

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS

ESTRUCTURA DEL GEN DE LA PEROXIREDOXINA 2-
CYS (PRX 2-CYS) DE *Taenia solium* Y ANÁLISIS DE SU
REGIÓN PROMOTORA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

QFB. FELIPE VACA PANIAGUA

TUTOR: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA

México, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este proyecto de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa Piedra. Para realizar este proyecto se contó con la asesoría de la Dra. Imelda López Villaseñor y el Dr. Luis Felipe Jiménez García.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el contrato 80134-M y por la Dirección General de Asuntos de Personal Académico dentro del Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del contrato IN207507-3.

El autor recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Posgrado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas mediante el Programa de becas para el Posgrado con el número de becario 195340.

El jurado asignado para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas fue el siguiente:

Presidente: Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Secretario: Dr. Abraham Landa Piedra

Vocal: Dr. Roberto José Hernández Fernández

Vocal: Dr. Ángel Zaráin Herzberg

Vocal: Dra. Rosaura Hernández Rivas

AGRADECIMIENTOS

Agradezco mucho al Dr. Abraham Landa por la amistad, confianza, empeño y compromiso que tuvo conmigo a lo largo de estos años de trabajo en su laboratorio. Su ejemplo me dejó una gran motivación por la actividad científica.

Agradezco de manera especial al Dr. Luis Felipe Jiménez García por su fina y elegante asesoría científica. Los diálogos que sostuvimos fueron una experiencia muy enriquecedora.

Con gran afecto agradezco a la Dra. Imelda López Villaseñor su generoso apoyo, así como sus conspicuas observaciones y sugerencias; todas me sirvieron de inspiración y fueron muy valiosas para mi formación académica y científica.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a los investigadores que leyeron y revisaron esta tesis: Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dr. Roberto Hernández Fernández, Dr. Javier Espinosa Aguirre y Dr. Ángel Zaráin Herzberg. Sus comentarios y apoyo fueron muy importantes en la última fase de mi formación.

Agradezco mucho a mis compañeros de laboratorio: M. en C. Ricardo Parra Unda, QFB. Victor Sanabria Ayala, M. en C. Alicia Ochoa Sánchez, Dra. Lucía Jiménez, QFB. Óscar Rodríguez Lima, QFB. Omar “Capo” Guzmán, Biol. Áramis Roldán y Biol. Viridiana Seng. Fue un verdadero gusto trabajar con ustedes.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México el privilegio de pertenecer al proyecto más grande e importante de nuestro país; por el acceso a su invaluable riqueza académica, científica y cultural.

A Yolanda, Gloria, Sergio y Moisés, mis cuatro bases.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
FIGURAS	9
ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN	11
Neurocisticercosis	11
Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	13
<i>T. crassiceps</i> : modelo de cisticercosis murina y ciclo de vida.....	17
Evasión de la respuesta inmune	17
Peroxiredoxinas.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	22
Objetivo específicos	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
Materiales biológicos	23
Extracción de ADN genómico (ADNg) de <i>T. solium</i> y <i>Taenia crassiceps</i>	23
Clonación del gen de la Prx 2-Cys de <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia crassiceps</i>	23
Determinación del sitio de inicio de la transcripción.....	24
Preparación de proteínas nucleares de <i>T. solium</i>	25
Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA).....	26
Determinación de la viabilidad y de la concentración letal 50 a H ₂ O ₂ de <i>T. crassiceps</i>	27
Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena la de la Polimerasa (RT-PCR).....	27
Inmunoelectrotransferencia.....	28
RESULTADOS	29
Clonación de la secuencias genómicas de los genes <i>Ts2-CysPrx</i> y <i>Tc2-CysPrx</i>	29
Determinación del sitio de inicio de la transcripción de los genes <i>Ts2-CysPrx</i> y <i>Tc2-CysPrx</i>	31
Preparación de proteínas nucleares de <i>T. solium</i>	32
Determinación de interacciones ADN-Proteína en el promotor de <i>Ts2-CysPrx</i>	33

Viabilidad de cisticercos <i>T. crassiceps</i> y expresión de Tc2-CysPrx bajo condiciones oxidantes.....	35
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXOS	55

RESUMEN

El género *Taenia* es capaz de vivir durante largos periodos en sus hospederos. Se ha demostrado que este establecimiento está relacionado a sus eficientes mecanismos de defensa contra el sistema inmune del hospedero y su alta tolerancia al estrés oxidativo. En este trabajo se describen las secuencias genómicas de un gen que codifica para la Peroxiredoxina 2-Cys típica de *Taenia solium* y *T. crassiceps* (*Ts2-CysPrx*, *Tc2-CysPrx*), las cuales son 94% idénticas en su secuencia de aminoácidos. Ambos genes tienen la misma arquitectura genómica, mostrando una caja TATA y una secuencia iniciadora (Inr) en su promotor proximal, dos exones separados por un intrón tipo III de 67 pb y un único sitio de inicio de la transcripción localizado dentro del Inr. Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética mostraron que una sonda del gen *Ts2-CysPrx* que contiene la caja TATA y el Inr es capaz de unir proteínas nucleares aisladas de cisticercos de *T. solium*. Experimentos para determinar la expresión de *Tc2-CysPrx* en cisticercos de *T. crassiceps* con y sin condiciones oxidantes, demostraron que la expresión de este gen no cambia, por lo que se considera un gen antioxidante de mantenimiento. Este estudio describe por primera vez la estructura de un gen para la Prx 2-Cys típica en el género *Taenia*.

ABSTRACT

The *Taenia* genus is capable of living for long periods within its hosts. Reports have showed that this successful establishment could be related to its efficient defense mechanisms against host immune response and its high tolerance to oxidative stress. In this work we describe the genomic sequences of the antioxidant *Taenia solium* and *T. crassiceps* typical 2-Cys peroxiredoxins (*Ts2-CysPrx*, *Tc2-CysPrx*) genes, which are 94% identical in primary amino acid sequence. Both genes have the same genomic architecture, showing a TATA box and Initiator (Inr) sequence in their proximal promoter, two exons split by a 67 bp type III intron and one unique transcription start site located inside the Inr box. Electromobility shift assays showed that a *Ts2-CysPrx* probe containing the TATA and Inr sequences bound to proteins extracted from nuclei of *T. solium* cisticerci. Through expression experiments of *Tc2-CysPrx* gene with and without an oxidative insult with H₂O₂, we demonstrate that the *Tc2-CysPrx* gene is not overexpressed, showing a behavior of an antioxidant housekeeping gene. This study describes for first time the gene structure of a typical 2-Cys Prx in the *Taenia* genus.

