína mediante HPLC

REACCIÓN ENZIMÁTICA: La fracción soluble citosólica y la fracción del líquido vesicular del cisticercos son mezcladas. Esta muestra es dializada para eliminar el GSH endógeno y se determina la actividad de la γ - glutamil-cisteína sintetasa en presencia de sus sustratos naturales (fig. 10). La muestra se incuba con concentraciones saturantes de glutamato 0.8 mM, cisteína 0.8 mM y ATP 5 mM en 100mM Tris, 1 mM EDTA pH. 8. Se deja reaccionar por 30 min a 37°C, la reacción se detiene con PCA al 6 %.

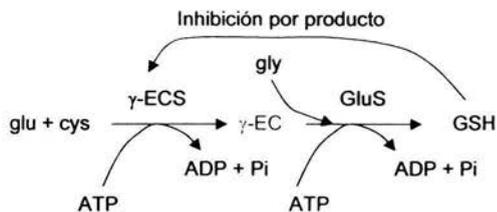


Figura 10. Muestra las enzimas que están involucradas en la síntesis del glutatión γ -ECS (Gamma glutamilcisteína sintetasa) y GluS (glutatión sintetasa) en rojo se observa el producto de la primera enzima γ -EC (Gamma glutamilglutamato).

ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE LA γ - GLUTAMIL-CISTEÍNA SINTETASA: La muestra fue analizada por HPLC de fase reversa con base en el método de Grill y col. (1985) modificado por Áviles C. y col. (2003). Las muestras que contienen tioles (γ - glutamilcisteína) fueron separados en una columna analítica C-18 spherisorb S5 ODS2 de 4.6 X150 mm (PSS 831913). La columna fue equilibrada H_3PO_4 al 0.05 % (v/v) por 50 min. Los compuestos tioles fueron detectados a 412 nm después de una derivatización post-columna con 1 mM de DTNB en 100 mM de KH_2PO_4 a pH 8.0, usando un detector de absorbancia Waters 2487. Para asegurarnos que estamos cuantificando este producto se corrió un estándar de γ - glutamil-cisteína comercial.

3.7.- Ensayo para la inhibición de la "TGR" con auranofin

La enzima TGR, que se encuentra en las fracciones solubles citosólica y mitocondrial, se incubó en condiciones reductoras (35 μ M NADPH) durante 3 min. Enseguida se agregó el inhibidor en concentraciones crecientes (de 1 a 20 nM auranofin). La actividad residual fue medida siguiendo el decremento de la absorbancia del NADPH a 340 nm. Worthington D.J y Rosemeyer M.A (1976).

3.8.- Purificación parcial de la tioredoxina del cisticerco de *T. crassiceps*

Para purificar a la tioredoxina, los amortiguadores para las cromatografías fueron preparados con EDTA 1mM y DTT 0.1 mM como suplementos.

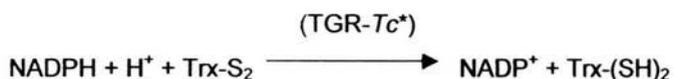
Primer paso: Los cisticercos fueron centrifugados diferencialmente como se muestra en la fig. 8, pero sin dializar las muestras. Las fracciones solubles que pertenecen al líquido vesicular y a la citosólica fueron mezcladas y se les adicionó DTT 1 mM, dejándose reaccionar por 30 min.

Segundo paso: La fracción soluble anterior en estado reducido se pasa a través de una columna de intercambio iónico (DEAE-Sephacel de 2.5 x 30 cm) previamente equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 7.8. La proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M. Se colectan fracciones de 5 ml cada 15 min. Las fracciones en donde se encontró la actividad de tioredoxina se recuperan y se concentran hasta llegar a un volumen de 6 ml aproximadamente utilizando tubos de vivaspin con una membrana que corta en 5,000 kDa.

Tercer paso: El concentrado que proviene de la columna de DEAE se pasa por una columna de filtración (Sephadex G-50 de 2.5 x 80 cm) previamente equilibrada con 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 3 ml cada 15 min. Los tubos en donde se detectó la actividad fueron concentrados con los tubos de vivaspin, como se describió anteriormente.

3.8.1.- Detección de la tioredoxina durante su purificación

Fue utilizado el método de Luthman M y Holmgren A (1982) que se basa en la reducción de los disulfuros de la insulina (150 μ M) por los tioles de la tioredoxina en presencia del NADPH (45 μ M) y de la reductasa de tioredoxina (36 μ g TGR del cisticerco de *T. crassiceps*). La reacción se lleva a cabo en 100 mM de Tris, 1 mM EDTA pH 7.8, registrando el decremento de la absorbencia a 340 nm. Dicho método recicla a la tioredoxina de modo que se alcanza un estado estacionario (reacción 8).



Reacción 8.



* TGR-Tc: tioredoxina-glutatión reductasa purificada del cisticerco de *T. crassiceps*.

3.8.2.- Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951) modificado por Markwell y col. (1981).

3.8.3.- Electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de SDS

Se preparó un minigel discontinuo siguiendo la técnica de Shägger y von Jagow (1987) con algunas modificaciones. Con estas condiciones se resuelven proteínas en el intervalo de pesos moleculares pequeños. Los minigeles se prepararon a partir de una solución madre de acrilamida al 30 % y bis-acrilamida al 0.8 %. El gel concentrador al 4 % y el resolvidor al 16.5 %, contienen glicerol al 4 % y el amortiguador del gel tiene una concentración final de 750 mM Tris-HCl pH 8.45 y SDS al 0.075 %. Utilizando persulfato de amonio al 0.1 % y TEMED 10 mM para polimerizar el gel.

Las muestras biológicas se mezclan 1:1 (v/v) con una solución que contiene SDS al 4 %, glicerol al 12 %, Tris 50 mM, mercaptoetanol al 2 %, Azul serva G al 0.01 % ajustado con HCl a pH 6.8, y se colocan en baño maría por 6 min y se depositan en los pozos del gel. Se utilizaron marcadores de peso molecular con un rango de 200 a 10 kDa (sigmamarker). El amortiguador del ánodo contiene Tris-HCl 200 mM, pH 8.9 y el amortiguador del cátodo Tris-HCl 100 mM, Tricina 100 mM y SDS al 0.1 % a pH 8.25.

Las proteínas se revelaron en el gel con azul de coomassie al 0.1 % en etanol-acético.

3.9.- Secuencia del sitio activo de la tiorredoxina

Se realizó la electrotransferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE utilizando un sistema Trans-Blot SD a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF); el tiempo de transferencia fue de 45 min a 14 Volts. Las proteínas fueron reveladas en la membrana de PVDF por medio del rojo de ponceau. La banda de proteína de ~ 12 kDa fue extraída de la membrana y se trató con el reactivo químico skatole que corta en los sitios de triptofanos (Hunziker, P.E y col. 1980), la muestra se sometió a la degradación de Edman en un secuenciador de proteína automatizado fase-gas (LF 3000, Beckman instruments) equipado con un sistema de HPLC line gold Beckman.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.0.- Identificación y cuantificación del glutatión

Se realizaron ensayos con una muestra estándar que contiene GSH, GSSG así como gama glutamilglutamato (γ -Glu-Glu). Este último fue utilizado como estándar interno. Los resultados se muestran en la figura 12A. Para el GSH el cromatograma muestra la presencia de tres señales, a los 4, 8 y 11 min para el GSH que corresponden a tres aductos, semejante a lo reportado por Asensi y col. (1994). Sin embargo, contrario a lo esperado el GSSG presentó dos señales con tiempos de elución a los 14 y 15 min, en vez de sólo una.

