



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Clonación y Caracterización de una
2-Cys Peroxirredoxina de *Taenia solium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGICAS)**

PRESENTA
JOSE MOLINA LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: **DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA**

MEXICO, D. F.

ABRIL 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 16 de enero del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **MOLINA LÓPEZ JOSÉ** con número de cuenta **76278352** y número de expediente **56708**, con la tesis titulada: "Clonación y Caracterización de una 2-Cys Peroxirredoxina de *Taenia solium*", bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

Presidente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal:	Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Vocal:	Dr. Rafael S. Saavedra Durán
Vocal:	Dr. Víctor Valdez López
Secretario:	Dr. Abraham Landa Piedra
Suplente:	Dr. Juan Luis Rendón Gómez
Suplente:	Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de marzo del 2006.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este trabajo de tesis doctoral se debió en parte al apoyo económico (beca) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (contrato 43806-M), y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (PAPIIT-UNAM contrato IN210603).

Los autores declaran que los experimentos realizados en este trabajo cumplen con las leyes y reglamentos éticos y actuales de la Universidad Nacional Autónoma de México.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Presidente:

Vocal: **Dr. Gonzalo Castillo Rojas**

Vocal: **Dr. Rafael S. Saavedra Durán**

Vocal: **Dr. Víctor Valdés López**

Secretario: **Dr. Abraham Landa Piedra**

Suplente: **Dr. Juan Luis Rendón Gómez**

Suplente: **Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández**

RECONOCIMIENTOS

A Graciela y Citlalli que consciente o inconscientemente me apoyaron en todo momento para finalizar esta etapa de mi vida académica.

Deseo hacer un especial reconocimiento al Dr. Abraham Landa por su gran e incondicional asesoría ofrecida para desarrollar y concluir este trabajo.

Agradezco la valiosa asesoría técnica de la Bióloga Alicia Ochoa Sánchez y por todo el apoyo brindado para la culminación del trabajo experimental de este proyecto.

CONTENIDO

Contenido	i
Índice de figuras y cuadros	i
Resumen	15
Abstract	16
Lista de abreviaturas	58

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades producidas por <i>Taenia solium</i>	1
1.2. Especies reactivas del oxígeno	3
1.3. Sistemas anti-oxidantes no enzimáticos	7
1.4. Sistemas anti-oxidantes enzimáticos	8
1.5. Superóxido dismutasa	9
1.6. Catalasa y glutatión peroxidasa	10
1.7. Glutatión S-transferasa	11
1.8. Sistema glutatión	12
1.9. Sistema tiorredoxina	13

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Helmintos y especies reactivas de oxígeno	14
1.2.2. Peroxirredoxinas	16

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.2.1. Justificación	22
2.2.2. Hipótesis	23
2.2.3. Objetivos	23

CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico	24
3.2. Preparación del fragmento del ácido ribonucleico para la 2-CysPrxTs	25
3.3. Construcción de la biblioteca de DNA complementario y aislamiento de la clona	27
3.4. Marcaje de la sonda de DNA con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	28
3.5. Tamizaje y aislamiento de clonas positivas	29
3.6. Análisis tipo Southern y northern	31
3.7. Producción y purificación de la 2-CysPrxTs recombinante ..	32
3.8. Actividad enzimática de la 2-CysPrxTs	33
3.9. Producción de anticuerpos contra la 2-CysPrxTs	34
3.10. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes e inmunoelectrotransferencia	34

3.11. Inmunofluorescencia indirecta	35
3.12. Ensayo de tolerancia al peróxido de hidrógeno	36

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y caracterización del DNAC de la 2-CysPrxTs ...	37
4.2. Purificación y caracterización de la 2-CysPrxTs	40
4.3. Actividad anti-oxidante de la 2-CysPrxTs	42
4.4. Mecanismo de oxidación reducción de la 2-CysPrxTs	43
4.5. Expresión y localización de 2-CysPrxTs en el cisticerco de <i>T. solium</i>	45
4.6. Efecto del H ₂ O ₂ sobre el cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	48

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

5.1. Discusión	49
----------------------	----

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

6.1. Conclusiones	52
-------------------------	----

CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS

7.1. Perspectivas	52
-------------------------	----

REFERENCIAS	54
--------------------------	-----------

APÉNDICE	75
CAPÍTULO 8. ARTÍCULO PUBLICADO	76

RESUMEN

En este trabajo se aisló una clona que codifica para la enzima 2-Cys peroxirredoxina de *Taenia solium* (2-CysPrxTs) de una biblioteca de DNAC de la forma parasitaria del adulto de *T. solium* construida en el vector λ ZAP. La clona codifica un polipéptido formado por 197 aminoácidos con un peso molecular de 21,836 Da, que presenta los 2 dominios clásicos de las 2-Cys peroxirredoxinas. Su secuencia primaria de aminoácidos es 90 % idéntica a las secuencias de las 2-Cys peroxirredoxinas del género *Echinococcus*. Ensayos de tipo Southern y northern, exhibieron un RNAm de un tamaño aproximado de 1.0 kb, codificado por un gen de copia única. La 2-CysPrxTs fue expresada en *Escherichia coli* y purificada por cromatografía de intercambio iónico. El análisis bioquímico mostró que la enzima es un homodímero compuesto por monómeros de aproximadamente 22 kDa que presenta actividad con H_2O_2 y con hidroperóxido cumeno. La enzima realiza el mecanismo catalítico de las 2-CysPrxs típicas, ya que el homodímero (forma oxidada) es transformado a su forma monomérica (forma reducida) por la tiorredoxina y por ditiotreitól, y reconvertida a la forma homodimérica oxidada por el H_2O_2 . Los análisis de inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos contra 2-CysPrxTs revelaron que la proteína es expresada durante todo el ciclo de vida de *T. solium*, así como en otras *Taenias*. Los estudios inmunohistoquímicos indicaron que 2-CysPrxTs esta localizada en el tegumento, en los cytones tegumentarios y células musculares del cisticerco. Por otro lado, también se demostró que el cisticerco de *T. crassiceps* puede tolerar concentraciones de H_2O_2 hasta de 0.25 mM durante 2.5 hr.

ABSTRACT

A *Taenia solium* 2-Cys peroxiredoxin (Ts-2CysPrx) clone was isolated from a *T. solium* adult cDNA library. The clone encodes a polypeptide comprising 197 amino acids with a predictive Mr of 21,836 Da. It has 2 classical cysteine domains from the typical 2-Cys peroxiredoxins and its primary amino acid sequence shows higher identity with *Echinococcus* 2-Cys peroxiredoxins. Northern and Southern blot hybridizations exhibit an mRNA with a size of 1.0 kb, encoded by 1 gene. Ts-2CysPrx was expressed in *Escherichia coli* and purified by anion-exchange chromatography. Biochemical analysis showed Ts-2CysPrx is a dimer composed by monomers of 22 kDa that presented activity with H₂O₂ and cumene hydroperoxide. It presented the catalytic mechanism for a typical Ts-2CysPrx, since the homodimeric oxidized form by Trx and DTT, and was converted to a homodimeric oxidized form by H₂O₂. Western blot studies using antibodies against Ts-2CysPrx revealed that the protein is expressed during the entire *T. solium* life cycle, as in other *Taenia* species. Immunohistochemical studies indicated that Ts-2CysPrx is localized on the tegument, and in tegumentary and muscle cells of cysticerci. Also we show that *T. crassiceps* can tolerate H₂O₂ levels of 0.25 mM for 2.5 hr.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades producidas por *Taenia solium*

La teniosis en humanos es la infección producida por los céstodos adultos de la familia *Taenidaeae*; *Taenia saginata* (*T. saginata*) y *Taenia solium* (*T. solium*), ambos endémicos en México (Flisser A., 1988). Los ciclos de vida de *T. solium* y *T. saginata* son semejantes en muchos aspectos; el humano es el hospedero definitivo obligado y los hospederos intermediarios son el cerdo y la res, respectivamente.

La teniosis se adquiere por la ingestión de carne de ganado bovino cruda o mal cocida e infectada con cisticercos (*T. saginata*) o por la ingestión de carne de cerdo con cisticercos (*T. solium*). Las manifestaciones clínicas de la teniosis son variables, si es que se presentan, y pueden incluir nerviosismo, insomnio, anorexia, pérdida de peso, dolores abdominales y trastornos digestivos. Además, la teniosis por *T. saginata*, se caracteriza por la sensación particular que produce el movimiento espontáneo de los proglótidos al pasar por las márgenes del ano en el momento de su eliminación (Hoberg EP., 2002). La teniosis suele ser una infección no mortal sin embargo, los humanos portadores del estadio adulto de *T. solium* son el foco de infección para la cisticercosis. Los huevos aparecen en las heces de los individuos infectados entre ocho a 12 semanas después de la infección con *T.*

solium, y de 10 a 14 semanas después de la infección con *T. saginata* (Yoshino K., 1933).

Para el diagnóstico de la teniosis se ha recurrido a diferentes métodos, uno de los cuales es el ensayo inmunoenzimático (ELISA) que sirve para la detección de coproantígenos (Allan JC *et al.*, 1989); la desventaja de este método de diagnóstico es que no distingue entre las especies de *Taenia* y resulta demasiado caro y difícil de aplicar en estudios epidemiológicos de campo. Otro recurso para la identificación de la especie se efectúa mediante el análisis morfológico de proglótidos grávidos y escólecex, *T. solium* se distingue de *T. saginata* porque tiene una doble corona de ganchos en el escólex, mientras que *T. saginata* carece de ella y sólo se encuentra adherida a la pared intestinal únicamente por las ventosas. De igual forma, los proglótidos maduros pueden ser de utilidad para diferenciar a las especies de *Taenias*, pues *T. saginata* presenta entre 11 y 19 ramas uterinas, y *T. solium* tiene entre 7 y 12 ramas uterinas (Hoberg EP., 2002), sin embargo los huevos no sirven para distinguir una especie de *Taenia* de la otra (WHO, 1983).

Cuando la persona ingiere huevos de *T. solium*, estos eclosionan en el intestino y las oncosferas migran a los tejidos subcutáneos, músculo estriado, otros tejidos y órganos vitales, en donde se desarrollan a cisticerco, causando la cisticercosis (Cañedo L *et al.*, 1986). Las manifestaciones causadas por la cisticercosis son graves si las larvas se localizan en los ojos, en el sistema nervioso central o en el corazón (Flisser A *et al.* 1986). En el caso de la neurocisticercosis, las convulsiones

epileptiformes, los signos de hipertensión intracraneal o algunas perturbaciones psiquiátricas sugieren firmemente la afección cerebral (Takayanagui OM *et al.*, 1990).

La prevalencia de la cisticercosis es más alta en diversas zonas geográficas de América Latina, África y Asia (Díaz JF *et al.*, 1992, Preux PM *et al.*, 1996, Yang SY *et al.*, 1990, Kong Y *et al.*, 1993). Los signos y síntomas de la cisticercosis pueden aparecer en cuestión de días o hasta 10 años después de la infección. En México el número de casos nuevos de teniosis durante el año 2002 fue de 595, teniendo Chiapas la entidad federativa con mayor número (83 casos), seguida por el Estado de México con 72 casos. Con respecto a la frecuencia de cisticercosis en nuestro país tuvimos 617 nuevos casos en el año 2002, teniendo el Estado de Puebla el primer lugar en frecuencia con 113 casos y en segundo lugar el Estado de Jalisco con 96 casos (Secretaría de Salud. Boletín de Epidemiología, México 2002, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica México 2003). Sin embargo no se conocen los datos reales de la frecuencia o prevalencia de la teniosis y cisticercosis en México.

1.2. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son intermediarios del oxígeno, formadas por todos los organismos aerobios, que en concentraciones fisiológicas ayudan al funcionamiento normal de las células, pero en cantidades excesivas dan lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo. La producción intracelular excesiva de esos intermediarios del oxígeno dañan la integridad de varias biomoléculas

incluyendo proteínas, lípidos y DNA (Stadman ER *et al.*, 2000, Marnett LJ *et al.*, 2000), ver figura 1.

También se ha propuesto que el estrés oxidativo está involucrado en el proceso de envejecimiento y muerte celular (necrótica o apoptótica) ya sea induciendo daño al DNA mitocondrial o por otros mecanismos no muy bien definidos (Finkel T *et al.*, 2003). La resistencia aberrante a la apoptosis da lugar al desarrollo de neoplasias y a la muerte celular por necrosis, que contribuyen por un lado a un fallo agudo de órganos vitales y a enfermedades crónicas por el otro. Los mecanismos reguladores de los procesos necróticos y apoptóticos dependen directamente de la permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM). En la muerte celular se distinguen tres fases de la PMM: iniciación, decisión y degradación. Durante la primera fase (iniciación) las células acumulan moléculas efectoras tirocinas cinasas, tirocinas fosfatasas, calcio intracelular, caspasas e inositol trifosfato, las cuales actúan directamente en la mitocondria para causar la PMM, la naturaleza de esos efectores depende los estímulos inductores de muerte, implicando una gran diversidad de mecanismos (Kroemer G *et al.*, 2000).

Durante la segunda fase (decisión), la PMM ocurre a través de un número limitado de mecanismos que conducen a la muerte de la célula. Finalmente, durante la tercera fase (degradación), las consecuencias metabólicas de la PMM así como la degradación de proteínas mitocondriales, determinan las características catabólicas de la muerte celular, con la subsiguiente pérdida de las

funciones vitales de la célula y/o activación de proteasas y nucleasas celulares (Kroemer G *et al.*, 2000).

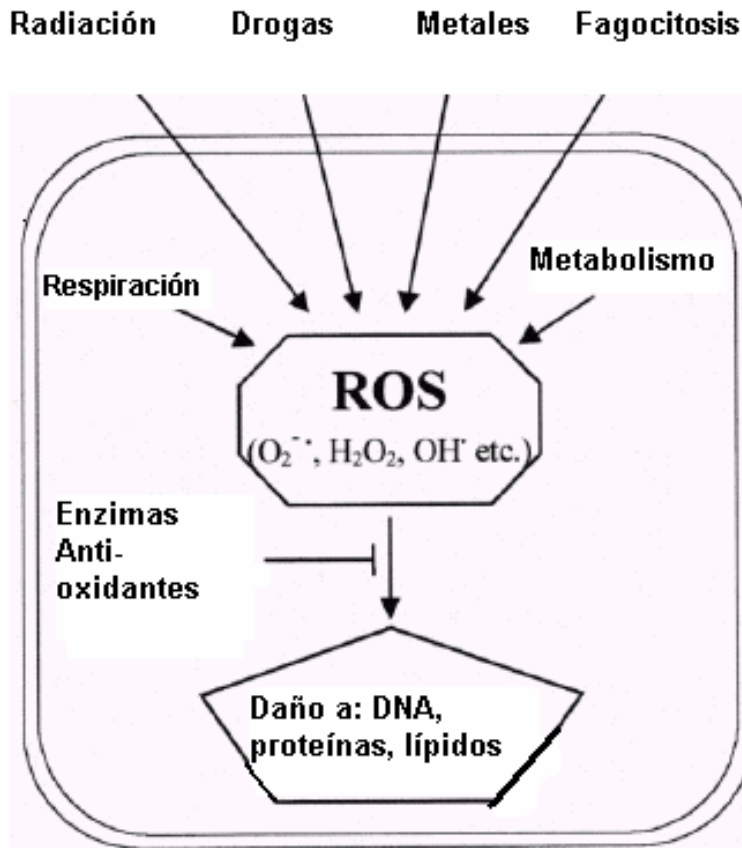


Figura 1. Presentación esquemática y simplificada de los procesos que conducen a la formación de las moléculas ROS, daño asociado a ellas y los sistemas enzimáticos de defensa. (Henkle-Duhrsen K *et al.*, 2001).