FIGURAS

Figura 1.....	13
Figura 2.....	14
Figura 3.....	15
Figura 4.....	16
Figura 5.....	19
Figura 6.....	19
Figura 7.....	30
Figura 8.....	32
Figura 9.....	33
Figura 10.....	34
Figura 11.....	35
Figura 12.....	37

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
Act	Actina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNsn	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
<i>E. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
g	Gramos
GST	Glutación transferasa
h	Horas
Inr	Secuencia iniciadora
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NF-1	Factor nuclear 1
Nrf-2	Factor nuclear relacionado a eritrocitos tipo 2
nt	Nucleótidos
O ₂ ⁻	Anión superóxido
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos y solución salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Prx	Peroxiredoxina
RACE	Amplificación Rápida de extremos de ADNc
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SAPK	Proteínkinasa activada por estrés
SOD-Cu/Zn	Superóxido dismutasa de cobre/zinc
Sp1	Proteína específica 1
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
Tc2-CysPrx	Peroxiredoxina 2-Cys de <i>T. crassiceps</i>
Ts2-CysPrx	Peroxiredoxina 2-Cys de <i>T. solium</i>
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
ufp	Unidades formadoras de placa
xg	Constante de la gravedad

INTRODUCCIÓN

Taenia solium es el agente causal de la taeniosis y la cisticercosis, padecimientos de gran importancia en salud pública. Este parásito se encuentra principalmente en países en condiciones de pobreza, principalmente en Asia, África y Latinoamérica, los cuales tienen poblaciones que carecen de infraestructura sanitaria, inspección de cerdos y agua potable. En estos lugares se realiza la crianza casera y distribución clandestina de cerdos y se tienen hábitos que favorecen la presencia del parásito; como lo son las malas prácticas de higiene personal y el consumo de comida en lugares con condiciones insalubres (figura 1). Se cree que actualmente existen alrededor de 50 millones de personas infectadas con *T. solium* y que aproximadamente 50,000 personas mueren anualmente a causa de la cisticercosis (Eddi *et al.*, 2003). Asimismo, existen reportes que indican un aumento en el número de casos en países desarrollados con un alto índice de migración de individuos de zonas endémicas (DeGiorgio *et al.*, 1995; Shantz *et al.*, 1992; Shantz *et al.*, 1998; White, 2000), lo cual ha generado un repunte en la diseminación del parásito en zonas geográficas donde se había erradicado (figura 1).

Neurocisticercosis

La neurocisticercosis es la forma más grave de la cisticercosis y es la primera causa de epilepsia tardía en zonas endémicas (Medina *et al.*, 1990; Del Brutto y Noboa, 1991; García *et al.*, 1993). Esta enfermedad se adquiere cuando el parásito se aloja en el sistema nervioso central, lo que puede provocar lesiones cerebrales que causan cefalea, convulsiones, vómito, mareo, epilepsia, cambios de personalidad, déficit sensorial, trastornos de lenguaje, movimientos involuntarios, deterioro intelectual, alucinaciones, comportamiento violento, confusión, demencia, hipertensión endocraneal o la muerte (White, 2000). Estas manifestaciones clínicas son comunes a distintos desórdenes neurológicos y no existen signos patognomónicos de la neurocisticercosis.

La obtención de información epidemiológica sobre la cisticercosis se dificulta por diversos factores tales como la pobre o nula vigilancia epidemiológica, alto número de infecciones asintomáticas, pleomorfismo de las manifestaciones clínicas, carencia de pruebas serológicas con límite de detección de un solo cisticerco y necesidad de estudios de neuroimagen de alto costo en el diagnóstico (Sotelo y Del Brutto, 2000). Estos factores repercuten en la ausencia de cifras epidemiológicas reales, lo cual ha originado la falsa percepción de que la cisticercosis es un padecimiento de poca importancia. Por ejemplo, estudios epidemiológicos han demostrado que la cisticercosis humana en México tiene una presencia alta, que abarca desde 4-12% de seropositividad en zonas endémicas. A nivel mundial, las cifras también reflejan una alta seroprevalencia en zonas endémicas. Por ejemplo, en Perú éstas alcanzan el 21%, mientras que en Bolivia, Guatemala y Ecuador llegan hasta 10, 17 y 22%, respectivamente (Flisser *et al.*, 2003). Así mismo, en los continentes Asiático y Africano se han registrado valores seropositivos tan altos como 50% en Irian Jaya, Indonesia; 16% en Sichuan, China y de hasta el 1% de la población total de Camerún (Subahar *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Praet *et al.*, 2009).

A este respecto, hay algunos estudios en donde se reportan estimaciones de las pérdidas económicas asociadas a la cisticercosis en distintos países. En Camerún el costo anual de la cisticercosis se calcula en 10,255,202 de Euros (14,370,616 dólares), mientras que en Sudáfrica va de 18-34,000,000 dólares y en Nigeria se estima en 25,000,000 dólares (Praet *et al.*, 2009; Carabin *et al.*, 2006; Zoli *et al.*, 2003). Asimismo, en México se calculó un gasto de 14,500,000 dólares por cuidados intrahospitalarios para 2700 pacientes con neurocisticercosis en 1986 (Flisser, 1988). Estos montos económicos reflejan el gran costo social que tiene la cisticercosis en los países pobres, el cual se suma a la grave situación de pobreza y marginación que impacta la calidad de vida de sus habitantes.

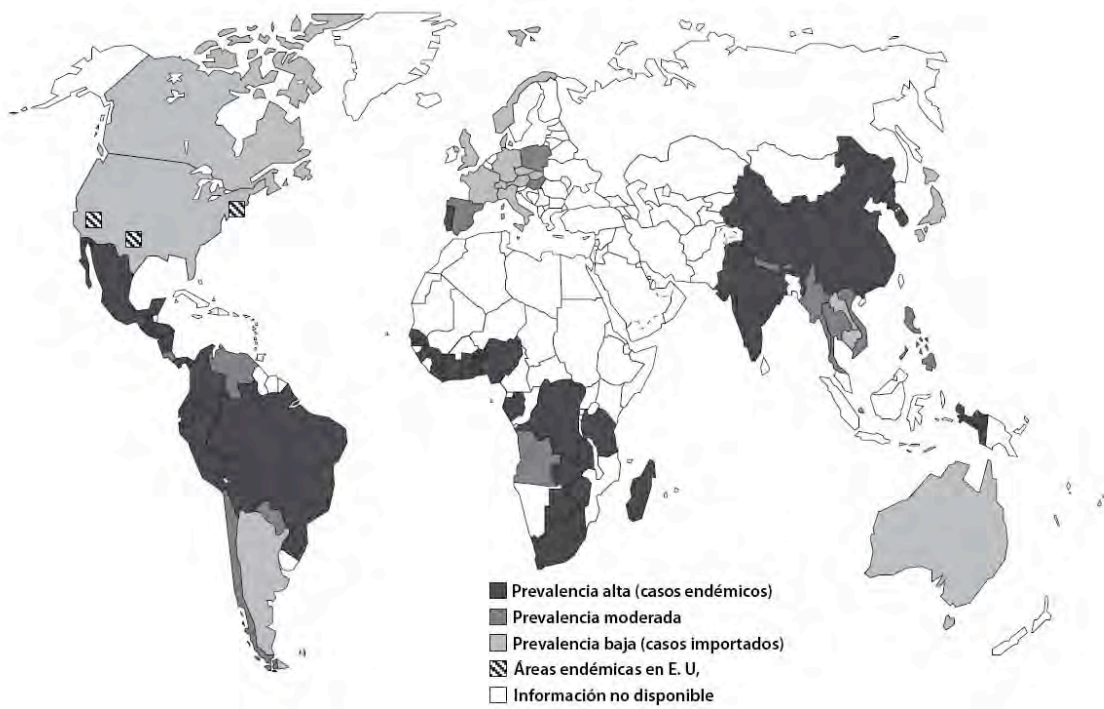


Figura 1. Distribución geográfica de la cisticercosis. Modificado de Román *et al.*, 2000.