Para saber si la segunda señal para el GSSG corresponde a una contaminación del estándar, se llevó a cabo la reducción del GSSG, utilizando la reductasa del glutatión en presencia de NADPH. El producto se analizó con HPLC (dato no mostrado) y aparecieron las tres señales esperadas para el GSH de acuerdo a la figura 12A. Esto indica que las dos señales que aparecen cuando analizamos el GSSG corresponden a este compuesto y no a una contaminación. Recientemente Giustarini y col. (2003) identificaron las dos señales como aductos del GSSG.

Cuantificación:

Para la cuantificación del glutatión en el cisticerco se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones crecientes de los estándares (GSH, GSSG y γ -Glu-Glu) en presencia de la fracción biológica (soluble total) del cisticerco. De esta forma se conserva constante la absorbencia inespecífica en la muestra biológica, analizando el área bajo la curva (unidades arbitrarias: U.A) de cada una de las diferentes concentraciones de los estándares, se realizó la curva de calibración para cada uno de los estándares (figura 11). Para conocer la concentración de glutatión de la muestra biológica. Las unidades arbitrarias de la muestra biológica se interpola en la curva de calibración de cada estándar.

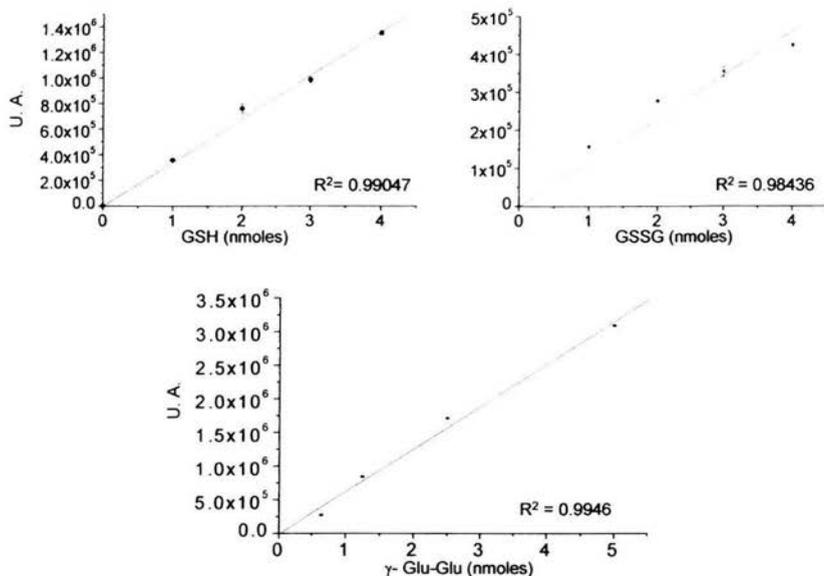


Figura 11 muestra la curva de calibración del GSH, el GSSG y el γ -Glu-Glu.

Se analizó una fracción soluble total del cisticerco de *T. crassiceps* con la HPLC (Figura 12B). Se observa la presencia de las tres señales para el GSH y las dos señales para el GSSG ya mencionadas, así como la señal del estándar interno (γ Glu-Glu). La concentración total de glutatión fue de $770 \pm 113 \mu\text{M}$, con una relación GSH/GSSG de 6:1. La concentración para la fracción soluble mitocondrial fue de $50 \pm 13 \mu\text{M}$ con una relación GSH/GSSG de 4:1, (Figura 13C).

Los valores anteriores están dentro del intervalo reportado por Meister (1995), quien sugiere que, dependiendo del organismo, el glutatión total se mantiene entre 0.1 y 10 mM. Con una relación entre sus estados GSH/GSSG que va desde 100:1 a 10:1 (Meister. 1995, Grant. y col. 1996b, y Muller. 1996). Por ejemplo, en el retículo endoplasmático, en donde el GSH está implicado en la formación de uniones disulfuros de las proteínas, la relación entre GSH/GSSG es de 3:1 (Hwang y col. 1992); en el citoplasma y en la mitocondria, la relación es mayor de 10:1, (Meredith y Reed.1982, Meister. 1988). Sin embargo, la relación de aproximadamente 5:1 en el cisticerco de *T. crassiceps* indica un aumento significativo del estado oxidado. Esto se puede deber a que en el peritoneo del hospedero los cisticercos

están sometidos a un ambiente casi anaerobio. Una vez fuera de la cavidad peritoneal, el parásito queda expuesto a tensiones altas de oxígeno, lo que provoca un estrés oxidativo y, como consecuencia, un incremento en los niveles del GSSG.

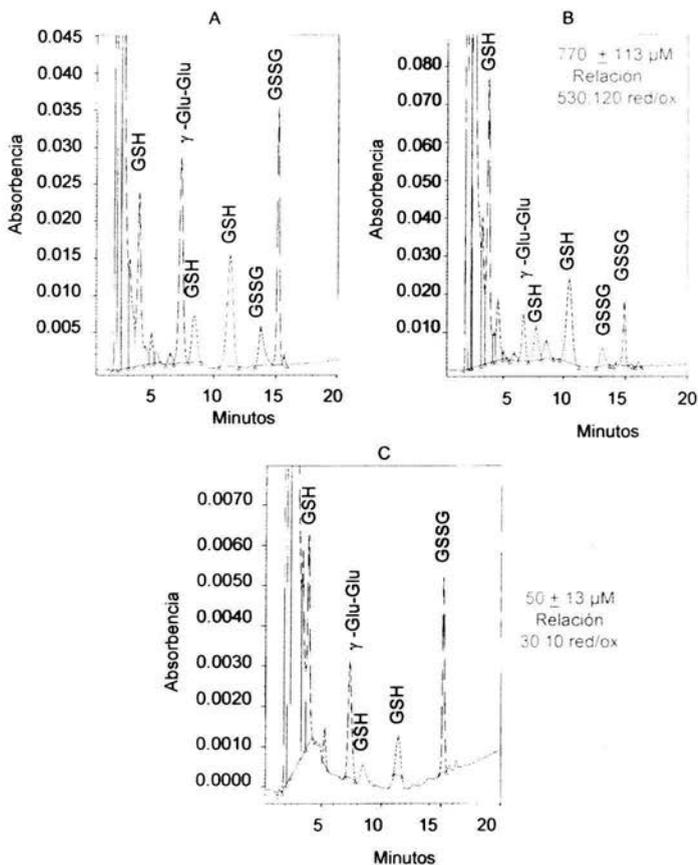


Fig 12. Cromatogramas. (A) muestra estándar que contiene GSH, GSSG y γ - Glu-Glu comerciales. (B) Fracción soluble total del cisticerco (C) fracción soluble mitocondrial del cisticerco. La absorbencia se detectó a 365 nm.

4.2.- Determinación del glutatión total por un método enzimático

Para corroborar los niveles de glutatión en el cisticerco se utilizó un ensayo enzimático (Tietzel.1989, Theodorus y col.1985) que determina el glutatión total. El método se basa reacción química acoplada a una enzimática que ocurren de manera simultanea.

El GSH se oxida químicamente con el DTNB formando el GSSG y este estilizado por la enzima reductasa del glutatión para formar en presencia del NADPH el GSH. La reacción lleva a cabo una reducción continua del DTNB a TNB⁻ durante los primeros minutos en presencia de concentraciones saturantes de DTNB y de NADPH. Como se muestra en la reacción 7 de materiales y métodos.

La concentración de glutatión fue calculada con la curva de calibración de un estándar de GSSG (figura 13). Se usa una cantidad de muestra biológica cuya concentración de glutatión esté dentro de la curva de calibración.