Las ROS incluyen varias moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno (Fridovich I, 1999, Halliwell B, 1999). Algunas de esas moléculas son extremadamente reactivas, como el radical hidroxilo (OH[•]), mientras otras son menos reactivas como el anión superóxido (O^{•-}) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Las moléculas ROS pueden reaccionar rápidamente con la mayoría de las biomoléculas, iniciando una reacción en cadena para generar radicales libres (que se definen como electrones no apareados unidos a moléculas de bajo peso molecular). Esta reacción en cadena se termina cuando un radical libre recién formado reacciona con otro radical libre, para eliminar los electrones no apareados o bien reacciona con una enzima anti-oxidante. En la tabla 1 se enlistan las formas intracelulares más comunes de las moléculas ROS con su principal fuente celular de producción y el sistema anti-oxidante para la eliminación de las mismas.

TABLA 1. PRINCIPALES MOLÉCULAS ROS, SU METABOLISMO Y SUS PRODUCTOS FINALES.

Molécula ROS	Origen Principal	Sistema de Defensa Enzimático	Productos
Anión superóxido (O ^{•-})	Liberación de electrones de la cadena de transporte de electrones Fagocitos activados Xantina oxidasa	Superóxido dismutasa (SOD) Superóxido reductasa (en bacterias)	H ₂ O ₂ + O ₂ H ₂ O ₂
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Superóxido dismutasa (SOD) NADPH oxidasa (neutrófilos) Glucosa oxidasa	Glutación peroxidasa Catalasas Peroxirredoxinas	H ₂ O + GSSG H ₂ O + O ₂ H ₂ O
Radical hidroxilo (OH)	De O ^{•-} y H ₂ O ₂ vía reacción con metales de transición (Fe o Cu)		
Óxido nítrico (NO)	Óxido nítrico sintasa	Glutación Trx reductasa	GSNO

1.3. Sistemas anti-oxidantes no enzimáticos

Todos los organismos aerobios presentan sistemas anti-oxidantes que limitan el daño causado por las especies reactivas del oxígeno. Los sistemas anti-oxidantes se dividen en dos grandes grupos, enzimático y no enzimático. Dentro de los no enzimáticos se encuentran un gran número de compuestos de bajo peso molecular que incluye las vitamina C, E, y diferentes compuestos que contienen selenio, ácido lipoico y ubiquinonas (Nordberg J *et al.*, 2001). El ascorbato (vitamina C) es una vitamina hidro-soluble y es el principal agente anti-oxidante extracelular (en el plasma humano) e intracelular (May JM, 1999). Esta vitamina sirve para prevenir la formación de hidroperóxidos lipídicos en las lipoproteínas del plasma (por ejemplo en lipoproteínas de baja densidad), reduciendo la cantidad de α -tocoferoles formados al reaccionar con radicales peroxil lipídicos (Sies H, 1993). El ascorbato también protege por este mecanismo a los lípidos de la membrana celular. Intracelularmente, el ascorbato y el GSH actúan en conjunto para proteger a la célula del daño oxidativo (Meister A, 1994). El reciclamiento del ascorbato en células humanas se lleva a cabo por varios mecanismos y esto se ha estudiado en los eritrocitos (May JM, 1999). El principal reductor del ácido dihidroascórbico (DHA) es el glutatión, incluso aunque esté disminuido el glutatión en los eritrocitos, todavía son capaces de reciclar el ascorbato (Mendiratta S *et al.*, 1998). En el estrés oxidativo, en donde se encuentra disminuida la concentración de GSH, surgen otros mecanismos alternativos para reducir el DHA (May JM, 1999).

A pesar del papel tan importante que tienen estos sistemas de defensa no enzimáticos, se les ha puesto poca atención. Las proteínas que contribuyen a este

modo de defensa operan secuestrando metales de transición, los cuales de otra forma catalizarían la generación de radicales libres. Aunque no se ha descrito ninguna proteína en microfilarias que pueda colocarse en esta categoría, es sorprendente que la mayoría de las microfilarias están cubiertas con albúmina, una proteína anti-oxidante que atrapa iones de cobre y se encarga de eliminar ácidos hipoalosos. En líquidos extracelulares, la albúmina y ceruloplasmina quelan cobre, mientras que la transferrina, lactoferrina y ferritina atrapan hierro, inhibiendo la capacidad de esos iones metálicos para promover la peroxidación de lípidos (Haliwell B, 1989).

1.4. Sistemas de defensa enzimáticos en helmintos

Los sistema de defensa enzimático incluye entre los miembros mas importantes a las superóxido dismutasas (SOD), catalasas (Cat), peroxirredoxinas (Prxs) y glutatión peroxidadasas (GPXs). Las enzimas anti-oxidantes son esenciales para que los parásitos nemátodos se defiendan de las moléculas ROS generadas por células de la respuesta inmune celular como; macrófagos, neutrófilos y eosinófilos del hospedero (Callahan HL *et al.*, 1988, Brophy PM *et al.*, 1992). Esas enzimas son importantes en parásitos de larga vida, que están involucrados en infecciones crónicas, como las causadas por nemátodos. La familia de enzimas SOD ha sido extensamente estudiada en nemátodos (Selkirk ME *et al.*, 1998) ver figura 2.

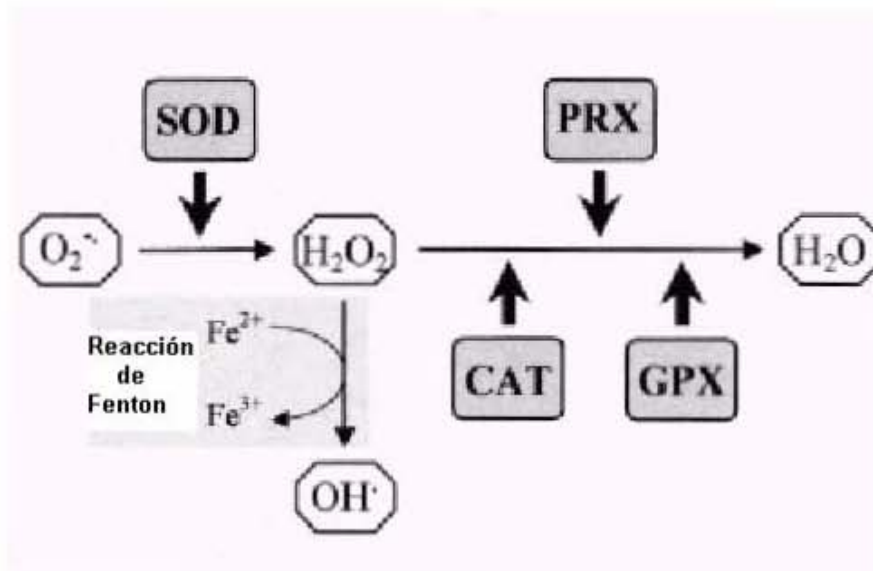


Figura 2. Enzimas anti-oxidantes involucradas en la defensa contra las especies reactivas del oxígeno (Henkle-Duhrsen K *et al.*, 2001).

1.5. Superóxido dismutasa (SOD)

Las SODs son un grupo de metaloenzimas esenciales para defender a los organismos contra la oxidación producida por el anión superóxido. Hasta ahora se han detectado en helmintos tres tipos de estas enzimas SODs: una es de localización mitocondrial que utiliza como cofactor al manganeso (Mn-SOD), otras dos que utilizan como cofactor al Cu/Zn (una es citosólica, Cu/Zn-SOD) y la otra es de localización extracelular (Cu/Zn-SOD). La enzima Mn-SOD es una proteína tetramérica con subunidades de 22 kDa, la Cu/Zn-SOD citosólica es una proteína dimerica con un peso molecular de 16 kDa por subunidad, mientras que la forma extracelular es una glucoproteína tetramérica compuesta de cuatro subunidades de 30 kDa cada una y con una alta afinidad por heparina (Henkle-Durshen K *et al.*, 2001). Los organismos que carecen de esas enzimas exhiben una gran variedad

de alteraciones como: velocidad de desarrollo retardado, un período de vida corto, una hipersensibilidad hacia los compuestos redox y un aumento de la mutagénesis espontánea, así como altas tasas de muerte (Fridovich I, 1998). La actividad de SOD se ha encontrado en todos los nemátodos en donde se ha buscado y esa caracterización ha hecho posible que se conozca la secuencia de nucleótidos que codifican para la enzima. En el caso de *T. solium*, debe neutralizar el anión superóxido exógeno y endógeno producido por sus propios procesos metabólicos y el producido por el hospedero, debido a que en sus etapas de larva y adulto vive en contacto íntimo con la respuesta inflamatoria del hospedero. Actualmente ya están clonadas, expresadas y caracterizadas las enzimas Cu/Zn-SOD de helmintos como: *Onchoserca volvulus* (*O. volvulus*), *Schistosoma . mansoni* (*S. mansoni*), *Fasiola hepática* (*F. hepatica*) y de *Taenia solium* (*T. solium*) (Henkle-Durshen K et al., 1994, Kim H et al., 2000, Castellanos-González et al., 2002).

1.6. Catalasa y Glutación peroxidasa (GPx)

Las enzimas catalasa y glutación peroxidasa (GPx) tienen actividad de peroxidasa, por lo que se encargan de disminuir los niveles de H_2O_2 en la célula. La enzima catalasa protege a la célula de los efectos tóxicos del H_2O_2 al catalizar su descomposición en O_2 y H_2O . Las catalasas son enzimas homotetraméricas en las que cada monómero contiene un grupo Fe (III) en su centro catalítico y NADPH o un dominio de tipo flavodoxina, cuya función es la de prevenir la acumulación de una forma inactiva de Fe (IV) de la enzima (Kirkman HN et al., 1987). Estas enzimas se caracterizan por tener una baja afinidad por el sustrato pero una eficiencia catalítica muy elevada; por este motivo, dichas enzimas son excelentes

reductoras de H_2O_2 en ambientes en los que la concentración de este oxidante es muy elevada, como por ejemplo, en los peroxisomas de las células eucariontes. Las glutatión peroxidasas son enzimas que utilizan un residuo de cisteína para reducir H_2O_2 . Las GPxs son consideradas las peroxidasas más importantes ya que tienen una amplia especificidad de sustrato y una mayor afinidad por H_2O_2 que la enzima catalasa. Dos de los principales tipos de GPx caracterizados en la célula son las GPx clásicas (cGPx) y la GPx específica de peróxidos de la membrana lipídica (PHGPx). La cGPx es multimérica (normalmente tetramérica) y soluble, mientras que PHGPx es monomérica y se encuentra asociada a la membrana (Ursini F *et al.*, 1995). La cGPx utiliza el sistema del glutatión como agente reductor mientras que la reducción de PHGPx parece estar acoplada al sistema de la tiorredoxina (Brigelius-Flohé R, 1999; Delaunay A *et al.*, 2002). PHGPx es considerada la que aporta la principal actividad enzimática para reparar la peroxidación de los lípidos de membrana (Halliwell B, 1999).

1.7. Glutatión S-transferasa

Las Glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas altamente conservadas e implicadas en la detoxificación de varios compuestos xenobióticos. Estas enzimas catalizan la conjugación del glutatión (GSH) a sustratos electrofílicos, generando compuestos menos reactivos y más solubles que son fácilmente eliminados de la célula a través de transportadores de membrana específicos, como la bomba del glutatión. El amplio rango de sustratos de la enzima GST permite proteger a la célula de una gran variedad de compuestos tóxicos (Salinas AE *et al.*, 1999). Existen dos tipos principales de GST, las GSTs solubles o citosólicas y las GSTs

microsomales o asociadas a la membrana del retículo endoplásmico. Las GSTs citosólicas son enzimas diméricas clasificadas en diferentes familias en relación a la secuencia primaria, y a la especificidad de sustrato e inhibidores (Rowe JD *et al.*, 1998). Las GSTs microsomales son enzimas triméricas que parecen haber evolucionado de forma independiente a las GSTs solubles (Hayes JD *et al.*, 2000). Además de su función en detoxificación, varios estudios han correlacionado niveles altos de GST con una resistencia aumentada al estrés oxidativo (Zimniak L *et al.*, 1997). Una de las teorías es que las GSTs pueden detoxificar algunos de los compuestos secundarios producidos por las moléculas ROS, cuando éstas reaccionan con los componentes celulares; por ejemplo, las GSTs pueden conjugarse a GSH a compuestos reactivos como 4-hidroxinonanal generados durante la oxidación de las membranas (Danielson UH *et al.*, 1987). También se ha observado que algunas GSTs tienen actividad de glutatión peroxidasa, lo que parece indicar que son muy importantes para la eliminación de peróxidos (Sherratt PJ *et al.*, 1997, Zhao T *et al.*, 1999).

1.8. Sistema glutatión

El glutatión (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina), es un tripéptido que contiene un grupo tiol (-SH) y presenta una actividad no-enzimática implicada en la defensa celular antioxidante. Este tripéptido, muy abundante en la célula, se puede encontrar en forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG); en condiciones normales la relación glutatión reducido/glutatión oxidado intracelular es muy elevada, lo que permite mantener el citosol en un estado reducido. La forma oxidada del glutatión (GSSG) se genera al oxidarse el grupo tiol (R-SH) del residuo de cisteína y formar un

puede ser reducido por un puente disulfuro con otra molécula de GSH. La oxidación se revierte gracias a la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) que reduce el GSSG a GSH utilizando al NADPH como donador de electrones (Carmel-Harel O *et al.*, 2001). El sistema del glutatión es importante para la eliminación de peróxidos y para mantener reducidos los grupos tioles (R-SH) de muchas proteínas; además, el sistema glutatión participa de forma indirecta en la eliminación de peróxidos al actuar como cofactor de actividades enzimáticas. Este tripéptido también participa de forma directa en la reducción de puentes disulfuro de ciertas proteínas, así como de forma indirecta al actuar como agente reductor de la enzima glutarredoxina (Grx), enzima presente en los helmintos (Carmel-Harel O *et al.*, 2001). El glutatión también puede conjugarse con sustratos electrofílicos por medio de la GST, formando compuestos que generalmente son menos reactivos y más solubles.