Ciclo de vida de *T. solium*

Taenia solium tiene tres estadios de vida: el adulto, el huevo y la larva. El ciclo de vida empieza cuando el humano (hospedero definitivo) infectado con el gusano adulto libera huevos del parásito en las heces. Los huevos son estructuras esféricas que miden de 30 a 45 μm de diámetro que están rodeados por una delgada membrana hialina que resguarda una gruesa pared estriada llamada embrióforo (Flisser y Malagon, 1989). Dentro del embrióforo se aloja la oncosfera o embrión hexacanto, llamado así por poseer tres pares de ganchos (figura 2). Al ser ingeridos por el cerdo (hospedero intermediario), los huevos son atacados por los jugos gástricos y enzimas proteolíticas en el estómago, proceso mediante el cual se digiere el embrióforo y se libera a la oncosfera. Al llegar al intestino delgado, las oncosferas se enfrentan a las secreciones biliares, las cuales originan su activación y penetración del epitelio intestinal, por medio de la secreción de enzimas proteolíticas del parásito. De esta forma alcanzan los capilares sanguíneos y linfáticos, y se distribuyen a todo el organismo, como el músculo estriado, órganos como el hígado, corazón, pulmones, así como el cerebro. Una vez que se establecen las oncosferas en el tejido, comienzan

a desarrollarse hasta convertirse en cisticerco, esto tarda al menos 10 semanas. De igual forma, cuando el ser humano ingiere los huevos del parásito mediante contaminación fecal-oral del portador del gusano adulto o por el consumo de alimentos contaminados con huevos del parásito, las oncosferas se van a distribuir por sus tejidos de la misma manera que lo hacen en el cerdo.



Figura 2. Estructura de los huevos de *Taenia solium*. Fotografía de microscopía de luz donde se pueden observar los ganchos de la oncosfera (A). Micrografía electrónica de barrido de un corte de huevo donde se observa una oncosfera dentro del embrióforo. Modificado de Sciutto *et al.*, 2000.

El cisticerco o larva es una vesícula blanquecina esférica llena de fluido, la cual tiene un tamaño de 0.5-1.5 cm, que contiene en su interior a la larva con su escólex enrollada en forma de espiral. Al espacio entre la pared de la vesícula interior y la larva invaginada se le conoce como el canal espiral (Figura 3). Se ha reportado que los cisticercos pueden permanecer vivos en el hospedero hasta por 15 años. Las larvas ingresan al ser humano mediante el consumo de carne de cerdo insuficientemente cocida que está infectada con larvas viables del parásito. El cisticerco comienza su etapa de activación al entrar en contacto con el ácido gástrico y las secreciones biliares del hospedero. La evaginación o liberación del escólex comienza con el ensanchamiento de la apertura de la membrana vesicular y concluye cuando el escólex y el cuello emergen de la vesícula interior del cisticerco y quedan expuestos al medio intestinal (Rabiela *et al.*, 2000).

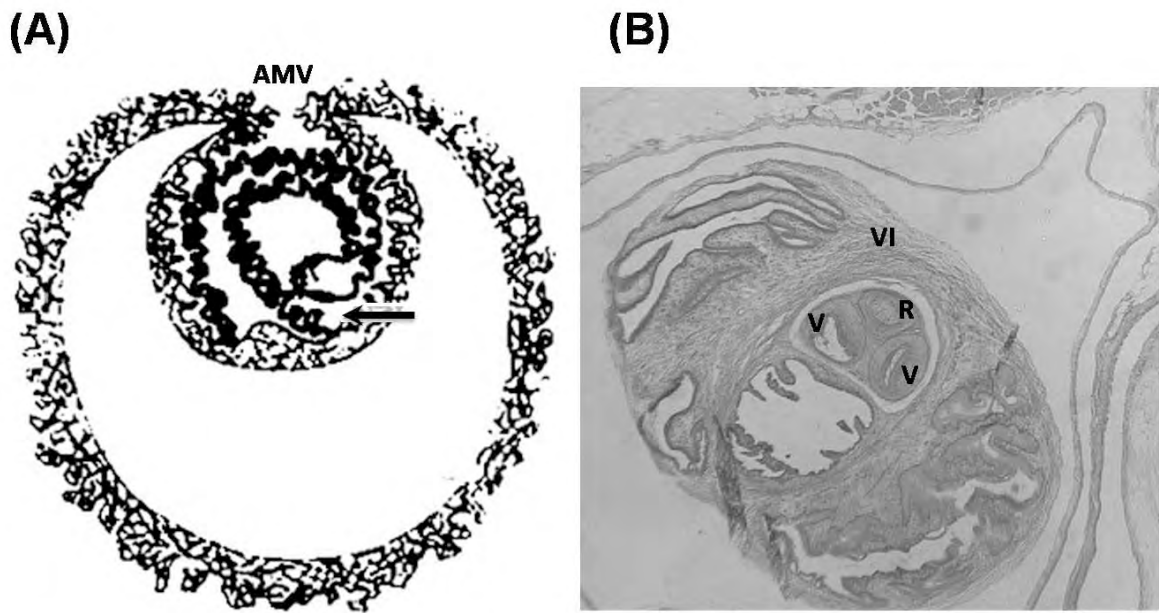


Figura 3. Estructura del cisticerco de *T. solium*. (A) Esquema en donde se aprecia el escólex invaginado del parásito, el canal espiral (flecha) y la apertura de la membrana vesicular (AMV). Modificado de Rabiela MT *et al.*, 2000. (B) Microscopía óptica de un corte de cisticerco obtenido de tejido muscular de cerdo teñido con hematoxilina eosina férrica. Dos ventosas (V) y el rostelo armado (R) se observan en el escólex (VI). Aumento 40X. Modificado de <http://workforce.cup.edu/bucklelew/Taenia%20solium%20cysticercus.htm>.

El escólex es el órgano de fijación del parásito; tiene cuatro ventosas y una doble corona de ganchos que utiliza para adherirse a la pared del duodeno (figura 4). A partir de este momento, éste parásito hermafrodita inicia el proceso de septación, en el cual se producen segmentos o proglótidos a partir del cuello del gusano. El conjunto de proglótidos unidos entre sí en forma de cadena o de cinta se denomina estróbilo y puede alcanzar varios metros de largo. Los proglótidos tienen una fase de maduración que se distingue por la evolución de aquellos con órganos reproductores inmaduros a proglótidos con órganos de reproducción maduros. En éstos últimos se produce la autofecundación, por medio de la cual se originan los proglótidos grávidos. Los proglótidos grávidos contienen aproximadamente 50,000 huevos en su interior y se liberan del extremo distal del parásito o se rompen dentro del intestino, lo que causa la eliminación de huevos en las heces. La primera expulsión de huevos de *T. solium* generalmente ocurre de dos a tres meses después de la infección (Silverman, 1954).