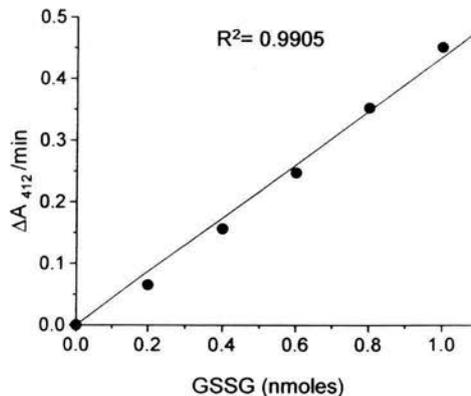


Figura 14. Curva de calibración del GSSG

Se utilizó una muestra soluble total del cisticerco (como se indica en materiales y métodos) y se analizó por el método enzimático, los resultados obtenidos indican que los niveles del glutatión total son alrededor de 950 μ M.

Ambas técnicas utilizadas dieron valores semejantes de glutatión en el cisticerco, que corresponden a una concentración ligeramente por debajo de 1 mM.

Ambrosio y col (1994) reportaron que el cisticerco de *T. crassiceps* lleva a cabo la internalización de proteínas del hospedero (como inmunoglobulinas y albúmina del suero) a su fluido vesicular, al igual que lo hacen otros céstodos (Coltorti y Varela. 1972, Coltorti y Varela. 1974 y Hustead y Williams. 1977). Debido a estos datos es posible que el glutatión

detectado provenga del hospedero. Para conocer si el cisticerco sintetiza glutatión, decidimos medir la actividad de una de las enzimas involucradas en la síntesis de glutatión.

4.2.- La γ -glutamilcisteína sintetasa

Se midió la actividad de la γ -glutamilcisteína sintetasa, que es la primera enzima de las dos involucradas en la síntesis del glutatión. Se utilizó una fracción soluble total del cisticerco para determinar dicha actividad.

La actividad observada fue de ~ 0.987 nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína que es un valor semejante al reportado en una fracción citosólica de hígado de rata (~ 1.38 nmoles $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) (Griffith y Meister. 1985). Este resultado sugiere que el cisticerco tiene la maquinaria que sintetiza el glutatión e inferimos que el glutatión cuantificado pertenece al cisticerco.

4.3.- Peroxidasa del glutatión

Una vez establecidas las condiciones óptimas para medir la actividad de la peroxidasa del glutatión, se determinó esta actividad en las diferentes fracciones subcelulares del cisticerco (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de la peroxidasa del glutatión en diferentes fracciones subcelulares del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Muestra biológica	Actividad específica*	Actividad total	%**
Líquido vesicular	27 \pm 3 (3)	5764	7.6
Nuclear	25 \pm 3 (3)	20521	27.0
Citosol	116 \pm 31 (3)	44591	58.8
Microsomal	38 \pm 14 (3)	2811	4.7
Soluble mitocondrial.	93 \pm 7 (3)	640	0.85
Membranal mitocondrial.	50 \pm 14 (3)	1427	1.8

* nmol NADP⁺ $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína

** Para sacar la actividad porcentual se considero como 100 % la suma de las actividades totales de la diferentes fracciones subcelulares obtenidas de acuerdo a la figura 7. en la sección de materiales y métodos.

Nare. y col. (1990), trabajando con extractos crudos del estado adulto de *Schistosoma mansoni*, reportaron una actividad de la Gpx de $\sim 20 \text{ nmol NADP}^+ \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína utilizando como sustrato el peróxido de cúmeno. Con el H_2O_2 obtuvieron la mitad de esa actividad.

En la tabla se muestra que la actividad específica utilizando el peróxido de cúmeno como sustrato, está en el mismo intervalo de magnitud en comparación con lo reportado por Nare. y col. (1990). Dicha actividad se encontró en todas las fracciones subcelulares. Sin embargo, la fracción citosólica y la fracción soluble mitocondrial presentan una actividad específica mayor (116 y 93, respectivamente). En términos de actividad total la fracción citosólica es la más importante, aportando cerca del 60 %. Las fracciones solubles (líquido vesicular, citosol y la fracción soluble mitocondrial) contribuyen con aproximadamente un 70 % de la actividad total en el cisticerco.

En la tabla 2 se muestra que la actividad de la peroxidasa del glutatión, contrario a lo esperado también está asociada a las fracciones membranales. Una posible explicación es que la actividad que encontramos en las fracciones membranales del cisticerco sea una actividad de peroxidasa de glutatión asociada a una glutarredoxina y/o peroxidasa de tiorredoxina, como la reportada por Collinson y col. (2002). Estos autores encontraron que en *Saccharomyces cerevisiae* una glutarredoxina con actividad de peroxidasa del glutatión. Es interesante mencionar que Hofmann y col. (2002) han observado la presencia de peroxidases de tiorredoxina en las membranas celulares.

4.4.- Reductasa del glutatión

La reductasa del glutatión, al igual que la peroxidasa del glutatión, están asociadas con la fracción soluble. En la tabla 3 se muestran los resultados de la medición de la actividad de la reductasa del glutatión en las diferentes fracciones subcelulares del cisticerco.

Tabla 3. Actividad de la reductasa del glutatión en diferentes fracciones subcelulares del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Muestra	Actividad específica*	Actividad total	porcentual**
Líquido vesicular	1.8 ± 1.1 (3)	311	11.1
Nuclear	4.1 ± 0.9 (3)	554	19.8
Citosol	5.6 ± 1.3 (3)	1861	66.7
Microsomal	N.D.	N.D.	N.D.
Soluble mitocondrial.	9.0 ± 1.8 (3)	62	2.2
Membranal mitocondrial.	N.D.***	N.D.	N.D.

* nmol min⁻¹ mg⁻¹

** Para sacar la actividad porcentual se consideró como 100 % la suma de las actividades totales de la diferentes fracciones subcelulares obtenidas de acuerdo a la figura 7. en la sección de materiales y métodos.

*** N.D.: No detectada

De la tabla 3 se observa que las fracciones solubles mitocondrial y citosólica del cisticerco de *Taenia crassiceps* tienen una actividad específica de ~9.0 y 5.6 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, respectivamente, valores que se asemejan a los reportados por McCallum y Barrett (1995), en una especie cercana como es: el céstodo *Moniezia expansa*, donde encontraron para las fracciones solubles citosólica y mitocondrial una actividad específica de la reductasa del glutatión de 29.3 y 2.1 nmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, respectivamente. También Nare. y col. (1990), encontraron en los extractos crudos del adulto de *Schistosoma mansoni*, una actividad de esta enzima de 10 nmol min⁻¹ mg⁻¹.

La actividad de la reductasa del glutatión se encontró también principalmente en las fracciones solubles, como la peroxidasa del glutatión (tabla 2).

La actividad de la peroxidasa y reductasa de glutatión, así como el glutatión encontrado en una fracción soluble total y en la fracción soluble mitocondrial del cisticerco, sugiere que el sistema de glutatión se encuentra tanto en la mitocondria como en el citoplasma. Para detectar la presencia de posibles isoformas de las enzimas. Se realizó un gel de actividad (zimograma) usando el método de Okpodu y Waite. (1997), que identifica específicamente la reductasa de glutatión y elimina la actividad de las diaforasas (actividad asociada a la reducción dependiente de NAD(P)H inespecífica de un colorante). El método

utilizado fue inespecífico para identificar la enzima, ya que dio positivo tanto en presencia como en ausencia de sustratos (datos no mostrados).

De forma paralela, tratando de purificar la reductasa del glutatión a partir del líquido vesicular del cisticerco de *Taenia crassiceps*, se caracterizó una enzima que tiene propiedades cinéticas que la asocian con una reductasa de tiorredoxina y glutatión (TGR), una enzima que es semejante a la reportada en *Schistosoma mansoni* por Alger y Williams (2002) y en *Echinococcus granulosus* por Agorio y col (2003). Esta enzima es capaz de utilizar como sustratos la tiorredoxina (Trx-S₂) así como al GSSG.