1.9. Sistema tiorredoxina

El sistema de la tiorredoxina está formado por tiorredoxina (Trx), tiorredoxina reductasa (TrxR) y NADPH. La Trx es una proteína pequeña rica en residuos de cisteína que contiene un sitio activo muy conservado (-Cys-Gly-Pro-Cys-) esencial para su función. La Trx contiene dos grupos -SH que pueden oxidarse formando un puente disulfuro, que posteriormente es reducido por la enzima TrxR al utilizar el NADPH como fuente de equivalentes reductores. El sistema de la tiorredoxina reduce directamente puentes disulfuro de varias proteínas, y de forma indirecta,

está implicado en la detoxificación de peróxidos sirviendo como donador de electrones para enzimas como las peroxirredoxinas.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Helmintos y especies reactivas del oxígeno

Dentro de los compartimentos intracelulares, como extracelulares, existen varios compuestos como las enzimas del metabolismo anti-oxidante, que son capaces de eliminar las moléculas oxidantes, entre esos compuestos se encuentran varias enzimas que tienen la capacidad de aceptar radicales libres y de esa forma proteger a la célula del daño originado por las moléculas ROS. Entre los helmintos, *Trichinella spiralis* es la que ha recibido mayor atención en términos de sus enzimas anti-oxidantes y por los ensayos de toxicidad *in vitro* que se han realizado en ese parásito. El gusano adulto y la larva en etapa muscular (LEM) son más resistentes a la citotoxicidad mediada por células que la larva recién nacida (LRN) (Kazura JW *et al.*, 1980). La mieloperoxidasa del neutrófilo y la peroxidasa del eosinófilo en presencia de H₂O₂ (Kazura JW *et al.*, 1981) y de iones cloruro pueden matar a la NBL en un sistema *in vitro*, a través de la formación de ácido hipocloroso (Buys J *et al.*, 1984).

Por otro lado, los niveles de H₂O₂ generados por el sistema glucosa-glucosa oxidasa o por oxidantes producidos por el sistema acetaldehído-xantina oxidasa fueron suficientes para matar a más del 80% de las LRN, mientras que menos del 10% de los gusanos adultos o de las LEM fueron destruidos. Asimismo, en estudios realizados por Bass y cols. en donde usaron enzimas anti-oxidantes con la finalidad de evitar la muerte de *T. spiralis* cuando es expuesta a H₂O₂, encontraron que SOD no evitó la muerte de la NBL de dicho parásito expuesto a

H₂O₂ o al anión superóxido. Se ha sugerido que la muerte de las NBL por los compuestos oxidantes, se debió a la ausencia de enzimas endógenas anti-oxidantes en esas larvas. Las NBL tienen de 3 a 5 veces menos SOD que el gusano adulto o que las MSL, y de 5-10 veces menos glutatión peroxidasa, mientras que la concentración de catalasa es baja en todas sus etapas de desarrollo (Bass DA *et al.*, 1979).

Diferentes estudios en donde utilizan sistemas generadores ROS, han indicado que el H₂O₂ es la molécula mas tóxica de todas las ROS para microfilarias de *Onchocerca cervicalis* (Callahan HL *et al.*, 1990) y *Dilofilaria immitis* (Rzepczyk C *et al.*, 1984) incluso a concentraciones tan bajas como de 1 µM y 5 µM respectivamente que son los rangos fisiológicos de H₂O₂ generado extracelularmente por neutrófilos (Test ST *et al.*, 1984) y eosinófilos (Weiss SJ *et al.*, 1986). Esos estudios también sugirieron que el anión superóxido producido exógenamente tuvo poco efecto sobre la viabilidad del parásito (Callahan HL *et al.*, 1990). Esto probablemente se debió a que el O⁻ requiere de un canal iónico o un sistema de transporte facilitado para atravesar la bicapa lipídica (Takahashi MA *et al.*, 1983), mientras que el H₂O₂ atraviesa libremente la membrana y puede generar radical hidroxilo, al reaccionar con el hierro intracelular. Sorprendentemente, la microfilaria de *Brugia malayi* es mucho mas resistente al H₂O₂ exógeno y ambos pueden tolerar y metabolizar concentraciones tan altas como 50 µM sin efectos deletéreos aparentes, mientras que los gusanos adultos pueden resistir aún mayores concentraciones (Ou X *et al.*, 1995).

El daño inducido en *B. malayi* por el H_2O_2 se ha valorado por la determinación de la proteínas con grupos carbonilos (un marcador de daño oxidativo en proteínas) y por el malonaldehído (un producto terminal de la peroxidación de lípidos). Se indujo la formación de proteínas con grupos carbonilos en la microfilaria y en el gusano adulto a concentraciones letales y sub-letales de H_2O_2 , pero la formación de malonaldehído no fue concluyente (Ou X *et al.*, 1995). La exposición del parásito adulto a sistemas generadores de radicales hidroxilo y utilizando ensayos con mayor sensibilidad (como la pérdida de ácidos grasos poliinsaturados), indicaron que los lípidos cuticulares de *B. malayi* fueron altamente resistentes a la peroxidación (Smith BP *et al.*, 1998). Esto se observó a pesar de usar concentraciones muy altas de H_2O_2 (1 mM) las cuales fueron letales para los parásitos.

1.2.2. Peroxirredoxinas (Prxs)

Las Prxs pertenecen a una nueva familia de enzimas que se han identificado en la mayoría de los organismos, y que inicialmente se les nombró como tiorredoxina peroxidasas. Estas peroxidasas utilizan los residuos de cisteína para reducir H_2O_2 , peroxinitritos e hidroperóxidos orgánicos. Se han clasificado en dos categorías en 1-CysPrxs y 2-CysPrxs, dependiendo del número de residuos de cisteína implicados en la catálisis enzimática (Chae HZ *et al.*, 1994). Su mecanismo catalítico se realiza en dos etapas que son esquematizadas en las figuras 3 y 4, la primera etapa es común para todas las Prxs. En esta primera etapa un residuo de cisteína susceptible a oxidación/reducción, conocida como cisteína peroxidática (Cys-S_PH), reacciona con el peróxido de hidrógeno y es oxidada con la

subsiguiente formación de un grupo sulfénico (Cys-S_POH) (Ellis HR *et al.*, 1997) (figura 4). El segundo paso de la reacción de peroxidasa, que es la resolución del grupo sulfénico de la cisteína peroxidática, permite clasificar a las Prxs en tres clases que son 2-Cys Prx típica, 2-Cys Prx atípica y 1-Cys Prx

Las 2-CysPrxs típicas, además de la cisteína peroxidática, contienen un segundo residuo de cisteína, la cisteína de resolución (Cys-S_RH), implicada en el ciclo catalítico (Hofmann B, 2002). A las 2-CysPrxs se les ha llamado típicas y son homodímeros obligados ya que el grupo sulfénico de la cisteína peroxidática de una subunidad es atacada por la cisteína resolutoria de la otra subunidad, generándose un puente disulfuro inter-subunidad. El ciclo catalítico se completa con la reducción del puente disulfuro inter-subunidad mediada por el sistema de la tioredoxina o por alguna otra de las actividades de disulfuro reductasa de la célula (figura 4).

En la segunda clase de Prxs, las 2-CysPrxs que se les conoce como atípicas, el grupo sulfénico de la cisteína peroxidática es atacada por la cisteína de resolución situada en la misma proteína, formándose un puente disulfuro intra-subunidad (Declercq JP *et al.*, 2001; Seo MS *et al.*, 2000). La forma reducida de la Prx se recupera utilizando el sistema de la tioredoxina con actividad de disulfuro reductasa (Seo MS *et al.*, 2000).

El último tipo de las Prxs, las 1-Cys Prxs, conserva sólo la cisteína peroxidática (Choi HJ *et al.*, 1998) cuyo grupo sulfénico probablemente formará un puente

disulfuro transitorio con un donador de un grupo tiol, que posteriormente será reducido por un segundo grupo donador de electrones con un grupo tiol aunque su identidad aún no es conocida (Wood ZA *et al.*, 2003).

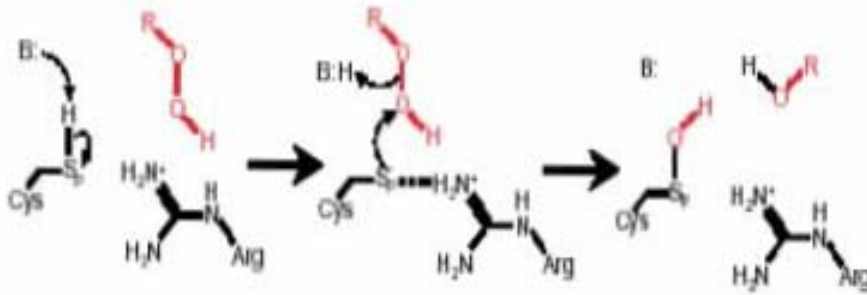


Figura 3. Mecanismo de acción común de las Prxs. El primer paso, la reducción del peróxido de hidrógeno lo comparten todas las Prxs e inicia con el ataque nucleofílico de la cisteína peroxidática (Cys-SpH) y la formación de cisteína ácido sulfénico (Cys-SpOH) intermediario (Wood ZA *et al.*, 2003).

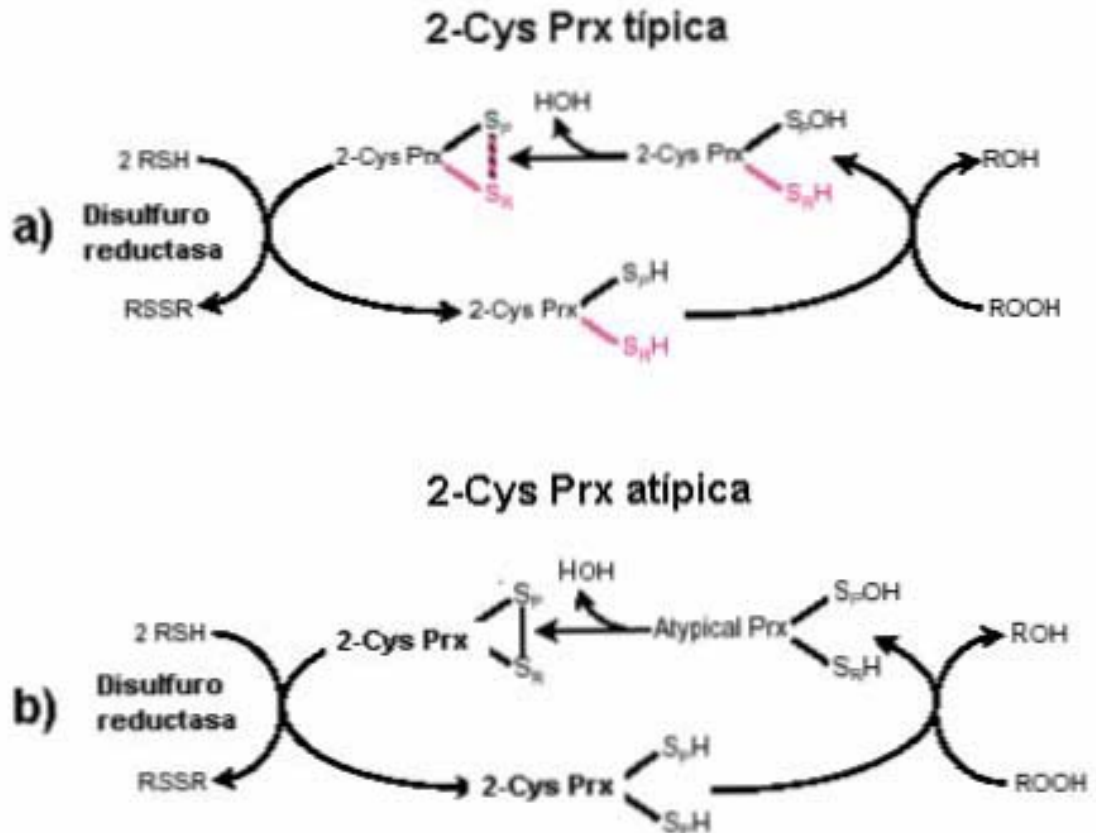


Figura 4. Mecanismo de acción que distingue a los diferentes tipos de Prxs. a) En el caso de las Prxs tipo 2-Cys típicas, que son diméricas, la cisteína peroxidática (Cys-S_PH y la cisteína de resolución (Cys-S_RH), forman un enlace disulfuro entre las dos subunidades (inter-subunidad) de la enzima. b) En el caso de las Prxs tipo 2-Cys pero atípicas, que son monoméricas, el enlace disulfuro formado entre la S_P y S_R se lleva a cabo entre la misma subunidad (intra-subunidad) (Wood ZA *et al.* 2003).

Las peroxirredoxinas pese a su baja eficiencia catalítica en comparación con catalasas y glutatión peroxidasas (Hofmann B, 2000), juegan un papel muy importante en la detoxificación de peróxidos debido a que son muy abundantes en la célula. Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que la función de estas enzimas en las células eucariontes no es únicamente la de peroxidasa. Las 2-CysPrxs típicas de eucariontes a diferencia de las de procariontes, tienen una alta

susceptibilidad a ser inactivadas por la sobreoxidación del grupo tiol de la cisteína peroxidática para dar lugar a la formación de ácido sulfínico (R-SO₂H) (Wood ZA *et al.*, 2003; Yang SY *et al.*, 2002). Esta inactivación es reversible ya que se han identificado actividades enzimáticas que son capaces de reducir este grupo sulfínico (R-SO₂H) formado. Esta inactivación temporal de las Prxs es benéfica para las células eucariontes, las cuales utilizan el H₂O₂ como una molécula involucrada en la señalización intracelular (Wood ZA *et al.*, 2003). La inactivación de la función de peroxidasa de las Prxs permite un aumento temporal de H₂O₂ y, por lo tanto, la activación de componentes redox-sensibles de las rutas de señalización intracelular (Georgiou G *et al.*, 2003; Wood ZA *et al.*, 2003).