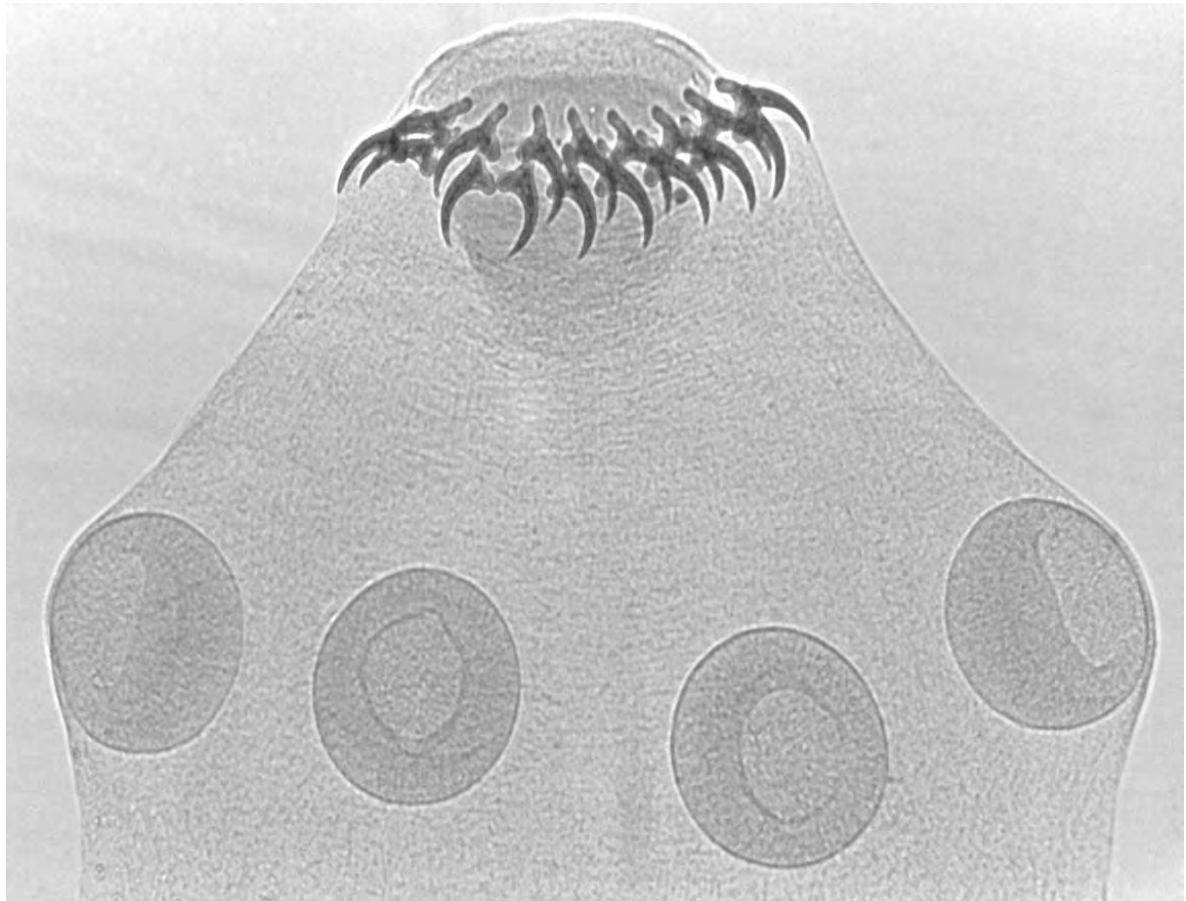


Figura 4. Estructura del escólex de *T. solium*. Se pueden observar sus cuatro ventosas y su doble corona de ganchos en el rostelo. Tomado de http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Taenia_solium/Home.html.

***T. crassiceps*: modelo de cisticercosis murina y ciclo de vida**

Taenia crassiceps es un parásito de importancia científica que ha sido utilizado como modelo de estudio debido a su cercanía filogenética con *T. solium* (Vargas-Parada *et al.*, 2001; Toledo *et al.*, 1999; Espíndola *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003). Ambos ténidos comparten características morfológicas, de ciclo de vida, genéticas y de inmunogenicidad (Larralde *et al.*, 1990; Garcia *et al.*, 1998; Pardini *et al.*, 2002;

Arruda *et al.*, 2005). No obstante, a diferencia de *T. solium*, los cisticercos de *T. crassiceps* tienen la capacidad de reproducirse por gemación cuando se inoculan en la cavidad peritoneal de roedores (Freeman, 1962). Esta característica permite la producción de cisticercos en el laboratorio por medio de pases consecutivos en ratones, lo cual proporciona una población homogénea de parásitos (Sciutto *et al.*, 1991). *Taenia crassiceps* parasita hospederos caninos como *Canis lupus* o *Canis vulgaris* (hospedero definitivo), así como a roedores como *Microtus arvalis*, *Mus musculus*, *Peromyscus vulgaris*, *Ratus norvegicus* (hospedero intermediario; Freeman, 1964). Su ciclo de vida es muy similar al de *T. solium* y comienza con la eliminación de los huevos del parásito en las heces del hospedero definitivo que, al ser consumidos por roedores, liberan la oncosfera en el epitelio intestinal. Por medio de enzimas proteolíticas las oncosferas penetran el epitelio intestinal y se distribuyen por vía sanguínea a los tejidos del hospedero. De esta forma, las oncosferas se desarrollan a cisticerco, los cuales son ingeridos por el hospedero definitivo cuando consume la carne de su presa, el hospedero intermediario.

Evasión de la respuesta inmune

Se ha descrito que las infecciones crónicas ocasionadas por ténidos, en donde los parásitos permanecen durante años, modifican profundamente la respuesta inmune del hospedero (Herrera *et al.*, 1994; Spolski *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 1990). Uno de los mecanismos de evasión inmune más estudiados es la secreción de paramiosina. Se demostró que esta proteína tiene propiedades de fibronectina, lo cual le permite unirse a la colágena del hospedero, dirigiendo la respuesta inmune a zonas alejadas del tejido del parásito, además de que es capaz de inhibir al complemento (Laclette *et al.*, 1992; Landa *et al.*, 1993; Plancarte *et al.*, 1983). También se ha descrito que los cisticercos de *T. solium* liberan glicoproteínas de su tegumento para dirigir la respuesta inmune a sitios alejados del parásito (Álvarez *et al.*, 2008) y que tienen receptores para la fracción Fc de los anticuerpos (Kalinna y McManus, 1993; Baz *et al.*, 1998). Otros mecanismos de evasión inmune del parásito incluyen la secreción de proteasas que inducen apoptosis en linfocitos T, proteasas que hidrolizan a los anticuerpos y la secreción de un factor de metacéstodo que inhibe la producción de citocinas por

leucocitos (Tato *et al.*, 2004; Baig *et al.*, 2005; Arechavaleta *et al.*, 1998). También se ha propuesto que la defensa antioxidante tiene un papel importante en el establecimiento de los helmintos parásitos, ya que existen observaciones que implican a las especies reactivas de oxígeno (ERO) como moléculas capaces de acabar con estos organismos (Callahan *et al.*, 1988; Mkoji *et al.*, 1988; Henkle-Dührsen y Kampkötter, 2001; Vaca-Paniagua *et al.*, 2008). Por ejemplo, el abatimiento de la expresión de la peroxidasa Prx1 del tremátodo *Schistosoma japonicum* mediante ARN de interferencia incrementó la sensibilidad del parásito al peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; Kumagai *et al.*, 2009). Igualmente, se ha demostrado que las larvas del céstodo *Echinococcus granulosus* son susceptibles a la acción oxidante del óxido nítrico y que la expulsión del nemátodo intestinal *Nippostrongylus brasiliensis* correlaciona con la producción de H_2O_2 y anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por parte del hospedero (Batra *et al.*, 1993; Steers *et al.*, 2001). A este respecto, en *T. solium* se han reportado diferentes enzimas involucradas en la defensa antioxidante, tales como una superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD-Cu/Zn), dos glutatión transferasas (GST) y una peroxiredoxina 2-Cys típica (Ts2-CysPrx; Castellanos-González *et al.*, 2002; Vivanco-Pérez *et al.*, 2002; Torres-Rivera y Landa, 2008).

Peroxiredoxinas

Las peroxiredoxinas (Prx) son peroxidases que reducen al peróxido de hidrógeno, distintos hidroperóxidos y al peroxinitrito a agua, al alcohol correspondiente y a nitrato, respectivamente (figura 5; Chae *et al.*, 1994). Estas enzimas están conservadas evolutivamente desde arqueobacterias hasta humanos (Rhee *et al.*, 2001).

¡Error! Objeto incrustado no válido.

Figura 5. Reacciones catalizadas por las Prx 2-Cys típicas.