La TGR es una proteína cuya subunidad tiene una masa molecular de 65 KDa, semejante a la masa molecular reportada para una "reductasa del glutatión" en *Moniezia expansa* por McCallum y Barrett (1995). Es además una selenoproteína, ya que tiene una selenocisteína en el extremo carboxilo terminal.

La reductasa de tiorredoxina de placenta humana (Gromer. y col. 1998), y la TGR de *Schistosoma mansoni* (Alger y Williams. 2002), se inhiben específicamente con compuestos que contienen oro como son el aurotioglucosa y el auranofin a concentraciones nanomolares. En cambio la reductasa del glutatión se inhibe a concentraciones micromolares de auranofin. Esto sugiere que este compuesto es un potente inhibidor de las TrxRs y de las TGRs, e indica que la selenocisteína es el sitio de unión del inhibidor.

4.5.- Identificación de la TGR

La identificación de una disulfuro reductasa en el cisticerco nos llevó a hacer algunas pruebas para definir si la actividad que medimos es realmente una reductasa del glutatión, o de la tiorredoxina, o una TGR. Para ello, se realizaron ensayos de actividad en presencia de auranofin, tanto para la fracción citosólica y como para la fracción soluble mitocondrial, como se muestra en la Fig 15.

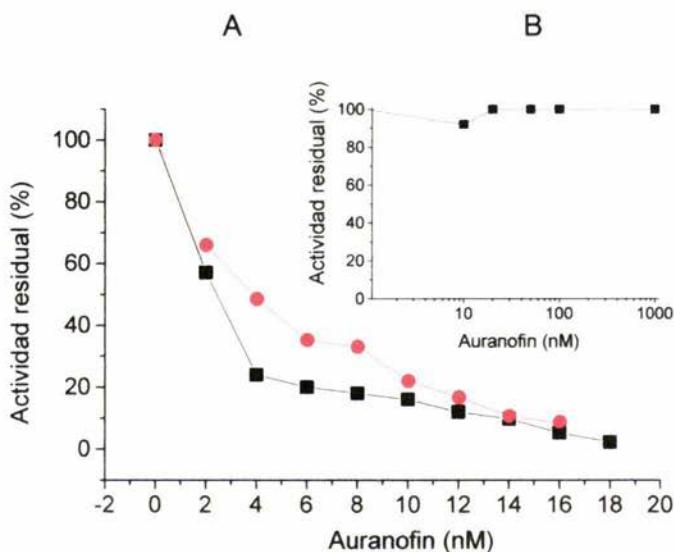


Figura 15. Actividad residual de la reductasa del glutatión en presencia de concentraciones crecientes de auranofin. (A) fracción soluble mitocondrial (■) y la fracción citosólica (●) del cisticerco. (B) Reductasa del glutatión de espinaca (■) "comercial".

Se puede observar en la figura 15A que la actividad residual de la reductasa del glutatión llega a cero con una concentración de 16 y 18 nM, con la fracción citosólica y la fracción soluble mitocondrial, respectivamente. En la figura 15B se muestra un control en donde se observa que usando hasta 1 μ M de auranofin, la reductasa del glutatión de espinaca no presenta inhibición.

Estos datos sugieren que la actividad de la reductasa de glutatión que se ha determinado en las fracciones subcelulares del cisticerco, pertenece a la TGR descrita en el líquido vesicular por Rendón y col. (2004), y que pertenece a la familia de las reductasas de tiorredoxinas (TrxRs).

Adicionalmente, se sabe que la reductasa de tiorredoxina de las células de mamíferos es un homodímero con subunidades de ~ 55 KDa (Williams y col. 2000). El selenio es esencial para la enzima y un único puente selenil-sulfuro está presente en su forma oxidada. La reducción de este puente a selenotiol genera el sitio activo de la reductasa de

tioredoxina, capaz de reducir tioredoxinas oxidadas y una gran variedad de sustratos con disulfuros. (Zhong. y col. 2000, Kanzok. y col. 2000).

Lo anterior hace sugerir dos criterios para la identificación de las TGRs, el primero es por su inhibición con concentraciones nanomolares de auranofin, el segundo es por la especificidad por otros disulfuros como el GSSG, DTNB, Trx-S₂.

La TGR y la TrxR1 de testículo de ratón reportadas por Sun Qi-An y col. (2001), también utilizan diferentes sustratos. Los datos de afinidad obtenidos por estos autores y los obtenidos del cisticerco de *Taenia crassiceps* se encuentran en la tabla 4. Los valores de la tabla sugieren que las reductasas de tioredoxina de *Plasmodium falciparum* y la de ratón prácticamente no utilizan al GSSG. En contraste, las TGRs de ratón y la del cisticerco si lo utilizan, y tienen una afinidad en el intervalo micromolar. Adicionalmente, también se observa que la TGR de ratón utiliza los sustratos con disulfuros con una mayor afinidad que las reductasas de tioredoxinas de *Plasmodium* y de ratón, semejante a lo encontrado en las fracciones crudas del cisticerco. Estos datos de utilización de sustratos y la inhibición de la actividad con concentraciones nanomolares de auranofin, apoyan la idea que la enzima que se determinó en las fracciones soluble mitocondrial y en la fracción citosólica pertenecen a una TGR, que puede utilizar tanto glutatión como tioredoxina. Esta TGR puede estar sustituyendo a las reductasas de glutatión y de tioredoxina, ya que no hemos encontrado estas actividades asociadas a otras enzimas. En cambio, en los mamíferos la reductasa de glutatión y la reductasa de tioredoxina han sido descrito como enzimas distintas.

Con las fracciones solubles citosólica y mitocondrial se realizaron algunos ensayos enzimáticos para detectar la actividad de la TGR con el sustrato tioredoxina (Trx-S₂) de *Plasmodium falciparum*. Ambas fracciones utilizaron el sustrato (dato no mostrado). Sin embargo, debido a que no se disponía de cantidades suficientes de dicho sustrato, no fue posible determinar la afinidad por éste. El que esta enzima utilice GSSG en concentraciones micromolares y que también utilice la Trx-S₂, apoya fuertemente que lo que estamos determinando es una reductasa de tioredoxina y glutatión (TGR).

Tabla 4. Afinidad de algunas reductasas de tiorredoxina y de tiorredoxina-glutati3n reductasas para diferentes sustratos disulfuros.

Sustrato	K _m (μM)				
	TrxR-Pf ¹	TGR-R ²	TrxR1-R ²	<i>Taenia crassiceps</i> *	
				F. citos3lica TGR-Tc	Soluble mitoc TGR-Tc
GSSG	> 20000	8.8	N.D	30.7	20
Trx-S ₂	10.4	3.0	4.7	---	---
DTNB	465	14.7	212	21.8	15.6

¹ Kanzok., S y col. (2000)

² Sun Qi-An y col. (2001)

* Fracciones crudas del cisticerco

La ausencia de una reductasa del glutati3n y los niveles bajos de glutati3n sugieren que el sistema de glutati3n no tiene un papel principal en la depuraci3n del H₂O₂ y que tal vez el sistema de tiorredoxina tenga un papel m3s importante en el cisticerco de *T. crassiceps*. Asimismo, informaci3n obtenida del laboratorio indica que la TGR del l3quido vesicular del cisticerco no utiliza la tiorredoxina de *E. coli* ni la tiorredoxina de *Spirulina maxima*, mientras que en contraste, la tiorredoxina de *Plasmodium falciparum* y la de placenta de humano si fueron utilizadas con buena afinidad (micromolar). Debido a que utiliza diferencialmente a las tiorredoxinas de otras especies, se decidi3 purificar a la tiorredoxina del cisticerco de *Taenia crassiceps* y ver la importancia del sistema de tiorredoxina en la depuraci3n del H₂O₂. Adem3s, la tiorredoxina se puede usar para identificar en la fracci3n del l3quido vesicular y en la citos3lica a la peroxidasa de tiorredoxina en caso de estar presente.