1.3.3. Peroxirredoxinas en nemátodos

Hasta el momento se han descrito 11 Prxs en nemátodos, nueve del tipo 2-Cys (McGonigle S *et al.*, 1998, Ghosh I *et al.*, 1998, Tsuji N *et al.*, 2000) y dos enzimas del tipo 1-Cys (Chandrashekar R *et al.*, 1998). Las enzimas Prxs del tipo 2-Cys de esos parásitos tienen un peso molecular de 22 kDa, mientras que las del tipo 1-Cys pesan 26 kDa. La enzima mitocondrial 2-Cys de *B. malayi* (Bm-TPX-3) es de 25 kDa y posee una secuencia señal N-terminal de 30 aminoácidos. Esta enzima mitocondrial es la primera y única Prx descrita en nemátodos, aunque la mitocondria requiere una gran cantidad de enzimas antioxidantes para contrarrestar los altos niveles de moléculas ROS producidas durante el proceso respiratorio, es muy probable que esta enzima también exista en otros nemátodos (Henkle-Duhrhsen K *et al.*, 2001).

Comparando las secuencias de aminoácidos de las 11 Prxs descritas en nemátodos, se encontró que su identidad va del 25 al 97%. Siete de las enzimas del tipo 2-Cys tienen un nivel de identidad muy alta (del 90 al 97%), mientras que las otras dos enzimas Prx del tipo 2-Cys tienen una identidad en la secuencia de aminoácidos entre el 50 y 70%.

Todas la enzimas Prx del tipo 2-Cys de nemátodos contienen una secuencia FVCP conservada cerca del N-terminal que contiene a la cisteína peroxidática característica de esta clase de Prxs, en contraste las enzimas Prx del tipo 1-Cys contienen una secuencia PVCT en este sitio. Todas las secuencias de las 11 isoformas de Prxs contienen una serina (S) conservada en la región N-terminal localizada en la región 25-31.

Las Prxs recombinantes 1-Cys y 2-Cys de *O. volvulus*, *B. malayi* y *D. immitis*, así como las enzimas Prxs recombinantes de *Ascaris suum* han sido probadas por su capacidad de proteger la ruptura del DNA, debido a la exposición de la molécula de DNA a radicales hidroxilo producidos durante el sistema de oxidación catalizada por iones metálicos, indicando su potencial para actuar como moléculas antioxidantes (Chandrashekar R *et al.*, 1998, Ghosh I *et al.*, 1998, Tsuji N *et al.*, 2000). La enzima 2-Cys de *D. immitis* fue capaz de eliminar el H₂O₂ agregado de forma exógena, de manera dependiente de la concentración (Tsuji N *et al.*, 2000).

La Prx en nemátodos parásitos, se encuentra presente en todo el ciclo de su vida (Chandrashekar R *et al.*, 1998, Ghosh I *et al.*, 1998, Tsuji N *et al.*, 2000). Además,

existen evidencias de que la enzima se encuentra abundantemente en dichos nemátodos. Por ejemplo, la 2-CysPrx de *O. volvulus* (Ov-TRX-2) se expresa en altos niveles, ya que de forma experimental se demostró que el 2.5 % de las clonas en la biblioteca de DNAC de *O. volvulus* hibridan con su correspondiente DNAC (Lu W *et al.*, 1998). Asimismo, dos proteínas de 23 y 25 kDa identificadas por un suero anti-Prx en extractos de *A. suum*, son las proteínas mas abundante en este parásito. Esto es consistente con las altas concentraciones de esas enzimas encontradas en mamíferos (Chandrashekar R *et al.*, 2000, Lu W *et al.*, 1998, Tsiji N *et al.*, 2000).

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los pacientes con cisticercosis tienen entre 20 y 50 años de edad, lo que representa un fuerte impacto económico, debido a las pérdidas en la productividad. Los costos del tratamiento y hospitalización se han calculado en billones de dólares americanos anualmente. En países en vías de desarrollo, esto afecta aún mas la ya de por sí deteriorada economía de sus habitantes. Para tratar la teniosis y la cisticercosis en humanos se han utilizado diferentes drogas entre las que se encuentran el prazicuantel, la niclosamida y el tiabendazol las cuales en ocasiones producen reacciones adversas indeseables que requieren de cuidados especiales. Actualmente se están explorando otras alternativas para tratar y erradicar la teniosis de forma más segura, como el desarrollo de vacunas para prevenir la cisticercosis en el cerdo, la búsqueda de mejores métodos diagnósticos para la teniosis, así como el desarrollo de inhibidores de enzimas esenciales del parásito, tales como las enzimas pertenecientes al sistema anti-oxidante.

2.2. HIPÓTESIS

Si la enzima recombinante del tipo 2-CysPrxTs es capaz de controlar los niveles tóxicos del peróxido de hidrógeno intracelular y evitar el daño celular causado por éste₂, entonces es posible inhibir dicha enzima en los céstodos, con la finalidad de

causarles daño indirectamente, como recurso para disminuir la frecuencia de infecciones por este parásitos.

2.3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Clonar el DNA complementario que codifica para la peroxirredoxina tipo 2-Cys de *T. solium* así como expresar su producto génico y realizar una caracterización bioquímica de la proteína recombinante.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislamiento y caracterización del DNAC que codifica para la enzima
- Producir y purificar una 2-CysPrxTs recombinante
- Determinación de las propiedades bioquímicas de la 2-CysPrxTs
- Producción y caracterización de anticuerpos anti 2-CysPrxTs.
- Inmunolocalización de la enzima en el parásito

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

Los gusanos adultos de *T. solium* y *T. saginata*, se recuperaron de humanos infectados de forma natural y tratados con niclosamida (Yomesan, Bayer). Las oncosferas se obtuvieron de huevos del adulto de *T. solium* las cuales fueron eclosionadas y activadas en 1 mL de hipoclorito de sodio al 10% y purificadas mediante un gradiente de Percoll. Se formó el gradiente de Percoll adicionando en un tubo 22 mL de Percoll ligero (ver apéndice) y 6 mL de Percoll denso (ver apéndice). Se centrifugó el contenido del tubo a 48,000 x g durante 15 min. Sin alterar el gradiente formado, se le agregaron las muestras de oncosferas y se centrifugó nuevamente como antes. Se colectaron fracciones de 2 mL de la parte inferior del gradiente conteniendo la muestra de las oncosferas de interés.

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron del músculo esquelético de cerdos infectados de forma natural en un área rural endémica. El cisticerco de *Taenia crassiceps* se obtuvo de ratones infectados experimentalmente de acuerdo a la literatura (Larralde C *et al.*, 1989). Todos los parásitos se lavaron en PBS con antibióticos (1000 U/mL de penicilina y 1000 U/mL de estreptomina) y se conservaron a -70° C hasta su uso.

3.2. Preparación del fragmento del RNA para la 2-CysPrxTs

Se realizó la extracción de RNA total a partir de 1.5 g de cisticerco de *T. solium*. Los parásitos se homogeneizaron en un Polytron por 15 seg 3 veces en un

volumen de 2 mL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad). La muestra homogeneizada se incubó durante 30 min a 30° C, después se le agregó 0.2 mL de cloroformo, se agitó por 15 seg y se incubó a la misma temperatura por 15 min, para después ser centrifugada a 12,000 x g durante 15 min a 4° C. La fase acuosa superior que es donde se encuentra el RNA se transfirió a otro tubo y se precipitó adicionando 0.5 mL de alcohol isopropílico e incubando a 30° C por 10 min. Se centrifugó nuevamente a 12,000 x g durante 10 min a 4° C, se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 0.75 ml de etanol al 75%, se centrifugó como antes durante 5 min a 4° C, se desechó la solución remanente de etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA total obtenido fue resuspendido en agua libre de RNAsa y su concentración fue determinada por espectrofotometría a $A_{260/280nm}$.

El DNAC se sintetizó a partir de RNA total con el sistema de preamplificación SuperScript de acuerdo a las instrucciones del fabricante (GIBCO-BRL). Brevemente, primero se preparó en un tubo de microcentrífuga la siguiente mezcla de reacción: 10 ng del RNA total, 1 μ L de una mezcla de dNTPs (10 mM) y 9 μ L agua. Se calentó la mezcla a 65° C durante 5 min, después se mantuvo en hielo y se le agregaron 4 μ L del amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15mM. pH 8.3) para la síntesis de la primera hebra, 2 μ L de DTT (0.1 M), se agitó el contenido del tubo y se incubó a 42° C por 2 min; terminado ese tiempo se le agregó 1 μ L de la SuperScript II RT (200U) y se incubó a 42° C por 50 min, para después inactivar a la enzima a 70° C por 15 min.

El fragmento de DNA (sonda) se generó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando 50 ng de DNAC antes mencionado como templado y dos iniciadores a 25 pm/μL, diseñados a partir de dos secuencias conservadas en las 2-Cys Prx típicas (Prx1: 5`GACTTCACCTCCGTNTGYCC Y Prx2: 5`GCAGGGCAGACYTCNCCRTG). Las condiciones para la amplificación por PCR fueron: desnaturalización del DNA a 95° C durante 2 min, 30 ciclos (94° C por 1 min, 50° C por 1 min, 72° C por 1 min) y un ciclo (94° C por 1 min, 50° C por 1 min, 72° C por 5 min). La amplificación se realizó usando la VENT polimerasa (New England BioLabs), el fragmento amplificado se clonó en el sitio de restricción *SmaI* del vector pUC18 (Pharmacia).

3.3. Construcción de la biblioteca de DNAC y aislamiento de la clona

El RNA PolyA⁺ del adulto de *T. solium* se aisló del RNA total por medio de una cromatografía de oligo-dT; para esto el RNA de *T. solium* se mezcló con 1.3 mL del amortiguador de unión (Tris-Hcl 20 mM pH 7.6, NaCl 0.5 M, EDTA 1 mM pH 8.0) y se pasó en 3 ocasiones a través de la columna oligo dT-sefarosa (Sigma Chemical Co.) con la misma cantidad del amortiguador de unión. El RNA fue eluido de la columna con el amortiguador de elución (Tris-Hcl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8.0, SDS 0.05%), se precipitó con acetato de sodio-etanol y su concentración fue determinada por espectrofotometría a $A_{260/280nm}$. El DNAC se sintetizó a partir de 10 μg de RNA PolyA⁺ usando como iniciador un oligo-dT que contenía un sitio de restricción *XhoI*. La cadena de RNA fue digerida con RNAsa H, y la segunda cadena del DNAC sintetizada con DNA polimerasa de *E. coli* y unida con la T4

ligasa. Al extremo 5' del DNAC se adicionó un sitio de restricción *EcoRI* por medio de un oligonucleótido adaptador.

Este DNA y el vector λ ZAP II se digirieron con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*, y posteriormente se ligaron con la enzima T4 ligasa. Finalmente, este DNA híbrido se encapsuló en los fagos utilizando un extracto comercial de fagos Giga II Gold (Stratagene). La titulación de la biblioteca se llevó a cabo inoculando una colonia de la bacteria *E. coli* XL1-Blue en 50 mL de medio SOB e incubada a 37° C toda la noche. Las bacterias fueron centrifugadas 10 min a 600 x g y resuspendidas en MgSO₄ 10 mM a una concentración de DO₆₀₀= 0.5. Las bacterias (200 μ L) fueron infectadas con 10 μ L de las siguientes diluciones de fagos de la biblioteca: 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, 3 mL de medio top-agar fundido a una temperatura de 48° C fueron mezclados con las bacterias infectadas y sembradas en cajas de petri con medio SOB e incubadas a 37° C toda la noche (Sambrook J *et al.*, 1989). La eficiencia y el título de la biblioteca se determinaron contando el número de placas líticas y refiriéndolo como fagos/mL de solución y la determinación de insertos en los fagos se realizó por amplificación por medio de la técnica de PCR.

Asimismo la amplificación de la biblioteca se llevó a cabo infectando a la bacteria *E. coli* XL1 Blue con los fagos de la biblioteca primaria, Después de crecer toda la noche, el lisado fue obtenido por centrifugación a 600 x g, y se tituló como antes,

dando un título de 2×10^{10} fagos/mL; se prepararon alícuotas del lisado y se conservaron a -70° C.

3.4. Marcaje de la sonda de DNA con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

Los productos de amplificación por PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en amortiguador Tris-acetato (TEA 1X) y purificado por el método de Vogelstein y Gillespie 1979. El marcaje radiactivo del fragmento se llevó a cabo utilizando el método de Random Primer. Alrededor de 25 ng del fragmento purificado fue diluído hasta 20 μL con agua y desnaturalizado a 95° C durante 10 minutos. El fragmento fue enfriado en hielo y sobre éste se le adicionó el amortiguador de marcaje incluido en el estuche, conteniendo 1 mM de los desoxinucleótidos (A, G, T), 50 μCi del radioisótopo $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, hexanucleotidos y 1 Unidad de la enzima Klenow e incubado a 30° C por 30 minutos.

3.5. Tamizaje y aislamiento de clonas positivas

Alrededor de 45,000 fagos de la biblioteca de DNAC preparada del adulto de *T. solium* fueron sembrados en medio SOB sólido en tres cajas petri. La infección se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las cajas sembradas fueron incubadas a 37° C hasta que se observaron placas de lisis, entonces fueron cubiertas con membranas de nitrocelulosa por 5 minutos y orientadas con tinta china. A cada caja se le hizo un duplicado colocando otra membrana encima, durante 10 minutos después de quitar la primera. El DNA del fago adherido a las membranas fue desnaturalizado con una solución de NaOH 0.5M, NaCl 1.5M

durante 5 mins y neutralizado con una solución de Tris-HCl 1M y NaCl 1.5M, pH 8 por 5 mins. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y el DNA en la membrana fue fijado con luz ultravioleta en un UV Spectrolinker (Spectronics Corp.), (1,200 seg x 100 μ j x cm²).

Las membranas fueron prehibridadas a 60° C por 3 h con agitación en una solución: amortiguador salino de citratos 6X (citrato de sodio 30 mM, 300 nM NaCl pH 7.0), dodecil sulfato de sodio 0.5%, solución de Denhart 5X (Ficoll 5 g, polivinilpirrolidona 5 g, albúmina sérica bovina 5 g) y 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado a 100° C por 5 min. Transcurrido ese tiempo se cambió la solución por otra similar pero sin el DNA de esperma de salmón, se añadió la sonda 2-CysPrxTs marcada con [α -³²P] dCTP y las membranas fueron incubadas a 60° C toda la noche. Las membranas se lavaron 3 veces con una solución de SSC 2X y SDS 0.1% a 60° C durante 20 minutos cada vez. Finalmente, las membranas se secaron a temperatura ambiente y fueron expuestas sobre películas de rayos X (Kodak) durante 24 horas.