Las Prx no requieren de metales, coenzimas o grupos prostéticos y en plathelminths están acopladas al sistema enzimático de reducción de la tioredoxina-tioredoxinaglutación reductasa (Trx-TGR; figura 6), el cual utiliza los electrones del

NADPH para reducir sustratos (figura X; Rhee *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2004). Se clasifican en 1-Cys y 2-Cys, dependiendo de si utilizan una o dos cisteínas para llevar a cabo el ciclo catalítico. Las Prx 1-Cys poseen únicamente una cisteína en su sitio activo en el motivo amino-terminal PVCT (N-Cys), mientras que las 2-Cys contienen la N-Cys en el motivo FVCP y la cisteína carboxi-terminal del motivo EVCP (C-Cys). A su vez, las peroxidredoxinas 2-Cys se clasifican en típicas y atípicas. Las típicas son enzimas homodiméricas con los monómeros orientados de forma antiparalela, en donde la N-Cys de una subunidad está enfrente de la C-Cys de la otra. Las Prx 2-Cys atípicas son monoméricas.

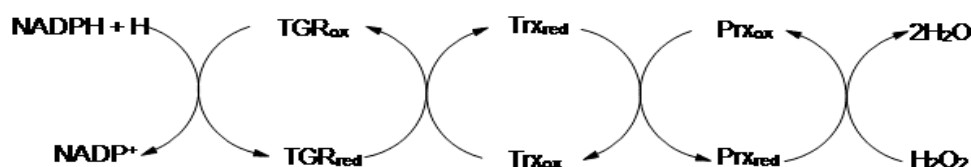


Figura 6. Sistema de la tioredoxina-tioredoxinaglutaína reductasa en plathelminintos (Salinas *et al.*, 2004).

En las tres clases de Prx el primer paso de la catálisis es el mismo, el cual consiste en la formación del grupo tiolato de la N-Cys⁻ y el ataque nucleofílico del tiolato al sustrato peróxido. El grupo tiolato de la N-Cys (N-Cys-S⁻) es estabilizado por aminoácidos con cadenas laterales cargadas positivamente. El grupo tiolato reduce al peróxido por medio de un ataque nucleofílico, produciendo el grupo ácido sulfénico (N-Cys-SOH) en dicho residuo más agua (Ellis y Poole, 1997). En las Prx 2-Cys típicas la reacción genera un rearrreglo estructural del sitio activo, en el cual se expone el grupo N-Cys-SOH al disolvente. Esta modificación acerca la N-Cys-SOH a la C-Cys del monómero adyacente lo suficiente para que se forme un puente disulfuro entre ambos residuos en una reacción de condensación. En las Prx 2-Cys atípicas la C-Cys reacciona con la N-Cys de la misma cadena polipeptídica para formar un puente disulfuro intramolecular (Wood *et al.*, 2003b).

En las Prx 2-Cys típicas y atípicas el donador de electrones que reduce el puente disulfuro del sitio activo es la tioredoxina (Trx), la cual regenera los dos grupos tiol

de las cisteínas catalíticas, permitiendo la formación del grupo N-Cys-S⁻ para el comienzo de un nuevo ciclo catalítico. En las Prx 1-Cys se desconoce la identidad de la molécula o las moléculas que reducen al grupo N-Cys-SOH. Por otra parte, se ha demostrado que el grupo N-Cys-SOH de las Prx 2-Cys típicas puede alcanzar un estado de oxidación mayor, formando el grupo ácido sulfínico (N-Cys-SOOH). Esta modificación inactiva a la enzima y ocurre en altas concentraciones de H₂O₂. Esta “sobreoxidación” del sitio catalítico está ausente en todas las otras peroxididasas conocidas y es revertida por la sulfiredoxina.

Funciones reguladoras de las Prx 2-Cys típicas

Recientemente se ha demostrado que las Prx, además de ser enzimas antioxidantes, participan en la regulación redox. Se ha postulado que bajo condiciones normales, las Prxs reducen al H₂O₂, ejerciendo su acción antioxidante, mientras que en concentraciones intracelulares altas de H₂O₂ ocasionadas por la activación de receptores membranales las Prxs 2-Cys se inactivan de manera reversible el tiempo suficiente para que se lleve a cabo la señal (“apertura de la compuerta”; Wood *et al.*, 2003a). Los motivos responsables de la inactivación de las Prxs 2-Cys típicas son el GGLG y el YF, localizados en el extremo carboxi-terminal de las enzimas de organismos eucariontes. Durante el ciclo catalítico, en las Prx con N-Cys-SOH, estos motivos reguladores se encuentran enfrentados y ocasionan que el sitio catalítico se aleje de la C-Cys-SH, lo que impide la formación del enlace disulfuro. Este hecho permite que la N-Cys-SOH catalítica pueda reaccionar nuevamente con una molécula de H₂O₂ para producir la forma N-Cys-SOOH, que es la condición inactiva de la enzima. La inactivación es revertida por la enzima eucarionte sulfiredoxina (Srx) en una reacción dependiente de ATP (Biteau *et al.*, 2003). Esta reacción tiene una cinética lenta ($k_{cat} = 0.18/\text{min}$) que permite una acumulación subletal y temporal de H₂O₂ endógeno en un microambiente celular citosólico (Tong-Shin *et al.*, 2004). Este incremento en la concentración de H₂O₂ ocasiona que se oxiden residuos sensibles de Cys de proteínas con actividad de tirosinofosfatasa (inactivándolas) y de tirosincinasas (activándolas), lo cual se traduce en un aumento en la fosforilación de residuos de tirosina de proteíncinasas activadas por estrés (SAPK; Veal *et al.*, 2004). Esta señal

llega al núcleo y activa diferentes genes asociados a la respuesta antioxidante como *gpx1* y *srx1* que codifican para la glutatión peroxidasa 1 y la sulfiredoxina, respectivamente (Bozonet *et al.*, 2005). También se ha descrito que bajo condiciones de estrés oxidativo y estrés por calor, las Prx 2-Cys típicas de eucariontes forman decámeros que tienen actividad de chaperonas (Jang *et al.*, 2004). Esta actividad de chaperona permite que las Prx prevengan la desnaturalización de proteínas bajo condiciones de estrés (Kumsta y Jakob, 2009).

OBJETIVO GENERAL

Clonar y caracterizar el gen (región regulatoria y estructural) que codifica para la Prx 2-Cys de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*.

Objetivo específicos

- Clonar, secuenciar y analizar la región reguladora 5' (promotor) y la región estructural del gen de la Prx 2-Cys de *T. solium* y *T. crassiceps*.
- Evaluar la expresión de gen de la 2-Cys Prx en cisticercos de *T. crassiceps* bajo condiciones normales y de estrés oxidativo.
- Identificar sitios de unión de proteínas en el promotor.
- Determinar los sitios de inicio de la transcripción y traducción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales biológicos

Los cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos de cerdos infectados de forma natural, se lavaron tres veces con PBS estéril y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Los cisticercos de *T. crassiceps* (cepa WFU) empleados en los experimentos de expresión se extrajeron del peritoneo de ratones BALB/cAnN hembras inoculados con el parásito, se lavaron tres veces con PBS estéril y se preincubaron 4 horas en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con aminoácidos esenciales 10 mM (Sigma), penicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estreptomina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y piruvato 100 mM a 37°C en 0.5% de CO_2 (Everhart *et al* 2004).

Extracción de ADN genómico (ADNg) de *T. solium* y *T. crassiceps*

Se digirieron 1.5 g de cisticercos de *T. crassiceps* con proteinasa K por 2-3 h en Tris 50 mM, EDTA 1 mM y sarcosil 0.5%. La digestión se centrifugo a 3400 rpm por 15 min; se hicieron extracciones con fenol y cloroformo del sobrenadante. La fase acuosa se incubó con isopropanol por 10 min, se centrifugó a 1,000 xg por 10 min. El precipitado se resuspendió en etanol al 70% y se centrifugó como ya se mencionó. Las preparaciones se resuspendieron en TE y se almacenaron a 4°C , hasta su uso.