4.6.- Purificaci3n de la tiorredoxina

Holmgren en los a3os setenta y ochenta purific3 tiorredoxinas de distintos or3genes entre ellos de h3gado de ternero, (Engstr3m. NE., y col., 1974; Holmgren. A. 1977; Luthman M., y Holmgren. A., 1982).

Utilizando el método de Engström. y col. (1974) con algunas modificaciones, se purificó la tiorredoxina del cisticercos de *T. crassiceps* a partir de una fracción soluble del líquido vesicular y la fracción citosólica. Como primer paso se utilizó una columna de intercambio iónico equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 7.8. La proteína se eluye con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M, y la actividad de la reducción de la insulina se sigue a 340 nm. El patrón obtenido se muestra (figura 16).

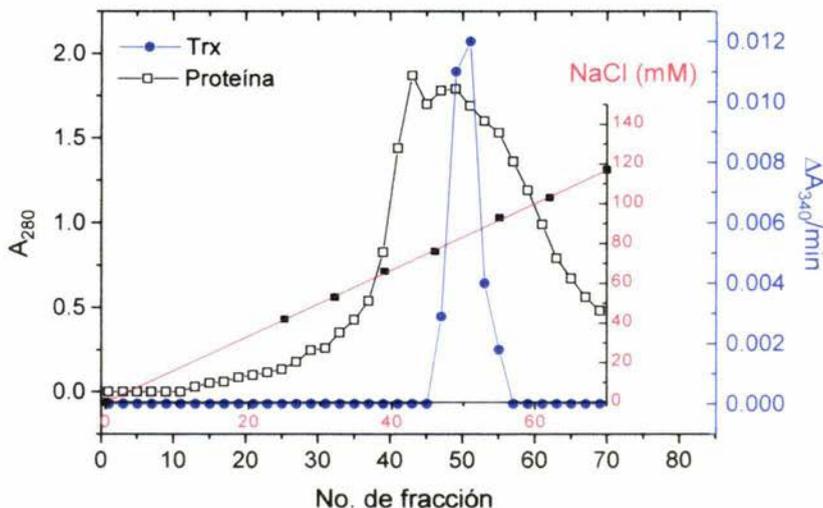


Figura 16. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephacel (pH 7.8). El perfil de elución muestra los resultados de: (•) Actividad de la Trx-*T.c* $\Delta A_{340}/\text{min}$; (□) proteína A_{280} y (—) gradiente. Se colectaron fracciones de 5 ml cada 15 min.

En la gráfica se observa que la tiorredoxina se desprende de la resina con una fuerza iónica de ~ 85 mM de NaCl, semejante a lo reportado por Luthman y Holmgren, (1982). Se juntaron las fracciones con actividad y se concentraron usando tubos vivaspin (con una membrana de corte en 5000) hasta alcanzar un volumen de ~6 ml. Posteriormente, se aplicó la muestra a una columna de filtración molecular (Sephadex G-50 con un corte entre 1.5-30 KDa). Los datos se muestran en la figura 17.

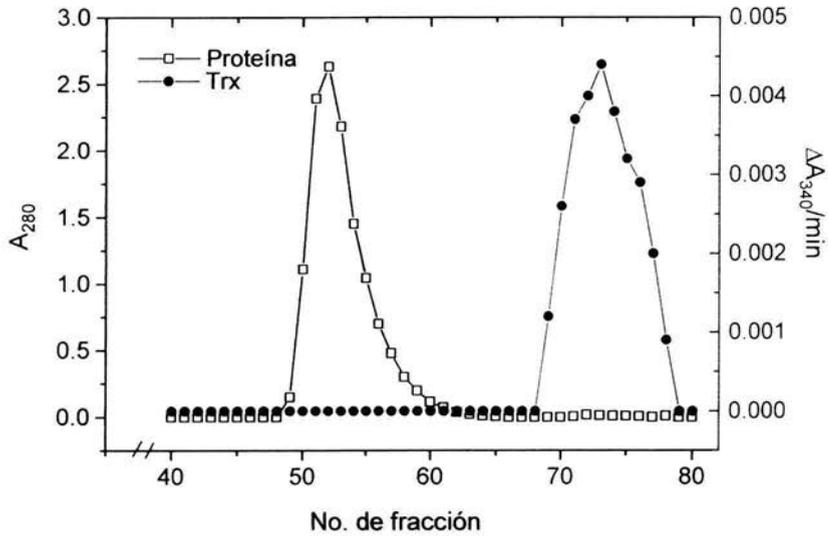


Fig. 17. Cromatografía de filtración molecular (□) proteína A₂₈₀; (•) la actividad de la Trx-T.c ΔA₃₄₀/min.

En la gráfica muestra un pico de absorbencia a 280 nm, la explicación es que se utilizó azul dextrán para observar la migración de las proteínas (para empezar a coleccionar). Sin embargo, el pico se ve asimétrico, lo cual indica que esta eluyendo proteína perteneciente al cisticerco (entre la fracción 55-60). En la figura se muestra además que la actividad de la Trx-Tc, salió a un volumen de elución mayor, en una zona en donde casi no se observa proteína. Lo anterior indica un alto grado de pureza. La tabla 5 muestra un resumen del esquema de purificación usado con la Trx-Tc.

Tabla 5. Resumen del proceso de purificación de la tiorredoxina del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Muestra	Proteína (mg)	Act.específica (mU/mg)	Act.total (mU*)	Rendimiento (%)	Purificación (# veces)
CRUDO	968.0	0.20	212	100	0
DEAE	60.5	2.80	169	79.7	12.7
FILTRACIÓN	3.5	37.9	133	62.7	189.5

* 1U = μ moles de NADPH oxidado /min. "Por reducción de insulina a 340 nm"
Con exceso de la TGR-Tc purificada.

El rendimiento de ~63 % obtenido es mayor que el publicado para la tiorredoxina de hígado de rata por Luthman y Holmgren (1982), quienes reportaron un rendimiento de ~30 %. La purificación de la proteína en el cisticerco fue de ~190 veces, en cambio, en hígado de rata la purificaron 2,300 veces, sin embargo, esto no es indicativo de la cantidad de tiorredoxina que existe en el cisticerco y puede estar mas bien en relación con la cantidad de proteína de cada una de las fuentes biológicas. Es preciso cuantificar a la tiorredoxina con otras técnicas como, por ej. densitometría y por filtración molecular en HPLC.

Para determinar el grado de pureza alcanzado se preparó un gel discontinuo siguiendo la técnica de Davis, (1964) modificada por Hedrick y Smith (1968) en condiciones desnaturalizantes y utilizando amortiguadores discontinuos como cita Laemmli (1970). En estas condiciones la tiorredoxina migra al frente del gel contaminada con otras proteínas de peso molecular pequeño, (dato no mostrado). Por esta razón, se realizó un gel en condiciones desnaturalizantes usando el método de Shägger y Jagow. 1987. Este método sirve para resolver proteínas de bajo peso molecular (hasta de 3 kDa). En la figura 18 se muestra una imagen de un gel en el cual se separaron por electroforesis las diferentes fracciones del procedimiento de purificación.