Las clonas positivas del primer tamizaje fueron aisladas del agar y resuspendidas en 1 mL del amortiguador SM (NaCl 5.8 g, MgSO₄.7H₂O 2 g, Tris-HCl 1 M 50 mL, gelatina al 2% 5 mL, H₂O 1000 mL). Posteriormente, se realizó un segundo y un tercer tamizaje en las que se utilizaron 1000 y 100 fagos respectivamente de cada una de las clonas positivas. Las clonas de fagos del λ ZAP positivas que se obtuvieron después de los tamizajes secundario y terciario se clonaron en plásmido

el Bluescript usando el fago Helper ExAssist (Stratagene). De las colonias bacterianas positivas se aisló el DNA plasmídico utilizando el estuche miniprep Qiaprep (Qiagen, Valencia). Brevemente, la clona bacteriana de interés se creció en 5 mL de medio LB con 100 µg de ampicilina y se incubó a 37° C durante 16 h. Después de ese tiempo la bacteria se cosechó por centrifugación a 6800 x g por 3 min a temperatura ambiente. El botón bacteriano se resuspendió en 250 µL del amortiguador I (glucosa 50 mM, Tris-Cl 10 mM, EDTA 10 mM, RNAsa 3.5 U/mL) y se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1 mL. Se agregaron 250 µL del amortiguador II (0.2N NaOH, 1% SDS) y se agitó invirtiendo los tubos lentamente 3 ocasiones. Inmediatamente se le agregaron 350 µL del amortiguador III (acetato de potasio 5M, 115 mL ácido acético glacial, 285 mL H₂O) y se agitó por inversión, para posteriormente centrifugar la mezcla a 17900 x g durante 10 min.

El sobrenadante se pasó a través de una columna (QIAprep que une el DNA plasmídico) fue centrifugado por 30 seg. El DNA unido a la columna se lavó con 750 µl del amortiguador IV (etanol 70%) y se centrifugando como antes. Finalmente, el DNA se eluyó de la columna con 50 µL del amortiguador V (Tris-Cl pH 8.0).

El DNA plasmídico obtenido fue secuenciado en ambas direcciones usando el método primer en un secuenciador de DNA fluorescente automatizado ABI Prism modelo 373 (Perkin-Elmer). El análisis de la secuencia se realizó con el software disponible en: <http://www.biosupplynet.com/cfdocs/btk/btk.cfm>, de la misma manera

el análisis BLASTp se realizó por NCBI usando un software disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

3.6. Análisis tipo Southern y northern

El análisis tipo Southern se realizó con 10 µg de DNA genómico de *T. solium* digerido con las enzimas de restricción (*NdeI*, *NheI*, *EcoRI* y *HindIII*). Este DNA digerido fue separado en un gel de agarosa al 1% en TAE (0.04 M de Tris-acetatos, ácido etilen diamino tetracético) a 0.15 V/cm, y los fragmentos transferidos a una membrana de nylon (Amersham Biosciences). Para el análisis tipo northern, 10 µg del RNA total aislado del cisticerco de *T. solium*, fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa con TAE con formaldehído al 37%. Finalizada la corrida, los fragmentos separados en el gel fueron transferidos a una membrana de nylon. Las condiciones de prehibridización e hibridización para ambas membranas de nylon con los ácidos nucleicos, se llevaron a cabo utilizando las condiciones usadas en el tamizaje (Sambrook J et al., 1989).

3.7. Producción y purificación de la 2-CysPrxTs recombinante

La enzima 2-CysPrxTs se produjo como una enzima de tipo silvestre, debido a que la región codificante de la enzima se colocó en marco de lectura con el promotor T7 del vector pRSET. Brevemente, la región codificante se amplificó por PCR usando 2 oligonucleótidos que contenían un sitio *NdeI* próximo al codón de iniciación ATG (Prx-XI: 5`GGCATTCCCATATGCACGAGGCTGCTGCT) y un oligonucleótido reverso que contenía un sitio *BamHI* después del codón de terminación (Prx-XII:

5`CGCGGATCCTATCTTGAGCTCATGAAC). Las condiciones de la PCR fueron las mismas que se utilizaron para la construcción de la sonda 2-CysPrxTs.

El producto de la PCR y el vector pRSET (Invitrogen) se digirieron con las enzimas *NdeI* y *BamHI* y posteriormente se ligaron con la enzima T4 ligasa. Los plásmidos recombinantes resultantes de la ligación se usaron para transformar por medio del método de cloruro de calcio a la bacteria *E. coli* BL21. La síntesis de la proteína recombinante en la bacteria transformada, se indujo con 1 mM de isopropil-thio-β-D-galactopiranosido (IPTG) una vez que el cultivo bacteriano alcanzó una DO A_{600nm} de 0.5. Después de 6 horas de inducción, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,000 g por 15 min. El botón bacteriano se resuspendio con amortiguador de Tris-acetato 10 mM, pH 7.0, 0.1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride con 0.75 M de sacarosa y se incubó 30 min para después ser sonificado tres veces durante 10 seg a 4° C. La suspensión resultante fue centrifugada a 30,000 x g y el sobrenadante se pasó por una columna HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Bioscences) previamente equilibrada con 50mM de Tris-HCl, pH 7.0. La columna se lavó tres veces con el mismo amortiguador y la proteína unida se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.5M) en 50 mM de Tris-HCl, pH 7.0. Se determinó la concentración de proteínas mediante A_{280nm} y se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 10% de las fracciones unida y no unida a la columna.

Las fracciones con la proteína de 22 kDa se ensayaron para buscar la actividad específica de 2-CysPrxTs. Las fracciones conteniendo la enzima se dializaron

contra Tris-HCl, pH 7.0, y se pasaron a través columna 16/10 DEAE FF bajo las mismas condiciones. La velocidad de flujo para ambos procedimientos fue de 5 ml/min y se colectaron fracciones de 3 mL.

3.8. Actividad enzimática de la 2-CysPrxTs

La actividad antioxidante de la enzima recombinante se determinó a 25° C, midiendo la oxidación de la nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH) a una $A_{340\text{nm}}$, acoplada a la reducción por la proteína 2-CysPrxTs del peróxido de hidrógeno (Sigma) o hidroperóxido cumeno (Sigma) en presencia de tiorredoxina (Sigma) y tiorredoxina reductasa de *E. coli* (Sigma). La reacción se llevo a cabo en 0.5 ml de una mezcla de reacción con 50 mM de HEPES (pH 7.0), 250 μM NADPH, 10 μM Trx, 3 U de TrxR, 250 μM H_2O_2 o 250 μM de hidroperóxido cumeno y 3.5 μg de 2-CysPrxTs recombinante (Kawazu S *et al.*, 2001).

3.9. Producción de anticuerpos contra 2-CysPrxTs

Los anticuerpos de conejo contra la 2-CysPrxTs se prepararon aplicando cuatro inmunizaciones subcutáneas cada dos semanas, usando 100 μg de la proteína recombinante mezclada con $\text{Al}(\text{OH})_3$ (v/v). Los conejos se sangraron antes de empezar las inmunizaciones y siete días después de cada inmunización. Después de la última inmunización, se sangró a blanco mediante punción cardiaca (Craig PS *et al.* 1994). Se dejó coagular la sangre y se separó el suero por centrifugación (1,500 x g durante 10 min) para luego ser almacenado en alícuotas a -20° C. Las fracciones de IgG se purificaron del suero de conejo por cromatografía de afinidad usando proteína G-agarosa (Sigma). La especificidad de los anticuerpos fue

determinada por inmunoelectrotransferencia y los títulos por ELISA usando como antígeno la misma enzima recombinante.

3.10. Electroforesis en en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes e inmunoelectrotransferencia

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5%, para la electroforesis se usaron 2.5 µg de la proteína pura y 10 µg de los extractos proteicos que fueron hervidos 2 min en un amortiguador de Laemli conteniendo 0.1 mM de 2-mercaptoetanol. Algunos geles se tiñeron con azul brillante de Coomasie y otros se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon las membranas con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% (Towbin *et al.* 1979). Los antígenos contenidos en las membranas fueron incubados con los anticuerpos (fracción IgG) de conejo (1:1,000). Los anticuerpos unidos se detectaron por medio de un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:2,000) y se revelaron con 0.5 mg de 3,3'-diaminobenzidina y 20 µL de H₂O₂ al 1% durante 15 min a temperatura ambiente.

Para determinar la oxidación/reducción de la enzima, se prepararon geles de poliacrilamida al 12% sin mercaptoetanol (no reductores). Esto se llevó a cabo incubando por 5 minutos 5 µg de 2-CysPrxTs a temperatura ambiente con (0, 0.5, 0.1, 0.25 mM) ditioneitol (DTT); (0, 1, 2.5 y 5 µg) de Trx de *E. coli*. Ensayos similares fueron realizados pero después de 5 min de incubación con DTT y Trx, se agregaron 0.5 mM de H₂O₂ y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, todas las reacciones antes mencionadas fueron corridas en los geles a

50 Volts manteniendo el amperaje constante y los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie. La enzima Trx de *E. coli* se mantuvo en la forma reducido incubándola con 0.05 mM de DTT durante 1 min, antes de los ensayos.

3.11. Inmunofluorescencia indirecta

El cisticerco completo de *T. solium* se embebió en Tissue-Tek (Miles Laboratories), se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70° C. Se cortaron secciones de un grosor de 6 µm y se depositaron sobre portaobjetos cubiertos con Poly-L-lisina (Sigma) a una concentración de 3 µg/mL (Haines *et al.* 1991). Los cortes se hidrataron con PBS por 2 minutos y se incubaron durante la noche con 100 µL de anticuerpos anti-2-CysPrxTs (0.4 mg/mL) en PBS con 1% de BSA, 0.05% Tween-20 (PBS-T). Se lavaron con PBS y se incubaron protegidas de la luz durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma), diluido 1:50 en PBS-T. Se lavaron nuevamente las secciones con PBS, se montaron en un portaobjetos con una solución PBS-glicerol (9:1) y se fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia marca Nikon Optiphot, modelo HFX-DX. Como control negativo se usó IgG de un suero no hiperinmune de conejo (Grazna R, 1982).

3.12. Ensayo de tolerancia al peróxido de hidrógeno

Los cisticercos de la cepa WFV de *T. crassiceps* se obtuvieron por exposición del peritoneo de ratones BALB/c, 80 días de haber realizado la infección intraperitoneal en los animales (Larralde C., *et al.* 1989). Se incubaron 20 parásitos/ml en cámara húmeda con 5 % de CO₂ a 37° C en medio RPMI (GIBCO-BRL) con 1 mM de

piruvato de sodio, penicilina (100 U/mL) y estreptomina (110 µg/mL) en cámara húmeda y 5% de CO₂. Los cisticercos se trataron con diferentes concentraciones de H₂O₂ (de 1 a 4 mM). Se removieron 10 cisticercos de cada concentración a diferentes tiempos (1.25, 2.5 y 4 h) y se determinó su viabilidad por medio de la evaginación, movilidad y morfología. La evaginación se realizó usando 1% de bilis de cerdo, la movilidad y morfología se determinaron por observación en un microscopio de luz invertido (Optical American Corporation). Como control se usaron cisticercos que no se expusieron al oxidante.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y caracterización del DNAC de la 2-CysPrxTs

La biblioteca de DNAC del adulto de *T. solium* contenía 2.7 X 10⁵ fagos recombinantes/µL del vector λZAP II. El análisis de la biblioteca reveló que solamente el 1% de las unidades formadoras de placa (UFP) carecían del inserto de DNAC y el tamaño de los insertos fue de 0.5 kb a 7 kb.

Una vez construida la biblioteca de fagos se preparó una sonda de DNA de ~390 pb por PCR usando el DNAC de *T. solium* y los oligonucleótidos degenerados designados a partir de 2 motivos bien conservados (DFTFVCP y HGEVCPA) presentes en las enzimas 2-CysPrx. Los análisis de la secuencia nucleotídica obtenida de este fragmento mostraron que codifica para un fragmento de una 2-CysPrxTs (figura 5). Este fragmento de DNA fue usado para tamizar 45,000 fagos recombinantes de la biblioteca de DNAC construida en el fago λZAPII. Después de

piruvato de sodio, penicilina (100 U/mL) y estreptomina (110 µg/mL) en cámara húmeda y 5% de CO₂. Los cisticercos se trataron con diferentes concentraciones de H₂O₂ (de 1 a 4 mM). Se removieron 10 cisticercos de cada concentración a diferentes tiempos (1.25, 2.5 y 4 h) y se determinó su viabilidad por medio de la evaginación, movilidad y morfología. La evaginación se realizó usando 1% de bilis de cerdo, la movilidad y morfología se determinaron por observación en un microscopio de luz invertido (Optical American Corporation). Como control se usaron cisticercos que no se expusieron al oxidante.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y caracterización del DNAC de la 2-CysPrxTs

La biblioteca de DNAC del adulto de *T. solium* contenía 2.7×10^5 fagos recombinantes/µL del vector λZAP II. El análisis de la biblioteca reveló que solamente el 1% de las unidades formadoras de placa (UFP) carecían del inserto de DNAC y el tamaño de los insertos fue de 0.5 kb a 7 kb.

Una vez construida la biblioteca de fagos se preparó una sonda de DNA de ~390 pb por PCR usando el DNAC de *T. solium* y los oligonucleótidos degenerados designados a partir de 2 motivos bien conservados (DFTFVCP y HGEVCPA) presentes en las enzimas 2-CysPrx. Los análisis de la secuencia nucleotídica obtenida de este fragmento mostraron que codifica para un fragmento de una 2-CysPrxTs (figura 5). Este fragmento de DNA fue usado para tamizar 45,000 fagos recombinantes de la biblioteca de DNAC construida en el fago λZAPII. Después de

tres tamizajes consecutivos se obtuvieron 4 clonas positivas 2 de las cuales contenían un inserto de 500 pb y las 2 restantes con un inserto de 900 pb. Solamente se secuenciaron las dos clonas de mayor tamaño, debido a que todas presentaron el mismo patrón de restricción cuando se utilizaron las enzimas de restricción *Bam*HI, *Hind*III, *Bgl*II y *Kpn*I. Ambas clonas mostraron una secuencia de nucleótidos idéntica (figura 5).