Clonación del gen de la Prx 2-Cys de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*

Para clonar el gen de la Prx 2-Cys de *Taenia solium* (*Ts2-CysPrx*) se tamizó una biblioteca de ADNg de *T. solium* digerido con *EcoRI* clonado en λ -ZAP (Stratagene, La Jolla, California) utilizando una sonda de ADN marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ de la

secuencia de ADNc del gen *Ts2-CysPrx*. El tamizaje primario consistió en infectar bacterias XL1-Blue con fagos de la biblioteca de biblioteca para generar 120 000 unidades formadoras de placa (ufp) en una caja de cultivo Luria sólido, estas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, para hibridarlas con la sonda marcada, 3 placas fueron positivas. Estas placas se volvieron a tamizar como antes, se obtuvieron 11 ufp positivas. A cada placa se le realizó un tercer tamizaje. Las placas positivas se caracterizaron mediante PCR y digestión con enzimas de restricción Eco RI, Bam HI, Hind III y Kpn I, para determinar el tamaño y similitud en las placas. Las placas positivas se convirtieron a plásmidos pBluescript utilizando el fago cooperador ExAssist (Stratagene). Las colonias bacterianas transfectadas con pBluescript se crecieron toda la noche en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina 100 µg/mL. Se purificó el plásmido por el protocolo estándar de lisis alcalina y se secuenció en un secuenciador ABI Prism modelo 373 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). El gen *Tc2-CysPrx* se clonó mediante PCR utilizando 100 ng de ADNg de *T. crassiceps* y con los oligonucleótidos PrxP5 y PrxTc diseñados a partir de secuencias conocidas 5' y 3' no codificantes del gen *Ts2-CysPrx* (PrxP5 5'-GTGAGCCAATGGGAACGCAG-3', PrxTc 5'-CAACCAGTTCAAAGAGTGGC-3'). El análisis de las regiones promotoras de ambos genes se realizó con el programa gratuito PROMO ubicado en la página http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3).

Determinación del sitio de inicio de la transcripción

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción se utilizó la técnica de amplificación de regiones 5' de ADNc (RACE, por sus siglas en inglés) empleando ARN total como templado de *T. solium* o *T. crassiceps* aislado con TRIzol (Invitrogen). Brevemente, se homogenizaron 100-200 mg de cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps* en TRIzol con un polytron en hielo. Se adicionaron 200 µL de cloroformo, el homogenado se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 xg 15 min. Después de varias extracciones con fenol y cloroformo, la fase acuosa se incubó con isopropanol por 10 min, se centrifugó a 7,500 xg por 10 min. El precipitado se resuspendió en etanol al 70% y se centrifugó como ya se mencionó.

Las preparaciones se resuspendieron en H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenaron a -70°C hasta su uso. La amplificación del extremo 5' no traducido de los transcritos se hizo con los estuches Smart RACE cDNA Amplification Kit y Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech), utilizando el cebador contrasentido Prx6R (5'-AACATCTTTGAGTTCACCATCGACAA-3') y el cebador sentido SMARTII (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3') para los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc-2CysPrx*. Para amplificar el fragmento 5' no traducido del gen pAT6 se utilizaron el cebador PAT6R (5'-AGGGAGGGGAAGACAGCACGAGG-3') y el SMARTII. El producto de PCR resultante de cada reacción se clonó en el vector pCRII para su secuencia.

Preparación de proteínas nucleares de *T. solium*

Para purificar proteínas nucleares de *T. solium* se homogenizaron 10 gr de cisticercos en 3 volúmenes de amortiguador de lisis (HEPES 20 mM pH 7.9, KCl 20 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Nonidet P40 0.5%, EDTA 0.2 mM, Pepstatin 1 μM, Leupeptin 0.6 μM, PMSF 0.2 mM, DTT 0.5 mM) con un polytron. El homogenado se filtró a través de gasa estéril. El filtrado se centrifugó a 1500 x g a 4°C y el precipitado se lavó 3 veces con el mismo amortiguador mencionado, después el precipitado se resuspendió en 4 mL de amortiguador de lisis, se agregó a un tubo con 10 mL de Ficoll al 5.7% y se centrifugó a 1000 x g por 1 min. Para la visualización de los núcleos se tomaron 100 μL de cada fase y se tiñeron con 80 μL de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma, 0.1 mg/mL) en la oscuridad por 15 min, las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon HFX-DX). Las fases con mayor contenido de núcleos se sometieron a otra ronda de fraccionamiento en Ficoll para obtener un enriquecimiento de núcleos. Esta fracción de núcleos se utilizaron para la extracción de proteínas nucleares mediante la adición de 400 μL de amortiguador de extracción (HEPES 20 mM, pH 7.9, KCl 1.2 M, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 25%, PMSF 0.2 mM, Pepstatin 1 μM, Leupeptin 0.6 μM). La preparación se incubó en hielo por 45 min en agitación suave para después ser centrifugada a 2500 x g por 10 min. El sobrenadante se dializó en 1 L de PBS por 3 h, se centrifugó a 10000

x g por 10 min a 4°C, se le determinó concentración de proteína por el modo de Bradford, se dividió en alícuotas y se almacenó a -70°C, hasta su uso.

Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA)

Para los ensayos de EMSA, se utilizó una sonda de 83 pb correspondiente a los sitios -42 a 41 relativos al sitio de inicio de la transcripción del gen *Ts2-CysPrx*, la cual se amplificó por PCR con los oligonucleótidos PrxP6 (5'-CAGGCGCTTCGCTATATTTGG-3') y Prx7R (5'-CCCGATGACAGCAGCAGC-3') y se purificó usando un sistema comercial (PCR Clean-up, Macherey-Nagel). Brevemente, se hizo una electroforesis del producto de PCR. El fragmento de agarosa con la banda correspondiente se cortó y se incubó a 50°C por 20 min, la solución se pasó a través de una columna de exclusión molecular y después se eluyó, obteniéndose el producto de PCR. La sonda pura se marcó en los extremos 5'-fosfato con 20 U de T4 cinasa (Promega) y 50 µ Ci de 5' [γ 32P]dCTP en 50 µ L. Las reacciones de interacción ADN-Proteína se hicieron en Hepes 15 mM, KCl 70 mM, DTT 0.75 mM, Ficoll 400 0.225%, 2 µg poli (dI-dC), ASB 100 µg/mL, espermidina 3 mM y 50,000 cpm de la sonda. Antes de agregar el extracto de proteínas nucleares, todos los componentes de la reacción en el tubo fueron incubados en un baño con agua hirviendo por 5 min y colocados en hielo por 5 min. Para los ensayos de competencia se agregaron a la reacción 25-100 veces los microgramos de sonda sin marcar (competidor homólogo) y un oligonucleótido no relacionado (5'-ATTCTAGACGAATCATCAGAGAAGTCTTC-3'; competidor heterólogo). Después de agregar el extracto nuclear (5, 10 y 15 µg), la mezcla fue incubada 20 min a temperatura ambiente y posteriormente los complejos ADN proteína se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 5% en 0.5X de TBE. Los geles se secaron al vacío, se expusieron a placas (Fujifilm) toda la noche y se revelaron en un Phosphorimager Fujifilm FLA-5100.

Determinación de la viabilidad y de la concentración letal 50 a H₂O₂ de *T. crassiceps*

Después de la preincubación de los cisticercos en medio RPMI, los parásitos se incubaron inmediatamente en dicho medio con 1-8 mM de H₂O₂ por 1 h a 37°C en 5% de CO₂. Se lavaron los parásitos en PBS y se incubaron en 0.2 mL de bñlis de cerdo diluída 1:3 en medio RPMI por 30-60 min. Se asumió la viabilidad de los parásitos como la capacidad de evaginar su escólex completamente, la cual fue observada en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100). Para obtener la concentración letal 50 (CL₅₀) se graficó el promedio de viabilidad ± desviación estándar (n=8) y se determinó la concentración en la cual la viabilidad es 50%.

Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena la de la Polimerasa (RT-PCR)

Se utilizaron 3 grupos de cisticercos de *T. crassiceps* para los experimentos de expresión: 1) incubados en medio por 0, 1, 4 y 24 h; 2) incubados en medio con H₂O₂ (0.25, 0.5, 1 y 2 mM) por 30 min; y 3) incubados en medio con H₂O₂ 1 mM por tiempos de 0, 0.5, 1, 2, 3 y 24 h. Todos los grupos fueron preincubados 4 h antes de la adición de medio solo o con H₂O₂. La expresión de ARNm para los genes usados se determinó por RT-PCR con el estuche One Step RT-PCR (Invitrogen) usando 1 µg de ARN total de *T. crassiceps* como templado y los oligonucleótidos PRX-3 (5'-CTCCGTGGTCTCTTTATCA-3') and PRX-9R (5'-CTATCTTGAGCTCATGAACG-3'), diseñados a partir de ADNc de la *Ts2-CysPrx* (Molina-López *et al.*, 2006). La amplificación de β -actina se realizó con los oligonucleótidos PAT6-5' (5'-TCCGGTATGTGCAAAGCC-3') y PAT6-3' (5'-GTGATGCCAGATCTTCTCC-3'); tomados de Campos *et al.*, 1990). Empíricamente determinamos que en 30 ciclos de amplificación en la PCR todos los productos estaban en el rango lineal de la reacción y no en la saturación. El programa usado en todas las reacciones fue 50°C por 30 min para la reacción de transcripción inversa y 30 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 1 min, of 72°C por 1 min; y una extensión final

de 2°C por 5 min. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

Inmunoelectrotransferencia

Como ya se mencionó parásitos de los mismos grupos de cisticercos de *T. crassiceps* mencionados anteriormente fueron usados para preparar extractos de proteínas. Aproximadamente 60 mg de tejido fueron sonicados 4 veces a 40 W por 1 min dejando 1 min en hielo entre cada pulso en 500 µL de amortiguador de lisis (Urea 8 M, CHAPS 0.5 M, Pepstatin 1 µM, Leupeptin 0.6 µM, PMSF 0.2 mM, DTT 0.5 mM). Cien microlitros de la suspensión del parásito fueron purificados con el estuche 2-D Clean Up (Amersham) siguiendo el protocolo del fabricante. Los precipitados resultantes fueron resuspendidos en 100 µL y centrifugados a 12000 x g por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue cuantificado por el método de Bradford, alicuotado y almacenado hasta su uso a -20°C. La integridad y composición de las proteínas del extracto crudo de cisticercos se determinó en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS, Laemmli, 1970) al 12% con 2-mercaptoetanol, usando 15 µg de extractos de proteínas totales por carril, teñidos con azul de Coomassie. Para las inmunoelectrotransferencias la separación de las proteínas se utilizaron geles de PAGE-SDS al 12% con 2-mercaptoetanol con 2 µg de extractos proteicos por mm de carril que fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Towbin *et al.* 1979). Las membranas se incubaron con sueros de conejo anti-Ts2-CysPrx o con anti-βActina (Abcam), estas se lavaron con PBS-Tween 0.1% y se incubaron con IgGs anti-conejo conjugadas con peroxidasa. Los anticuerpos unidos a la membrana se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y 1% H₂O₂.

RESULTADOS

Clonación de la secuencias genómicas de los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx*

El gen *Ts2-CysPrx* de *T. solium* se aisló a partir del tamizaje de una biblioteca genómica del parásito construida en el fago λ ZAP. Para el caso del gen *Tc2-CysPrx* de *T. crassiceps* se utilizó la PCR. Ambas secuencias se depositaron en GenBank (*Ts2-CysPrx*: FJ621569; *Tc2-CysPrx*: FJ621570). Un análisis *in silico* de las secuencias mostró que ambos genes tienen los motivos catalíticos característicos de las Prx típicas (⁴⁷FVCP⁵⁰, ¹⁶⁸EVCP¹⁷¹ para *Ts2-CysPrx*; y ⁴⁶FVCP⁴⁹, ¹⁶⁷EVCP¹⁷⁰ para *Tc2-CysPrx*), donde se localizan la N-Cys y la C-Cys. Estos análisis también confirmaron la presencia de sitios putativos de regulación postraduccional mediante fosforilación (S⁸⁸) y la sobreoxidación (⁹²GGVQ⁹⁵ y ¹⁹¹FM¹⁹²) en la *Ts2-CysPrx*. Mientras que en la *Tc2-CysPrx* están localizados en S⁸⁷, ⁹¹GGVQ⁹⁴ y ¹⁹⁰FM¹⁹¹ (Molina *et al.*, 2006). Como se observa en la figura 7, el análisis de las secuencias mostró que ambos promotores proximales tienen una caja TATA y una secuencia iniciadora (Inr), así como los posibles sitios de unión a los factores de transcripción Factor nuclear 1 (NF-1) a -62 pb, Proteína de específica 1 (Sp1) a -280 y Factor nuclear relacionado a eritrocitos tipo 2 (Nrf-2) a -46 y -173 del TSS en el gen *Ts2-CysPrx*. Adicionalmente, los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* contienen las guaninas -3 y +1 (respecto al codon de inicio) descritas como potenciadoras de la traducción por Kozac (Kozac, 1987). Ambos genes tienen dos exones y un intrón tipo III de 67 pares de bases con sitios de unión NGT-AGN en el codón 102 para *Ts2-CysPrx* y 101 para *Tc2-CysPrx*. Mediante el análisis manual de la secuencia de ambos intrones se encontró la secuencia putativa de reconocimiento del ARNsn U1 (*Ts2-CysPrx*: ¹⁵⁵GTGAGT¹⁶⁰; *Tc2-CysPrx*: ¹⁶⁰GTGACT¹⁶⁵; numeración respecto al sitio de inicio de la transcripción, ver abajo). Así mismo, ambos intrones tienen una región rica en pirimidinas para la unión del Factor Asociado a U2 (*Ts2-CysPrx*: ²⁰⁴TTACGTTGCTCTTCCTAG²²¹; *Tc2-CysPrx*:...²⁰⁸TAGCGTTGCTCTTCCTAG²²⁵)

adyacente a la secuencia aceptora (subrayada). Los exones I y II de *Ts2-CysPrx* son de 134 y 454 pb, respectivamente; mientras que para *Tc2-CysPrx* son de 131 y 454, respectivamente.