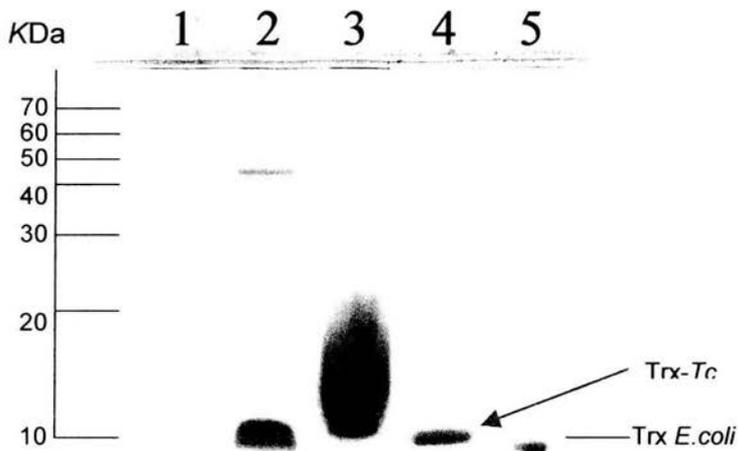


Figura 18. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel 16.5 %. Se muestran los diferentes pasos de purificación de la tiorredoxina del cisticerco de *T. crassiceps*. 1) marcador de peso molecular bajo; 2) 24 μ g del extracto crudo del cisticerco (líquido vesicular y citosol). 3) 24 μ g de la muestra obtenida de la columna de DEAE; 4) 20 μ g de la muestra obtenida de la columna de G-50 y 5) 8 μ g de Trx-*E.coli*. Tinción azul de Coomassie.

Se puede observar el enriquecimiento de la banda de ~ 12 KDa con el proceso de purificación. En el carril correspondiente al último paso de purificación (carril 4) son visibles dos bandas de peso molecular bajo, de las cuales la más intensa es la de ~12 KDa, sugiriendo que esta banda podría ser la tiorredoxina. Se puede apreciar que esta fracción tiene pocos contaminantes en concentración despreciable, comparado con la intensidad de la banda de Trx-*Tc* en el gel.

Para corroborar que esta banda pertenece a una tiorredoxina, se transfirió la proteína de un gel equivalente a una membrana de PVDF, y se tiñó con rojo de Ponceau. La proteína teñida se sometió a la degradación de Edman y se analizó el extremo amino de la proteína en un secuenciador de aminoácidos. El residuo amino terminal de la banda más intensa

resultó estar bloqueado. El extremo amino terminal de la proteína que migra por debajo de la de 12 KDa tiene la secuencia GLKETVEKLFDELDDK y corresponde a una cisteína proteasa del cisticerco de *Taenia crassiceps* registrada en el banco de datos con el número A44681. Sin embargo, se sabe que el peso molecular de la cisteína proteasa es de ~ 44 KDa, lo que sugiere que durante el proceso de purificación está ocurriendo proteólisis, debido a que se encontró solo un fragmento del extremo amino terminal de la proteína, que por su peso no debió encontrarse en esa zona.

La tiorredoxina de diferentes orígenes tiene un sitio activo altamente conservado como se muestra en la figura 19 (rojo). Adicionalmente se sabía que en *Echinococcus granulosus*, que es un cestodo pariente cercano de *T. crassiceps*, hay una secuencia de tiorredoxina registrada en el banco de datos (AAC14584). Esta proteína presenta sólo un triptofano, que está justo antes del sitio activo.

					↓	
					CGPCKS	
<i>T. crassiceps</i>						
Mouse	MVKLIESK	EAFQEALAAA	GDKLVVVDFF	ATWCGPCKMI	38	
<i>E. granulosus</i>	MSVEAVVKQV	DGDALEAAIK	GDKLLVCDFE	ATWCGPCKSL	40	
<i>P. falciparum</i>	MVKIVTSQ	SEFDSIISQN	--ELVIVDFF	AEWCGPCKRI	36	
<i>S. mansoni</i>	MSKLIELKQD	GDLESLEIEQH	KNKLVVVDFF	ATWCGPCKTI	40	
<i>E. coli</i>	MSDKIIHLTD	DSFDTDVLKA	-DGAILVDFF	AEWCGPCKMI	40	
Mouse	KPFHSLCDKY	S-NVVFLEVD	VDDCQVAADC	EVKCMPTFQF	78	
<i>E. granulosus</i>	APKLDAMAKE	NEK-VIFVKL	DVDECQDVAE	KYRV TAMPTL	79	
<i>P. falciparum</i>	APFYEECSKT	YTK-MVFIKV	DVDEVSEVTE	KENITSMPTF	75	
<i>S. mansoni</i>	APLFKELSEK	YD--AIFVKV	DVDKLEETAR	KYNISAMPTF	80	
<i>E. coli</i>	APILDEIADE	YQGKLTVAKL	NIDQNPGTAP	KYGIRGIPTL	80	
Mouse	YKKGQKVGEF	SGANNKEKAL	TSITEYS		105	
<i>E. granulosus</i>	IVFKNGCEIG	HVVGANEAGI	RELIQANA		107	
<i>P. falciparum</i>	KVYKNGSSVD	TLGANDSAL	KQLIETYAA		104	
<i>S. mansoni</i>	IAIKNGEKVG	DVVGASIAKV	EDMIKKFI		106	
<i>E. coli</i>	LLFKNGEVAA	TKVGALSKGQ	LKEFLDANLA		109	

Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las tiorredoxinas de diferentes especies: Tiorredoxina de mouse (NP_035790); *Echinococcus granulosus* (AAC14584); *Plasmodium falciparum* (AAF34541); *Escherichia coli* (P00274) y *Schistosoma mansoni* (Arner, y col., 2002).

Debido a este antecedente se utilizó un reactivo químico llamado Skatole que corta la proteína en los sitios donde hay triptofanos, de tal manera que en el caso de la Trx-Tc deberían obtenerse únicamente dos fragmentos, uno conteniendo el sitio activo.

El análisis del secuenciador de aminoácidos detectó una secuencia CGPCKS, que corresponden a los aminoácidos que integran el sitio activo de las tiorredoxinas de otras especies (figura 19).

Así, hemos purificado una tiorredoxina que presumiblemente pertenece al cisticerco de *T. crassiceps*. Sin embargo, no podemos ignorar reportes que demuestran que en huevos de *Schistosoma mansoni*, puede ser secretada como un mecanismo de defensa (Arger. y col. 2002), también en varias líneas celulares tanto normales como neoplásicas (Rubartelli y col. 1992, y de que existe un mecanismo de internalización de proteínas en el cisticerco Ambrosio. y col (1994), también es posible que sea la tiorredoxina del ratón.

A finales del 2003 en el banco de datos se depositó una secuencia del extremo amino terminal (18 residuos) de la tiorredoxina de *Taenia crassiceps* (AAR16218) reportada por Robles, Y. and Manucharyan, K. (2003). Esta secuencia tiene una identidad de ~ 65 % con los primeros 18 residuos de la tiorredoxina de *Echinococcus granulosus*, y de sólo ~ 6 % con la de ratón. Aunado a esta diferencia en identidad en la figura 19 se puede observar que el aminoácido que sigue del sitio activo es una serina para *Echinococcus granulosus* y para *Taenia crassiceps* en cambio en ratón es una metionina.

Este dato nos indica que el cisticerco tiene el gene que codifica para la tiorredoxina, y que la identidad encontrada entre las tiorredoxinas de *T. crassiceps* y *E. granulosus* comparada con la de ratón nos permite asegurar que la tiorredoxina que hemos identificado en este trabajo pertenece al cisticerco de *Taenia crassiceps*. Descartando que pertenezca al ratón.