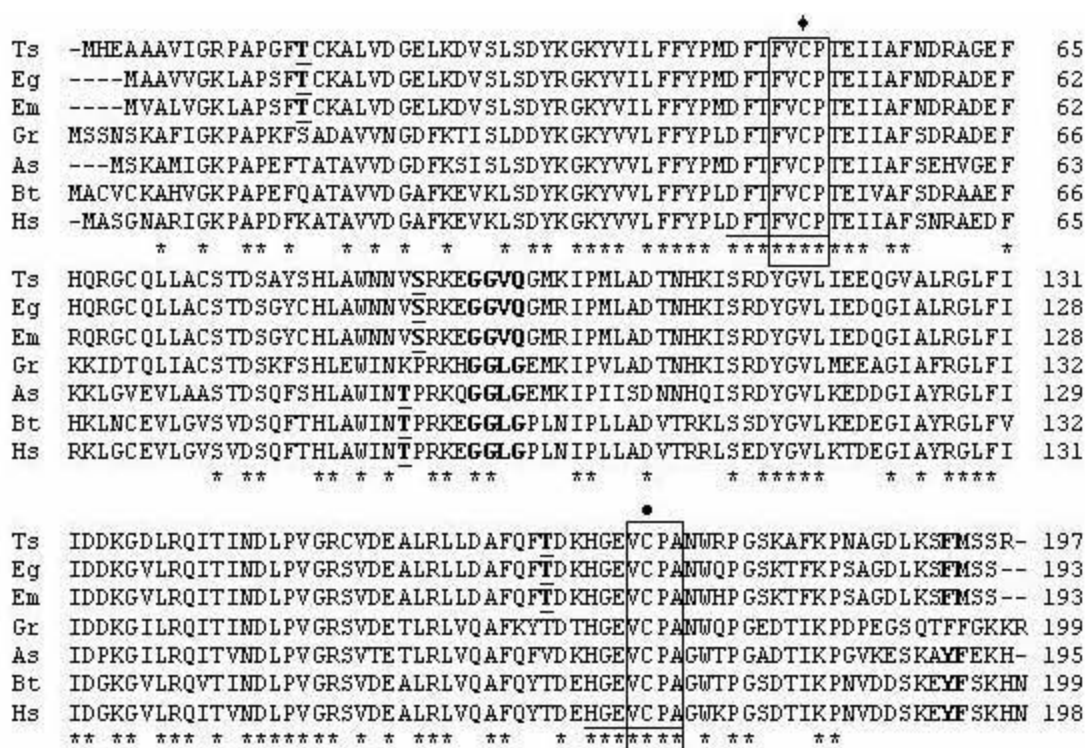


Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de 2-CysPrxTs *Taenia solium*, con otras secuencias de 2-CysPrx de *E. granulosus* (Eg), *E. multiloculares* (Em), *G. rostichiensis* (Gr), *A. suum* (As), *B. taurus* (Bt) y *H. sapiens* (Hs). El símbolo (*) indica identidad de aminoácidos. Los residuos de cisteína (C⁵¹ y C¹⁷²) involucrados en la actividad enzimática y en la formación de dímeros, se indican por (■) y (●), los sitios pprobables de fosforilación se muestran en negritas y subrayados. Los dos sitios activos de la 2-CysPrx típica se muestran en recuadros y la secuencia de aminoácidos designada para preparar la sonda se encuentra subrayada. Los motivos involucrados en la sensibilidad a la sobre-oxidación se presentan en negritas.

La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida se enviaron al banco de genes (GenBank <http://www.biosupplynet.com/cfdocs/btk/btk.cfm>. y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> respectivamente) y se les asignó el número de acceso AY728092. Las clonas presentaron un tamaño de 681 pb y contienen un marco de lectura abierto de 593 pb que codifica para una proteína de 197 aminoácidos (figura 9) con una *Mr* de 21,836 Da y un punto isoelectrico de 6.21, que muestra la presencia de dos motivos clásicos de las 2-CysPrxs uno en la región N-terminal, el sitio catalítico primario (⁴⁹FVCP⁵²), con la cisteína peroxidática en la posición 51, y el otro motivo del sitio catalítico secundario en la región C-terminal (⁴⁹VCPA¹⁷⁴) con el residuo de cisteína 172 que forma el enlace disulfuro inter-subunidad característico de estas enzimas (Wood ZA *et al.*, 2003).

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la clona mostró la identidad mas alta con las 2-CysPrx de *E. granulosus* (91%) y *E. multilocularis* (90%) y menos del 67% de identidad con otras 2-CysPrx de diferentes organismos reportados en la base de datos del GenBank. La clona muestra también los 3 residuos característicos de todas las clases de Prx, prolina (⁴⁴P), treonina (⁴⁸T) y arginina (¹²⁷R) que son necesarias para la actividad catalítica de la enzima. Por otro lado, la clona presentó 3 probables sitios de fosforilación por proteínas cinasas C (PKC) en las posiciones PAPGF¹⁶TCKALV, AWNNV⁹⁰SREGG, DAFQF¹⁶⁴TDKHGE, así como dos motivos característicos ⁹⁴GGVQ⁹⁷ y ¹⁹³FM¹⁹⁴ involucrados en la sensibilidad para la sobre-oxidación de la enzima (Wood ZA *et al.*, 2003).

Para establecer el número de copias del gen para la 2-CysPrxTs y el tamaño del RNA mensajero, se realizaron los análisis, 1) tipo Southern con el DNA genómico de *T. solium* digerido con cuatro enzimas de restricción y 2) análisis tipo northern con RNA total del cisticerco de *T. solium*, ambos se hibridaron con el DNAC completo que codifica para la 2-CysPrxTs. La figura 6A, muestra el patrón de tipo southern obtenido en el que se observa una banda con las enzimas *NdeI*, *NheI* y *HindIII*, y dos bandas con *EcoRI*, sitio que por análisis computacionales de la clona se había encontrado previamente. Por otro lado, el patrón mostrado en el northern reveló que sólo un transcrito de cerca de 1.0 kb es producido para esta enzima (figura 6B).

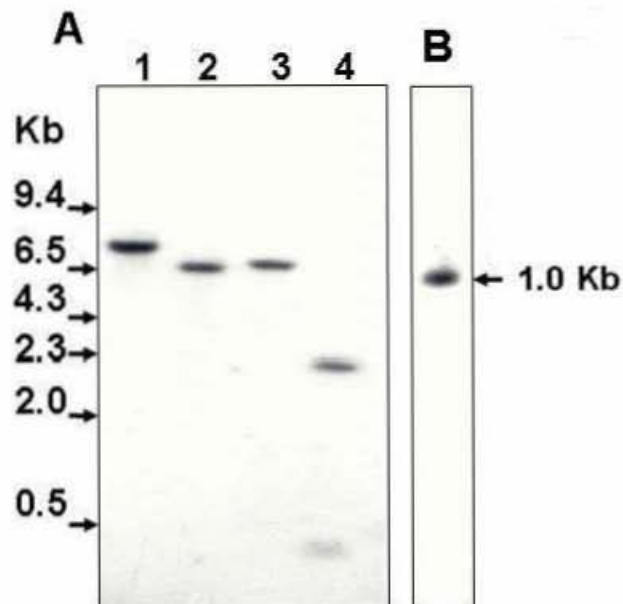


Figura 6. Caracterización del gen 2-CysPrxTs. A) Análisis tipo southern del DNA genómico digerido con las enzimas de restricción, 1: *NdeI*, 2: *NheI*, 3: *HindIII* 4: *EcoRI*. B) Análisis tipo northern usando RNA total del cisticerco de *T. solium*. El DNAC completo que codifica para la 2-CysPrxTs marcado con dCTP- P^{32} se utilizó como sonda.

4.2. Purificación y caracterización de la 2-CysPrxTs recombinante

La 2-CysPrxTs recombinante en cepa BL21 de *E. coli*, se solubilizó por sonicación, que es un procedimiento que involucra la destrucción de la membrana y pared celular bacteriana. La 2-CysPrxTs se purificó por 2 cromatografías secuenciales en una columna HiPrep 16/10 DEAE FF (Pharmacia), como se describió en materiales y métodos. El patrón de electroforesis de la figura 7, muestra los altos niveles de expresión de la 2-CysPrxTs recombinante en *E. coli* y la enzima pura después de las cromatografías de intercambio iónico. La línea 1 muestra todas las proteínas solubilizadas de una bacteria sin inducir, mientras la línea 2 presenta las mismas proteínas solubles que en la línea 1 pero inducidas con IPTG, donde se aprecia la expresión de la molécula recombinante. Una banda única con aparente PM de 22 kDa, que concuerda con el PM de la 2-CysPrxTs que se obtuvo después del procedimiento de purificación por cromatografía (línea 3). El procedimiento completo produjo 10 mg de la enzima recombinante/L de medio de cultivo.

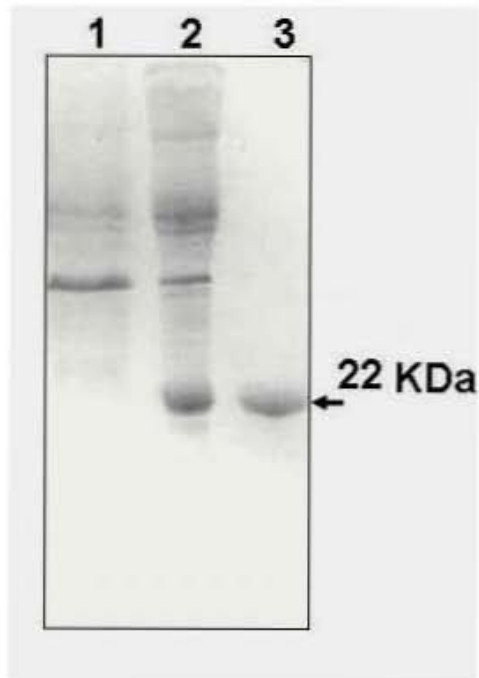


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras mostrando las fracciones obtenidas en los pasos de la purificación de la 2-CysPrxTs recombinante. 1: proteínas solubles de *E. coli* sin inducción, 2: proteínas solubles de *E. coli* inducidas con IPTG, 3: la 2-CysPrxTs recombinante purificada.

4.3. Actividad anti-oxidante de la 2-CysPrxTs

La figura 8 muestra la actividad anti-oxidante de la 2-CysPrxTs, determinada por la oxidación del NADPH en presencia del sistema Trx/TRxR de *E. coli*, con H₂O₂ o con hidroperóxido de cumeno. Después de la adición del peróxido de hidrógeno, el sistema 2-CysPrxTs mostró una marcada disminución en A_{340nm}, debido a la oxidación de NADPH, que bajó a 0.3 de forma inmediata, mientras que tras la adición del hidroperóxido cumeno, la disminución del A_{360nm} bajó a 0.5 en el doble

de tiempo que lo hizo el H_2O_2 . En contraste no se observó oxidación del NADPH cuando se utilizó la triosa fosfato isomerasa de cerdo (Sigma) como control.

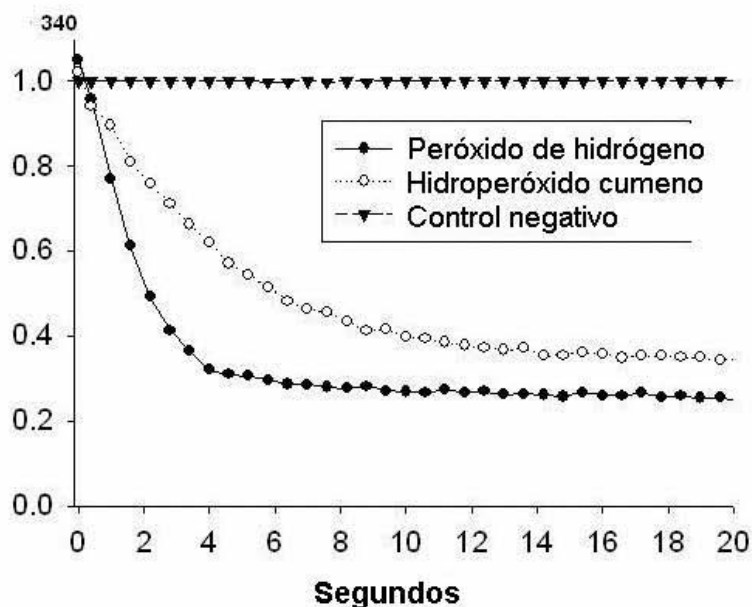


Figura 8. Determinación de la actividad de peroxidasa de la enzima recombinante 2-CysPrxTs por medio de la oxidación de NADPH acoplada a H_2O_2 (●) e hidroperóxido cumeno (⊙) en presencia del sistema Trx y TrxR de *E. coli*. Como control se utilizó la triosa fosfato isomerasa de cerdo (▼).

4.4. Mecanismo de oxidación-reducción de la 2-CysPrxTs

Con la finalidad de conocer la estructura y el papel de las cisteínas C^{51} y C^{172} que juegan en la dimerización de la 2-CysPrxTs, se incubó durante 5 min la forma homodimérica de la 2-CysPrxTs (40 kDa) recombinante; primero se incubó con DTT, después con Trx de *E. coli* y con ambos reductores y H_2O_2 . La electroforesis no reductora (figura 9), muestra que la enzima recombinante en ausencia de DTT o

Trx, presenta una banda de ~40 kDa (línea 1), la concentración de 0.05 mM de DTT no afectó el PM de la enzima, mostrando que esta concentración no tiene efecto en la disociación de 2-CysPrxTs (línea 2).

En contraste, cuando se usó 0.1 mM de DTT (línea 3) se observaron dos bandas una de ~40 kDa y otra de ~22 kDa. Al incrementar la concentración a 0.25 mM de DTT se apreció sólo una banda de ~22 kDa (línea 4). La adición de 0.5 mM de H₂O₂ a la banda de 22 kDa de la 2-CysPrxTs reducida por DTT resultó en la re-asociación de la banda de 22 kDa para producir otra vez la forma homodimérica oxidada de la enzima de ~40 kDa (línea 5). Usando la Trx a las concentraciones de (1, 2.5 y 5 µg) fue también capaz de disociar la forma oxidada homodimérica de la 2-CysPrxTs (~40 kDa) a una banda de ~22 kDa (líneas 6 a 8). De manera interesante, la adición de 0.5 mM de H₂O₂ a la forma monomérica de 2-CysPrTs producida por el DTT y la Trx, produjo otra vez la forma homodimérica oxidada de la 2-CysPrxTs sin modificación del PM de la Trx reducida de *E. coli* (línea 9). La línea 10 muestra la Trx de *E. coli* comercial de Sigma. Las dobles bandas que se observan en la región de 22 kDa, son probablemente diferentes conformaciones de la enzima monomérica recombinante.

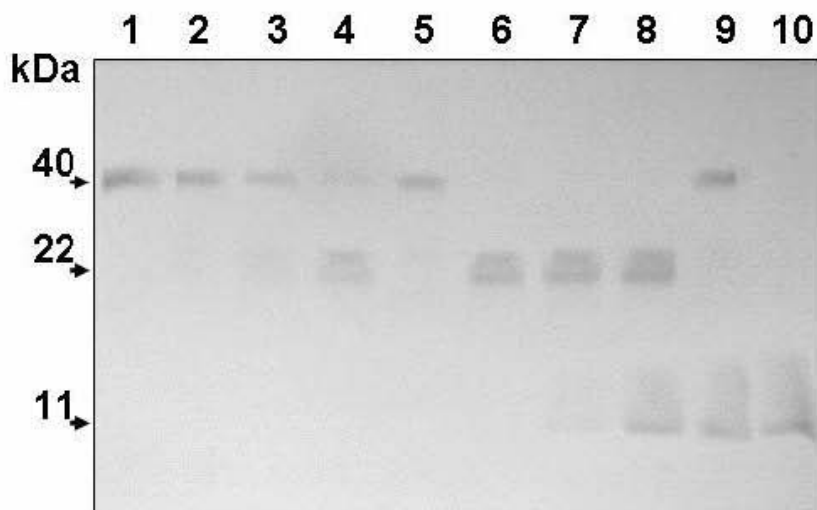


Figura 9. Determinación de la oxidación-reducción de la 2-CysPrxTs mediante un gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras. La enzima (3.5 μ g) recombinante incubadas durante 30 min a 25° C 1: sola, 2: 0.05 mM DTT, 3: 0.1mM DTT, 4: 0.25 mM DTT, 5: 0.25 mM DTT mas 0.5 mM de H₂O₂, 6: 1 μ g de Trx de *E. coli*, 7: 2.5 μ g de Trx de *E. coli*, 8: 5 μ g de Trx de *E. coli*, 9:5 μ g de Trx de *E. coli* mas 0.5 mM de H₂O₂, 10: 5 μ g de Trx de *E. coli*.

4.5. Expresión y localización de 2-CysPrxTs en *T. solium*

La especificidad de los anticuerpos de conejo anti-2-CysPrxTs fue determinada por inmunoelectrotransferencia (figura 10). Esos anticuerpos no detectaron bandas en extractos de *E. coli* antes de la inducción con IPGT (línea 1). En contraste, esos anticuerpos reconocieron una banda de ~22 kDa en membranas de nitrocelulosa conteniendo a la 2-CysPrxTs recombinante pura (línea 2), así como en extractos de cisticerco (línea 3), gusano adulto (línea 4), oncosferas de *T. solium* (línea 5), también reconocieron la misma banda en diferentes especies de *Taenias* como en el cisticerco de *T. crassiceps* (línea 6) y adulto de *T. saginata* (Línea 7). Cabe

mencionar que no se detectó reacción con extractos de cisticerco de *T. solium* cuando se utilizaron anticuerpos del suero de conejo no hiperinmunes como primer anticuerpo (línea 8).

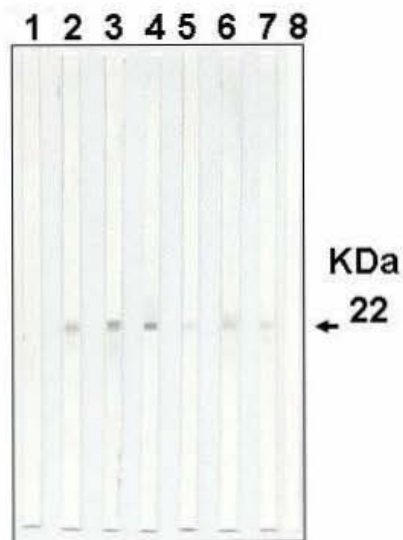


Fig. 10. Identificación de la 2-CysPrxTs en ténidos. IET usando anticuerpos anti-2-CysPrxTs enfrentados con extractos. 1: *E. coli* antes de la inducción con IPGT, 2: 2-CysPrxTs, 3: cisticerco, 4: gusano adulto, 5: oncosferas de *T. solium*, 6: cisticerco de *T. crassiceps* y 7: adulto de *T. saginata*. Como control línea 8 se muestran membranas con extractos de cisticerco de *T. solium* enfrentados con anticuerpos del tipo IgG de conejo no hiperinmune.

La localización de la 2-CysPrxTs sobre el tejido del cisticerco se realizó mediante un método de inmunofluorescencia indirecta usando los anticuerpos antes mencionados y un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo fluoresceinado. En la

sección 1 de la figura 11 se muestra una intensa fluorescencia sobre el tegumento, los cytones tegumentarios y células musculares, así como una fluorescencia difusa sobre todo el parénquima del cisticerco. No se observó tinción fluorescente en los cortes del cisticerco incubados con los anticuerpos obtenidos de sueros no hiperinmunes de conejos (Figura 11).

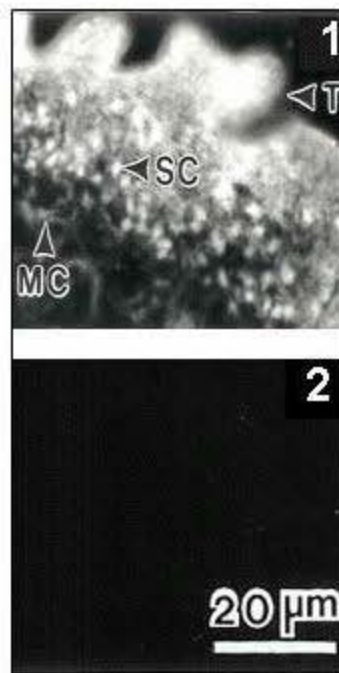


Figura 11. Inmunolocalización de la 2-CysPrxTs sobre cortes de pared del cisticerco de *T. solium* incubando con un primer anticuerpo 1) anti-2-CysPrxTs y 2) anticuerpos IgG normales de conejo, seguido por incubación con un segundo anticuerpo anti-conejo marcada con FITC. Las flechas y letras señalan el tegumento (T), cyton subtegumentario (SC) y células musculares (MC).

4.6. Efecto del H₂O₂ sobre el cisticerco de *T. crassiceps*

En la tabla 2 se presentan los efectos que tienen sobre los cisticercos de *T. crassiceps* las diferentes concentraciones de H₂O₂ y los tiempos de exposición al oxidante sobre la viabilidad del cisticerco. Se observó que el cisticerco fue capaz de tolerar concentraciones de H₂O₂ de 2.5 mM durante 2.5 h, ya que todos los cisticercos evaginaron y preservaron su movilidad y morfología, como los del grupo control. Sin embargo, esta misma concentración 2.5 mM del oxidante empezó a ser tóxica después de 4 h, mostrando una disminución del 60% en el porcentaje de evaginación, así como una disminución en la movilidad y alteración en la morfología de la pared vesicular, presentando una gran cantidad de vesículas. En contraste, las concentraciones ≥ 3 mM fueron tóxicas, disminuyendo el porcentaje de evaginación del cisticerco al 20% y reduce la movilidad del mismo a una (+) después de 2.5 h y causando destrucción del tegumento del cisticerco.

Tabla 2. Susceptibilidad del cisticerco de *Taenia crassiceps* al daño causado por el peróxido de hidrógeno in vitro

Tiempo (Hr)	0	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0 (H ₂ O ₂ mM)
1.25	100%	100%	100%	100%	40%	0%
	++++	++++	+++	+++	+	-
2.5	100%	100%	100%	100%	20%	0%
	++++	++++	+++	+++	+	-
4.0	100%	100%	100%	60%	0%	0%
	++++	++++	+++	+++	-	-

% = número de cisticercos evaginados

+ = Móvil, - = no móvil

Los datos son el promedio de tres experimentos diferentes

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

5.1. Discusión

Se construyó en este proyecto una biblioteca de DNAC del estadio adulto de *T. solium* que puede ser tamizada con anticuerpos o sondas de DNA para clonar nuevos genes del parásito. Asimismo, se aisló una clona de DNAC que codifica para una enzima 2-CysPrxTs cuyo PM es de 21,836 Da, y presenta los dos motivos altamente conservados alrededor de las cisteínas C⁵¹ y C¹⁷² de las enzimas 2-Cys peroxirredoxinas típicas. Asimismo su secuencia primaria de aminoácidos presentó la identidad más alta (91%) con las dos secuencias de nucleotidos de las 2-CysPrxs del género *Echinococcus*, género que está filogenéticamente relacionado al género *Taenia*. Por otro lado, los patrones de hibridación obtenidos con los

Tabla 2. Susceptibilidad del cisticerco de *Taenia crassiceps* al daño causado por el peróxido de hidrógeno in vitro

Tiempo (Hr)	0	1.0	2.0	2.5	3.0	4.0 (H ₂ O ₂ mM)
1.25	100%	100%	100%	100%	40%	0%
	++++	++++	+++	+++	+	-
2.5	100%	100%	100%	100%	20%	0%
	++++	++++	+++	+++	+	-
4.0	100%	100%	100%	60%	0%	0%
	++++	++++	+++	+++	-	-

% = número de cisticercos evaginados

+ = Móvil, - = no móvil

Los datos son el promedio de tres experimentos diferentes

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

5.1. Discusión

Se construyó en este proyecto una biblioteca de DNAC del estadio adulto de *T. solium* que puede ser tamizada con anticuerpos o sondas de DNA para clonar nuevos genes del parásito. Asimismo, se aisló una clona de DNAC que codifica para una enzima 2-CysPrxTs cuyo PM es de 21,836 Da, y presenta los dos motivos altamente conservados alrededor de las cisteínas C⁵¹ y C¹⁷² de las enzimas 2-Cys peroxirredoxinas típicas. Asimismo su secuencia primaria de aminoácidos presentó la identidad más alta (91%) con las dos secuencias de nucleotidos de las 2-CysPrxs del género *Echinococcus*, género que está filogenéticamente relacionado al género *Taenia*. Por otro lado, los patrones de hibridación obtenidos con los

ensayos tipo Southern y northern mostraron que la 2-CysPrxTs es codificada por un gen de copia única en el genoma de este parásito y que este gen produce un solo transcrito de aproximadamente 1.0 kb.

Los análisis realizados en los geles de poliacrilamida en condiciones reductoras y no reductoras mostraron que la 2-CysPrxTs recombinante es obtenida como una enzima homodimérica con un PM de aproximadamente 40 kDa (estado oxidado). Con el análisis de estos resultados sugerimos también que la estructura homodimérica de la enzima 2-CysPrxTs se debe a un enlace disulfuro entre sus monómeros producido por los residuos de cisteína C⁵¹ y C¹⁷², ya que dichos enlaces de cisteína fueron destruidos con DTT o con Trx formando una estructura monomérica con un PM de ~22 kDa. Además, el estado reducido (monomérico) puede ser re-oxidado por el H₂O₂ para producir una vez más la forma homodimérica oxidada. Esos resultados indican que la 2-CysPrxTs acepta al DTT y a la Trx como donadores de protones, revelando que la enzima presenta el mismo mecanismo catalítico de las 2-CysPrx típicas. Estos resultados coinciden con un reporte reciente donde muestran que las 2-CysPrxs (PrxII y PrxIII) de *S. mansoni* también utilizan a estas moléculas como donadores de protones (Sayed AA *et al.*, 2004).

Es reconocido que las peroxirredoxinas funcionan como anti-oxidantes contra moléculas ROS (Hoffman B, 2002; Wood ZA *et al.*, 2003). La 2-CysPrxTs no fue la excepción, ya que fue capaz de reducir el H₂O₂ y el hidroperóxido cumeno obteniendo sus equivalentes reductores del sistema Trx/TrxR/NADPH. Estos

resultados sugieren que la 2-CysPrxTs puede funcionar como una enzima antioxidante en este parásito.

Los ensayos de IET mostraron que los anticuerpos anti-2-CysPrxTs reconocieron una única banda de aproximadamente de 22 kDa de PM en todos los estadios de *T. solium* y en otras especies de *Taenias*, sugiriendo que esta enzima podría tener un papel muy importante en la regulación de hidroperóxidos en el género *Taenia*, ya que la catalasa y la glutatión peroxidasa no se han reportado en esos parásitos, aunque varios grupos de investigación las han buscado.

Los estudios de localización con los mismos anticuerpos mostraron que la 2-CysPrxTs se encuentra en orden decreciente del tegumento del cisticerco de *T. solium*, en los cytones tegumentarios y en células musculares, sugiriendo que la enzima puede estarse sintetizando en estas células y de allí distribuirse a todo el parénquima del parásito. Esta localización en el tegumento coincide con otras enzimas antioxidantes, como la glutatión S-transferasa y superóxido dismutasa que también se concentran en el tegumento de este parásito (Vivanco-Pérez et al., 1999, Vivanco-Pérez et al., 2002, Castellanos-González et al. 2002). Se sabe que *T. solium* puede vivir por largos períodos de tiempo en los tejidos del hospedero, rodeado de células del sistema inmune (Willms K et al. 1982). Además, se sabe que los helmintos pueden resistir altas concentraciones de H₂O₂ de alrededor de 1 mM *in vitro* (Mkoji GM et al., 1988). Como se demostró en el presente estudio, el cisticerco de *T. crassiceps* puede resistir concentraciones de H₂O₂ de 2.5 mM durante 2 h sin sufrir daño aparente. Por lo tanto, la localización de las enzimas

anti-oxidantes en el tegumento del cisticerco del *T. solium* podría ser una respuesta adaptativa para protegerse de la respuesta inmune del hospedero.

Por otro lado, la regulación del peróxido de hidrógeno es esencial para un adecuado desarrollo, diferenciación y proliferación de los organismos. Es reconocido que la Prx es una de las moléculas involucradas en esta regulación, debido a que mantiene bajos los niveles de H_2O_2 durante la señalización intracelular (Wood ZA *et al.* 2003). La fosforilación del residuo de tirosina conservado en la posición 89 (Y^{89}) por la cinasa dependiente de ciclina disminuye su actividad de peroxidasa. La 2-CysPrxTs tiene un residuo de serina en la posición 90 (S^{90}) que puede ser fosforilado por cinasas, el cual podría estar involucrado en la regulación de la enzima. Adicionalmente, la enzima tiene los motivos $^{94}GGVQ^{97}$ y $^{193}FM^{194}$, en lugar de los motivos conservados GGLG y YF, que están involucrados en la sensibilidad para la oxidación de las 2-CysPrxs (Chang TS *et al.*, 2002, Wood ZA *et al.*, 2003). De manera interesante esos cambios mencionados anteriormente también los presentan las 2-CysPrx de *Echinococcus*. La eliminación del motivo YF en 2-CysPrx produce enzimas resistentes a la sobre-oxidación como la 1-CysPrx (Sayed AA *et al.* 2004).

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. CONCLUSIONES

- Esta 2-CysPrxTs es la primera enzima caracterizada que cataliza la reducción del H_2O_2 y de otros hidroperóxidos en el género *Taenia*.

- El conocimiento generado en este trabajo nos ayuda a comprender el papel que tiene la enzima peroxirredoxina recombinante de *Taenia solium* en la regulación de los niveles del peróxido de hidrógeno producidos por el hospedero.

- El entender los mecanismos de sobrevivencia que expresa este céstodo para protegerse de los sistemas inmunológicos de defensa del hospedero, nos será de utilidad para proponer nuevas estrategias para su eliminación.

- La información generada en el presente trabajo abre la posibilidad para estudiar el mecanismo de regulación de la enzima y el papel que esta podría jugar en la fisiología de esos céstodos.