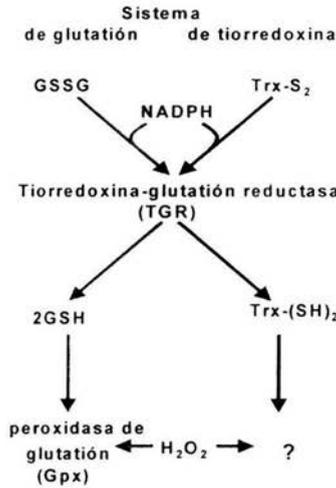


Figura 20. Esquema hipotético de interconexión entre los sistemas del glutatión y de la tiorredoxina en el cisticerco de *Taenia crassiceps*

Como se muestra en la figura 20, en el cisticerco no se ha encontrado la enzima reductasa de glutatión típica, sino una actividad de TGR. Los niveles de glutatión son bajos comparados con el de otros organismos (Meister.1985), lo anterior sugiere que el sistema de glutatión no es el mecanismo principal que depure H_2O_2 . Kanzok. y col. (2000) encontraron que el GSSG puede ser reducido por las tiorredoxinas de *E. coli*, *Plasmodium falciparum* ya que potencial redox del GSSG/2GSH es de -255 y el de la $Trx-(SH)_2/Trx-S_2$ es de -270 mV. En un artículo posterior, Kanzok. y col. (2001) reportaron que en *Drosophila melanogaster* no existe la reductasa del glutatión, y utiliza un sistema de tiorredoxina para la reducción del GSSG. La TGR que encontramos es capaz de utilizar la tiorredoxina y el GSSG con una alta afinidad. Lo que explica porque no logramos encontrar una reductasa del glutatión. Durante el proceso de purificación de la TGR a partir del líquido vesicular y la fracción citosólica (ambas mezcladas) del cisticerco sólo se encontró esta actividad en un sólo pico simétrico. Considerando que el masa molecular de la TrxR y de la GR es de ~ 55 KDa, de haber estado presentes durante la purificación se habría encontrado actividad en otra fracción diferente de la TGR. Este trabajo sugiere que en *Taenia crassiceps* no esta presente la enzima reductasa del glutatión, ni la reductasa de tiorredoxina. Ambas actividades son llevadas a cabo por la TGR identificada por Rendón y col (2004).

Con respecto a la actividad de la peroxidasa del glutatión, no sabemos si esta corresponde a una enzima específica ó una glutaredoxina, como se ha reportado en *Saccharomyces cerevisiae* (Collinson y col. 2002) ó a una actividad asociada a la peroxidasa de tiorredoxina (Hofmann y col. 2002). Será necesario purificar la enzima responsable de la actividad de peroxidasa del glutatión, para conocer su verdadera naturaleza.

Como se puede ver en la figura 20 no sabemos si existe una peroxidasa de tiorredoxina en estos parásitos. En extractos crudos no se ha logrado detectar su actividad enzimática.

En conclusión el sistema de glutatión que se encuentra en el cisticerco de *T. crassiceps* es un sistema con función mixta. Al no haber encontrado una reductasa de glutatión típica y en cambio haber demostrado la existencia de TGR que tiene la capacidad de utilizar tanto a Trx-S₂ como al GSSG con una alta afinidad, Esta enzima parece estar sustituyendo tanto a la reductasa del glutatión como a la reductasa de tiorredoxina.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

1. La concentración de glutatión en el cisticerco de *Taenia crassiceps* se encontró por debajo de 1 mM, tanto por la técnica enzimática como por HPLC. Dicho valor esta dentro del limite inferior del intervalo reportado para otros organismos. La relación de GSH/GSSG esta alrededor de 5:1.
2. En las fracciones subcelulares solubles del cisticerco se identificó una TGR que en los helmintos se ha propuesto que esta remplazando a la reductasa de glutatión y a la reductasa de tiorredoxina.
3. La actividad de la peroxidasa del glutatión se encontró en extractos crudos del cisticerco, pero una actividad de peroxidasa de tiorredoxina no se ha logrado detectar.
4. Se purificó la tiorredoxina del cisticerco de *Taenia crassiceps*. Su identidad fue corroborada por la secuencia de los residuos del sitio activo, que son altamente conservados entre las diferentes especies.
5. Lo anterior sugiere que el cisticerco tiene un sistema mixto de glutatión y de tiorredoxina en donde la TGR es compartida. Este sistema, sería en el que mantiene el balance redox dentro de la célula.

CAPITULO VI. REFERENCIAS

- Agorio, A., y col. 2003. Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **278**: 12920-12928.
- Alger, H., y col. 2002. Molecular y enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Inter.J. Parasitol.* **32**: 1285-1292.
- Alger, H. y Williams. D. 2002. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **121**: 129-139.
- Akerboom, T.P.M., y Sies. H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymology.* **77**: 373-382.
- Ambrosio, J., y col. 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch.Med. Res.* **25**: 325-330.
- Asensi, M., y col. 1994. A high-performance liquid chromatography method for measurement of Oxidized glutathione in biological samples. *Anal. Biochem.* **217**: 323-328.
- Aviles, C., y col. 2003. Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch Microbiol.* **180**: 1-10.
- Batra, S., y col. 1992. Role of reactive oxygen species in expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from rats. *Parasitol.* **106**: 185-192.
- Boveris, A., y col. 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J.* **156**: 435-444.
- Callahan, H.L., Crouch R. K. y James E.R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants?. *Parasitol. Today* **4**: 218-225.
- Carlberg, I., Ph.D. Thesis, Stockholm University, 1981.
- Chalar, C., y col. 1999. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from *Echinococcus granulosus*. *Biochem.Biophysical Research Communications.* **262**: 302-307.
- Cheah, K. S., y Chance. B. 1970. The oxidase systems of *Ascaris*-muscle mitochondria. *Biochem. Biophys Acta.* **223**: 55-60.
- Cheng, C.T. 1987. *General parasitology*. Ed Orlando, Florida. pp 827.

- Coltorti, E., y Varela-Díaz. E. 1972. IgG levels and host specificity in hydatidic cyst fluid. *J. Parasitol.* **58**: 753.
- Coltorti, E., y Varela Díaz E. 1974. *Echinococcus granulosus*: penetration of macromolecules and their localization on the parasite membranes cysts. *Exp. Parasitol.* **35**: 225.
- Collinson, E., y col. 2002. The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* **277**: 16712-16717.
- Das, D.K., y White. C,W. 2002. Redox systems of the cell: Possible links and implications. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **99**: 9617-9618.
- Del Arenal, I.P., y col. 1998. A method for the isolation of tegument syncytium mitochondria from *Taenia crassiceps* cysticerci and partial characterization of their aerobic metabolism. *J. Parasitol.* **84**: 461-468.
- Dickinson, D.A., y Forman. H,J. 2002. Glutathione in defense and signaling lessons from a small thiol. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **973**: 488- 504.
- Engström, N.E., y col. 1974., Isolation and characterization of calf liver thioredoxin., *J. Biol. Chem.* **249**: 205-209.
- Fariss, M.W., y Reed. D,J. 1987. High-performance liquid chromatography of tilos and disulfides: Dinitrophenol derivatives. *Methods Enzimology.* **143**:101-110.
- Fernando, M,R., y col. 1992., Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* **209**: 917-922.
- Freeman, R,S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Canad.J. Zoo.* **40**: 969-990.
- Gasdaska, J,R., y col. 1996., Oxidative inactivation of thioredoxin as a cellular growth factor and protection by a Cys⁷³---->Ser mutation. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1741-1747.
- Giustarini, D., y col. 2003. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Rad.Med.* **35**: 1365-1372.
- Grant, C,M., y col.1998. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **253**. 893-898.
- Griffith, O., y Meister. A. 1985. Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 4668-4672.
- Grill, E., Winnacker. E,L., Zenk MH. 1985. Phytochelatin: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Sci.* **230**:674-676.