6.2. PERSPECTIVAS

Falta por conocer si los nuevos residuos encontrados mejoran el mecanismo de la sensibilidad para la sobre-oxidación y si mejoran la función de la enzima, así como

si estos tienen correlación con la capacidad del cisticerco para tolerar altas concentraciones de H₂O₂.

Queda por demostrar si esta enzima 2-CysPrxTs es capaz de inhibir *in vitro*, el rompimiento del DNA ocasionado por las moléculas ROS generadas en un sistema de oxidación catalizada por metales.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Procesos que conducen a la formación de ROS

Figura 2. Enzimas anti-oxidantes

Figura 3. Mecanismo de acción común de las Prxs

Figura 4. Mecanismo de acción de las Prxs típicas y atípicas

Figura 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la 2-CysPrxTs

Figura 6. Caracterización del gen 2-CysPrxTs

Figura 7. Fracciones obtenidas de la purificación de la 2-CysPrxTs

Figura 8. Actividad de peroxidasa de la enzima 2-CysPrxTs

Figura 9. Análisis de la oxidación-reducción de la enzima 2-CysPrxTs

Figura 10. Identificación de la 2-CysPrxTs en ténidos por IET

Figura 11. Inmunolocalización de la 2-CysPrxTs en el cisticero de *T. solium*

Tabla 1. Principales moléculas ROS

Tabla 2. Susceptibilidad del cisticerco de *T. crassiceps* al daño por H₂O₂

Abreviaturas

Al(OH) ₃	Hidróxido de aluminio
BSA	Albúmina sérica bovina
Cys-S _R H	Cisteína de resolución
Cys-S _P H	Cisteína peroxidática
2-CysPrxTS	Peroxirredoxina del tipo 2-Cys de <i>Taenia solium</i>
DTT	Ditiotreitol
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
GST	Glutación S-transferasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSG/GSSG	Glutation reducido/glutación oxidado
Grx	Glutarredoxina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IET	Inmunoelectrotransferencia
KCl	Cloruro de potasio
LEM	Larva en etapa muscular
LRN	Larva recién nacida
NO	Óxido nítrico
NADPH	Nicotinamida dinucleótido fosfato reducida
O ⁻	anión superóxido

OH·	Radical hidroxilo
PAGE-SDS	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
PMM	Permeabilidad de la membrana mitocondrial
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	Amortiguador salino de fosfatos con Tween
Prx	Peroxirredoxina
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TEA	Tris acetato ácido etilendiamino tetraacético
UFP	Unidad formadora de placa

APENDICE

Percoll ligero

10 ml de amortiguador de relajación 10X con EGTA

26.4 ml de Percoll sin diluir (densidad 1.130)

63.6 ml de H₂O desionizada

Percoll denso

3 ml del amortiguador de relajación 10 X con EGTA

26.4 ml de percoll sin diluir

0.60 ml de H₂O desionizada

Amortiguador de relajación (con EGTA)

100 mM KCl

3 mM NaCl

1 mM ATA (Na)₂

3.5 mM MgCl₂

10 mM PIPES pH 7.3

12.5 mmol/l EGTA

REFERENCIAS

- Allan JC, Avila G, García-Noval J, Flisser A. (1991). Immunodiagnosis of teniosis by coproantigen detection. *Parasitology*. **101**:473-477.
- Bass DA, Szejda P. (1979). Mechanisms of killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by neutrophils. Killing by generation of hydrogen peroxide *in vitro*. *J Clin Invest*. **64**:1558-1564.
- Brigelius-Flohe R. (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. **27**:951-965.
- Brophy PM, Pritchard DI. (1992). Metabolism of lipid peroxidation products in the gastro-intestinal nematodes *Necator americanus*, *Ancylostoma ceylanicum* and *Heligmosomoides polygyrus*. *International J Parasitol*. **22**:1009-1012.
- Buyts J, Wever R, Ruitenber EJ. (1984). Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the *in vitro* killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunol*. **51**:601-607.
- Callahan HL, Crouch RK, James ER. (1988). Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today*. **4**:218-225.
- Callahan HL, Crouch RK, James ER. (1990). Hydrogen peroxide is the most toxic oxygen species for *Onchocerca cervicalis* microfilariae. *Parasitol*. **100**:407-415
- Cañedo L, Laclette JP, Morales E. (1986). Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F, ed. *Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives*. Nueva York: Academic Press. 363-373.
- Carmel-Harel O, Storz G. (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. **39**:595-605.

Castellanos-Gonzales A, Jiménez L, Landa A. (2002). Cloning, production and characterization of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Internal J Parasitol.* **32**:1175-1182.

Craig P S, Allan J C. Cproantigen test for *Echinococcus granulosus*. Protocol guide. Dept. of Biological Sciences, University of Salford. 1994.

Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. (1994). Thioredoxin-dependent peroxidase from yeast. *J Biol Chem.* **269**:27670-27678.

Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG. (2002). Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* **277**:25370-25376.

Chandrashekar R, Curtis KC, Lu W, Weil G. (1998). Molecular cloning of an enzymatically active thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus*. **93**:309-312.

Choi HJ, Kang SW, Yang C H, Rhee SG, Ryu SE. (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol.* **5**:400-406

Danielson UH, Esterbauer H, Mannervik B. (1987). Structure-activity relationships of 4-hydroxyalkenals in the conjugation catalysed by mammalian glutathione transferases. *Biochem J.* **247**:707-713.

Declercq JP, Evrard C, Clippe A, Stricht DV, Bernard A, Knoop B. (2001). Crystal structure of human peroxiredoxin 5 a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J Mol Biol.* **311**:751-759

Delaunay A, Pflieger D, Barrault M B, Vinh J, Toledano MB. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell.* **111**:471-481.

Díaz JF, Verastegui M, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Gallo C, García HH, Torres P, Montenegro T, Miranda E. (1992). Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked

- immunoelctrotransfer blot (EITB) assay in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *Am J Trop Med Hyg.* **46**:610-615.
- Ellis HR, Poole LB. (1997). Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry.* **36**:13349-13356.
- Finkel T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* **15**:247-254.
- Flisser A, Larralde C. Cysticercosis; In: Walls KW, Schantz PM. (eds): Immunodiagnostic of parasitic disease, Orlando, USA: Academic Press 1986:109-161.
- Flisser A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today.* **4**:131-137.
- Fridovich I. (1998). The trail to superoxide dismutase. *Protein Sci.* **7**:2688-2690.
- Furchgott RF. (1995). A research trail over half a century. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* **35**:1-27
- Georgiou G, Masip L. (2003). An overoxidation journey with a return ticket. *Science* **300**:592-594.
- Ghosh I, Eisinger SW, Raghavan N, Scott AL. (1998). Thioredoxin peroxidases from *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol.* **91**:207-220.
- Golstein P, Modric T. (1994). Transgenerational ultrastructural analysis of the antioxidants effects of tocopherol on early gametogenesis in *Caenorhabditis elegans* grown in 100% oxygen. *Toxicol Appl Pharmacol.* **124**:212-220.
- Grzanna R. (1982). Light microscopic immunocytochemistry with fixed, unembedded tissues. In *Techniques in immunocytochemistry*, G. R. Bullock, and P. Petrusz (eds). Academic Press, London U.K., pp. 183-200.

- Haines DM, Chelack BJ (1991). Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Invest.* **3**:101-112
- Halliwell B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FABES J* **1**:358-364.
- Halliwell B. (1989). Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol.* **70**:737-757.
- Hayes JD, Strange RC. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacol.* **61**:154-166.
- Henkle-Dushen K, Kampkotter A. (2001). Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol.* **114**:129-142.
- Hoberg EP. (2002). *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes Infect.* **4**:859-866.
- Hoffman B, Hecht HJ, Flohe L. (2000). Peroxiredoxins. *Biol Chem.* **383**:347-364.
- Kawazu S, Komaki K, Tsuji N, Kawai S, Ikenoue N, Hatabu T, Ishikawa H, Matsumoto Y, Himeno K, Kano S. (2001). Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* **116**:73-79.
- Kazura JW, Aikawa M. (1980). Host defense mechanisms against nematode parasites: destruction of newborn *Trichinella spiralis* larvae by human antibodies and granulocytes. *J Immunol.* **124**:355-361.
- Kazura JW. (1981). Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse: eosinophil mediated destruction of newborn larvae *in vitro*. *J Infect Dis.* **143**:712-718.
- Kim H, Lee TH, Park ES, Suh JM, Park SJ, Chung HK, Kwon OY, Kim YK, Ro HK, Shong M. (2000). Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem.* **275**:18266-18270.

- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. (1987). The function of catalase-bound NADPH. J Biol Chem. **262**:660-666.
- Kroemer G, Reed JC. (2000). Mitochondrial control of cell death. Nature Medicine. **6**:513-519.
- Kuppusamy P, Zweier JL. (1989). Characterization of free radical generation by xantine oxidase. J Biol Chem. **264**:9880-9884
- Larralde C, Sciutto E, Terrazas L, Fragoso G, Trueda L, Lemua D, Lomeli C, Tapia G, Momtoya RM. (1989). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factor involved in susceptibility. Acta Leiden. **57**:131-134
- Lu W, Egerton GL, Bianco AE, Williams SA. (1998). Thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus*: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. Mol Biochem Parasitol. **91**:221-235.
- Marnett LJ. (2000). Oxyradicals and DNA damage. Carcinogenesis. **21**:361-370
- May JM. (1999). Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. FABES J. **13**:995-1006.
- McGonigle S, Curley GP, Dalton JP. (1998). Peroxiredoxins: a new antioxidants family. Parasitol Today. **14**:139-145.
- Meister A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. J Biol Chem. **269**:9397-9400.
- Mendirata S, Qu Z-C, May JM. (1998). Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes rol of thioredoxin reductase. Free Rad Biol Med. **25**:221-228
- Mkoji GM, Smith JM, Prichard RK. (1988). Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: evidence for their role in protection of the adult worms against oxidant killing. I J Parasitol. **18**:667-673.
- Nordberg J, Arnér ESJ. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med. **31**:1287-1312.

- Ou X, Thomas GR, Chacun MR, Tang L, Selkrik ME. (1995). *Brugia malayi*: differential susceptibility to metabolism of hydrogen peroxide. *Exp Parasitol.* **80**:530-540.
- Preux PM, Melaku Z, Druet-Cabanac M. (1996). Cysticercosis and neurocysticercosis in Africa : current status. *Neurol Infect Epidemiol.* **1**:63-68.
- Rhee SG, Chang TS, Bae YS, Lee SR, Kang SW, Jeong W. (2003). Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol.* **14**:S211-215.
- Rowe JD, Tchaikovskaya T, Shintani N, Listowsky I. (1998). Selective expression of a glutathione S-transferase subclass during spermatogenesis. *J Androl.* **19**:558-567.
- Rzepczyk CM, Bishop CJ. (1984). Immunological and ultrastructural aspects of the cell-mediated killing of *Dilofilaria immitis* microfilariae. *Parasite Immunol.* **6**:436-457.
- Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos MN. (1995). Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: Factors related to effective protection. *Vet Parasitol.* **60**:53-67.
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbs Infect.* **2**:1875-1890.
- Salinas AE, Wong MG. (1999). Glutathione S-transferases-a review. *Curr Med Chem.* **6**:279-309.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sayed AA, Williams DL. (2004). Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* **279**:26159-26166.

Secretaría de Salud. Boletín Semanal de Epidemiología, 1994-1996. México, D. F. Dirección General de Epidemiología, 1996.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud. México. Num. 2, Vol. 20. Sem. 2, del 5 al 11 de enero del 2003.

Selkirk ME, Smith VP, Thomas GR, Gounaris K. (1998). Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *Inter J Parasitol.* **28**:1315-1332.

Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem.* **275**:20346-20354.

Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, Hayes JD. (1997). Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem J.* **326**:837-846.

Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* **215**: 213-219.

Smith BP, Selkirk ME, Gounaris K. (1998). *Brugia malayi* resistance of cuticular lipids to oxidant-induced damage and detection of α -tocopherol in the neutral lipid fractions. *Exp Parasitol.* **88**:103-110.

Stadman ER. (2000). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1-24.

Takahashi MA, Asada K. (1983). Superoxido anion permeability of phospholipids membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys.* **226**:558-566.

Test ST, Weiss SJ. (1984). Quantitative and temporal characterization of the extracellular H₂O₂ pool generated by human neutrophils. *J Biol Chem.* **259**:399-405.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Nat Aca Sci, USA.* **70**:4350-4354.

- Tsang VCW, Brand JA, Boyer A.E. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing of human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Inf Dis.* **159**:50-59.
- Tsuji N, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Yoshiara S. (2000). Cloning and characterization of a peroxiredoxin from the swine rounworm *Ascaris suum*. *Inter J Parasitol.* **30**:125-128.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg Flohe L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* **252**:38-53.
- Vivanco-Perez N, Jiménez L, Mendoza-Hernandez G, Landa A. (1999). Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *T. solium* (SGST). *Parasitol Res.* **88**:398-404.
- Vivanco-Perez N, Jiménez L, Mendoza-Hernandez G, Landa A. (1999). Characterization of glutathione S-transferase of *T. solium* (SGST). *J Parasitol* **85**:448-453.
- Vogelstein B, Gillespie D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA.* **76**:615-619.
- WHO. (1983). Guidelines for surveillance prevention and control of taniasis/cysticercosis. Gemmell M, Matyas Z, Pawloswky Z, Soulsby EJJ, Larralde C, Nelson GS, Rosicky B. (eds.).WHOVPH/83. Word Health Organization, Geneva.
- Willms K, Merchant MT, Díaz S, Arcos L. (1982). Host-parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds) *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press, New York, pp 397-411
- Weiss SJ, Test ST, Eckmann CM, Roos D, Regiani S. (1986). Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science.* **234**:200-203.
- 1 Wood ZA, Schroder E, Harris RJ, Poole LB. (2003). Structure, mechanisms and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* **28**:32-40.
- Yan SY, Wang MI, Xue QC. (1990). Cerebral cysticercosis. *Surg Neurol.* **34**:86-93.

- Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, Rhee SG. (2002). Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine sulfinic acid. *J Biol Chem.* **277**:38029-38036.
- Yoshino K. (1933) Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part I. On the hatching of the eggs of *Taenia solium*. *J Med Ass Formosa.* **32**:139-141.
- Zhao T, Singhal SS, Piper JT, Cheng J, Pandya U, Clark-Wronski J, Awasthi S, Awasthi YC. (1999). The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* **367**:216-224.
- Zimniak L, Awasthi S, Srivastava SK, Zimniak P. (1997). Increased resistance to oxidative stress in transfected cultured cells overexpressing glutathione S-transferase mGSTA4-4. *Toxicol Appl Pharmacol.* **143**:221-229.