- Gromer, S., y col., 1998. Human placenta thioredoxin reductase. *J.Biol.Chem.* **273**: 20096-20101.
- Guevara. A. 2001. "La Actividad de la citocromo c peroxidasa en larvas de *Taenia crassiceps*". Tesis de Licenciatura.
- Hansberg, W.T., 2002. Mensaje Bioquímico. Ed. Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina. UNAM. pp 226.
- Hedrick, J.L., y Smith. A.J. 1968. Size and charge isomer separation and stimation of molecular weigts of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**: 155-164.
- Henkle-Dührsen, K., y Kampkötter. A. 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol.Biochem.Parasitol.* **114**: 129-142.
- Hofmann, B., y col. 2002. Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**:347-64.
- Holmgren. A.,1980. "Pyridine nucleotide: Disulfide oxidoreductases" in dehydrogenases requiring nicotinamide coenzymes; Jeffery, J.; Ed.; Birkhauser Verlag: Basel, pp. 149-180.
- Holmgren, A., y Luthman M. 1982. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Am.Chem.Soc.* **21**: 6628-6633.
- Holmgren, A. 1977. Bovine thioredoxin system. *J.Biol.Chem.* **252**: 4600-4606.
- Hunziker, P.E., y col. 1980. Peptide fragmentation suitable for solid-phase microsequencing. *Biochem. J.* **187**: 515-519.
- Hustead, S., y Williams. J. 1977. Permeability studies on taeniid metacestode. I. Uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaeformis*, *Taenia crassiceps* and *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* **63**: 314.
- Hwang, C., y col. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Sci.* **257**: 1496-1502.
- Kanzok, S., y col. 2000. The Thioredoxin system of the Malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J.Biol.Chem.* **275**: 40180- 40186.
- Kanzok, S., y col. 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Sci.* **291**: 643-636.
- Kanzok, S., y col. 2002. Thioredoxin, thioredoxin reductase, and thioredoxin peroxidase of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Enzymol.* **347**: 370-381.
- Kaplan, J.C. 1969. Erythrocyte diaphorases and glutathione reductase. *Espos. Annus. Biochim. Med.* **29**: 77-99.

- Kwatia, M., y col. 2000. Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin preoxidase. *J. Parasitol.* **86**: 908-915.
- Lowry, C., y col. 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Luthman, M., y Holmgren, A. 1982. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Am.Chem.Soc.* **21**: 6628-6633.
- Maizels, R., Y col. 1989. Filarial surface antigens: the major 29 kilodanton glycoprotein and a novel 17-200 kilodalton complex from adult *Brugia malayi* parasites. *Mol.Biochem.Parasitol.* **32**: 213-227.
- Marwell, M.A., y col. 1981. Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods in Enzimology.* **72**:296-303.
- Matés, J.M., y Sánchez, J.F. 1999., Antioxidants enzymes and their implications in pathophysiology proceses., *Fron.Biosci.* **4**: 339-245.
- McCallum, M.J., y Barrett, J. 1995. The purification and properties of glutathione redactase from the cestode *Moniezia expansa*. *Inter.J.Biochem.Cell Biol.* **27**: 393-401.
- Mei, H., y LoVerde, P. 1995. *Schistosoma mansoni*: cloning the gene encoding glutathione peroxidase. *Exp. Parasitol.* **80**: 319-322.
- Meister, A. 1988. Glutathione. In the liver: biology and pathobiology, segunda edición. Raven Press, New York. pp 401-417.
- Meister, A. 1995. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* **251**: 3-7.
- Meredith, M., y Reed, D. 1982. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J. Biol Chem.* 1982 Apr 10;257(7):3747-53.
- Metzler, D.E. 2001. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. Vol.1. Segunda Edición. Harcord/Academic press. Florida. U.S.A.
- Muller, E.G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol.Biol.Cell.* **7**:1805-13.
- Mustacich, D., y Powis, G., 2000. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* **346**: 1-8.
- Nakamura, H., y col.1997. Redox regulation of cellular activation. *Annu.Rev.Inmmunol.* **15**: 351-369.
- Nare, B., y col. 1990. *Schistosoma mansoni*: Level of Antioxidants and resistance to oxidants increase during development. *Exp. Parasitol.* **70**: 389-397.

- Nordberg, J., y Arnér. E.S. 2001. Reactive oxygen species, Antioxinants, y and the mammalian thiredoxin system. *Free Rad.Biol.Med.* **31**: 1287-1312.
- Okpodu, C., y Waite, K. 1997. Method for detecting glutathione reductase activity on native activity gels which eliminates the background diaphorase activity. *Anal.Biochem.* **244**: 410-113.
- Ou, Xiu., y col. 1995. *Brugia malayi*: Differential susceptibility to and metabolism of hydrogen peroxide in adults and microfilariae. *Exp. Parasitol.* **80**: 530-540.
- Paglia, D.A. y Valentine, W.N., 1976. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J.Lab.Clin.Med.* **70**: 158-169.
- Paul, J.M., y Barret, J. 1980. Peroxide metabolism in the cestodes *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. *Inter.J.Parasitol.***10**:121-124.
- Powis, G., y Montfort, W., 2001., Properties and biological activities of thioredoxins.,*Ann. Rev.Pharmacol. Toxic.* **41**: 261-295.
- Radi, R., y col. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **266**: 22028-22034.
- Rendón, J.L., y col. 2004. Purificación, caracterización and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol.Biochem.Parasitol.***133**: 61-69.
- Richman, P.G., y Meister, A. 1975. Regulation of γ - Glutamyl-Cysteine Synthetase by Nonallosteric Feedback inhibition by glutathione. *J.Biol.Chem.***250**: 1422-1426.
- Rubartelli, A., y col. 1992. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J.Biol.Chem.* **267**: 24161-24164.
- Rubio, M. E., 1997. "Estudio del metabolismo de radicales libres de *Taenia crassiceps*" Tesis de Licenciatura.
- Salinas, G., y col. 1998. *Echinococcus granulosus*: Cloning of a thioredoxin preoxidase. *Exp.Pasitol.* **90**: 298-301.
- Shägger, H., y Jagow, G., 1987., Tricine-sodium Dodecyl –sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 a 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
- Skulachev, V.P. 1996. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quart.Rev.Biophys.* **29**: 169-202.

Smyth, J.D., y McManus, D.P. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Ed. Cambridge University. New York. Pp 386.

Sun, Qi-An., y col. 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 3673-3678.

Sztajnar, H., y col. 2001. The putative Glutathione Peroxidase Gen of *Plasmodium falciparum* Codes for a Thioredoxin preoxidase. *J.Biol.Chem.* **276**: 7397-7403.

Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* **27**:502-22.

Turnes, J.F., y Boveris, A. 1980. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.***191**: 421-427.

Whitfield, P.J. 1982. *Parasitic helminths en Modern Parasitology*. Black Well Sci Publications. Ox. London.

Williams, C.H., jr. "Flavin-Containing dehydrogenases" in *the enzymes*; Boyer, P.D.; Ed.; Academic Press: New York, 1976: Vol. 13, pp. 89-173.

Worthington, D.J., Rosemeyer, M.A.1976. Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *Europea J. Biochem.***67**: 231-8.

Wood, Z.A., y col., 2003., Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins., *TRENS in Biochem. Sci.*. **28**: 32-40.

Ye, B., Gitler, C., y Gressel, J. 1997. A high-sensitivity, Single-gel, polyacrylamide gel electrophoresis method for the quantitative determination of glutathione reductases. *Anal. Biochem.* **246**: 159-165.

Zhong, L., y col. 2000. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad.Sci.* **97**: 5854-5859.