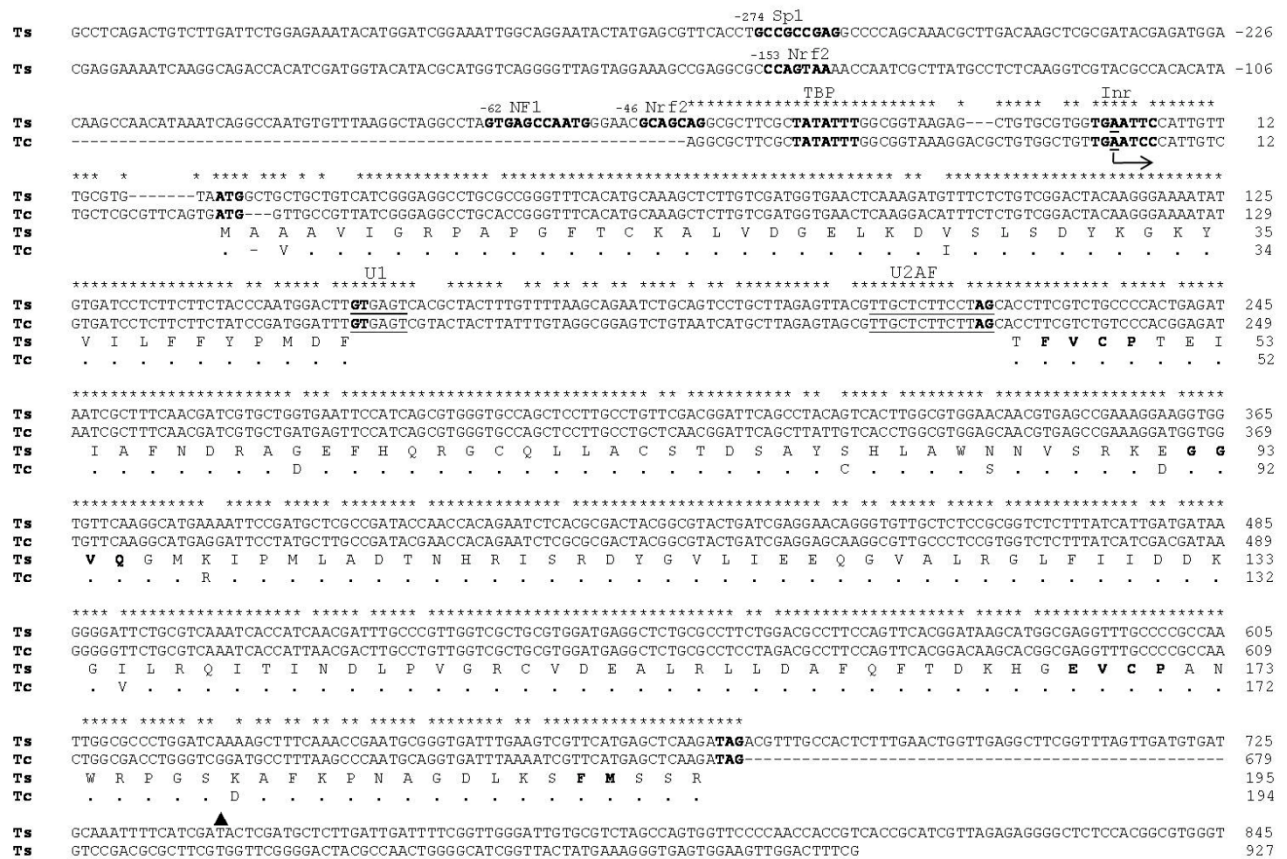


Figura 1. Estructura genómica de las Peroxiredoxinas típicas 2-Cys de *T. solium* (Ts) and *T. crassiceps* (Tc). El TSS está marcado con una flecha. En negritas se indican los codones de inicio y término de la traducción, los sitios donador y aceptor del intrón, así como los motivos regulatorios y catalíticos. La identidad de los nucleótidos y aminoácidos se muestra con asteriscos y puntos, respectivamente. El sitio de poliadenilación está marcado con un triángulo. Las secuencias putativas de unión de ribonucleoproteínas de corte y empalme están subrayadas. Elementos en cis que podrían constituir al promotor, así como sitios probables de unión a factores de transcripción también se indican.

Determinación del sitio de inicio de la transcripción de los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx*

El análisis de las secuencias localizadas corriente arriba del ATG de los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* mostró la presencia de un Iniciador (Inr) y una probable caja TATA. Para determinar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) de ambos genes se realizaron ensayos de Amplificación Rápida de Extremos de ADNc (RACE) con un oligonucleótido específico que amplifica en dirección 5', utilizando como templado RNA total de *T. solium* y de *T. crassiceps*. Se obtuvieron una banda de 98 pb para el gen *Ts2-CysPrx* y una de 102 pb para el gen *Tc2-CysPrx*, las cuales se clonaron y se secuenciaron. El TSS de *Ts2-CysPrx* se mapeó 20 nt corriente arriba del codon de inicio de la traducción, mientras que el TSS de *Tc2-CysPrx* se localizó a 27 nt corriente arriba del codon ATG inicial. En ambos casos el TSS correspondió a una A presente en el Inr (TGAATTCC para *Ts2-CysPrx* y TGAATTCC para *Tc2-CysPrx*; donde la A es el primer nucleótido transcrito; figura 7). Análisis subsiguientes demostraron que el Inr y la caja TATA de los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* también están presentes en los genes de actina de *T. solium* *pAT5* y *pAT6*, así como en los genes de actina de *E. granulosus* *EgactI* y *EgactII* (figura 8; Campos *et al.*, 1990; da Silva *et al.*, 1993). Igualmente se encontró que la distancia entre ambos elementos está conservada en todos los genes analizados (figura 8). Adicionalmente, se determinó el TSS de *pAT6*, el cual también se localizó dentro del Inr. En ninguno de los transcritos analizados se encontró la secuencia *splice leader* reportada para un grupo de genes de *T. solium* (Brehm *et al.*, 2002).

		TATA	Inr	
EgactI	-31	TATAAAAGCCCTAGAAATCACTAGAAGGAT	<u>TC</u>ACTAGAAGGATCACTTTGGTTGAGTGCAGTAG//ATG	59
EgactII	-31	TATATTTTACGTGCAAACGGTGAACGTGG	<u>CC</u>ATTGGATTTTACTCTTGCTAGCCTCTCGATG	32
pAT5	-30	TATATAAACCGTGGGTCTTCAAGCATCG	<u>GCA</u>ACTTACGACTTGCTGTATCTGTATCGGCTGTCTGCAACATG	44
pAT6	-31	TATAAGAAACCGCTTGGTGGGACACCAGTGG	<u>CA</u>CACTTGCCAAGGCCAGCAGTATG	25
TsPrx	-30	TATATTTGGCGGTAAGAGCTGTGCGTGG	<u>TGA</u>ATCCATTGTTTGGCTGTAATG	23
TcPrx	-33	TATATTTGGCGGTAAGGACGCTGTGGCTGT	<u>TGA</u>ATCCATTGCTGCTCGCGTTCAGTGATG	30

Figura 2. Alineamiento de promotores proximales de genes de céstodos. Las secuencias 5' no codificantes de los genes de actina *EgactI* y *EgactII* de *E. granulosus*, *pAT5* y *pAT6* de *T. solium*, así como los genes de las peroxiredoxinas *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* se alinearon manualmente. La caja TATA, el Inr y el codon de inicio están en negritas. El TSS está subrayado. El símbolo // corresponde a los nucleótidos 5'-AGAAGACAAATCCTTTGGTGAGCC-3'.

Preparación de proteínas nucleares de *T. solium*

Para aislar los núcleos de *T. solium*, se rompieron cisticercos con un polytron, la muestra obtenida se separó en un gradiente de Ficoll (ver materiales y métodos). Se obtuvieron cinco fases visibles, las cuales fueron nombradas de acuerdo a su densidad comenzando por la menos densa (fracción I) hasta la más densa (fracción V), estas fueron teñidas con DAPI para determinar la cantidad de núcleos en ellas. Las fracción I contenía predominantemente tejido sin romper, mientras que la II algunos núcleos libres y dentro del tejido. La fracción III incluyó principalmente núcleos libres y algunos corpúsculos calcáreos. Las fracciones IV y V estuvieron compuestas por tejido con núcleos y corpúsculos calcáreos en su interior. Con el fin de enriquecer más la preparación, las fracciones con un mayor contenido de núcleos (fracciones II y III) se juntaron y fueron sometidas a un segundo gradiente de Ficoll. La composición de las nuevas fases (I'-V') fue muy similar a la previa, en donde la fracción III' tuvo un enriquecimiento de núcleos libres (figura 9).

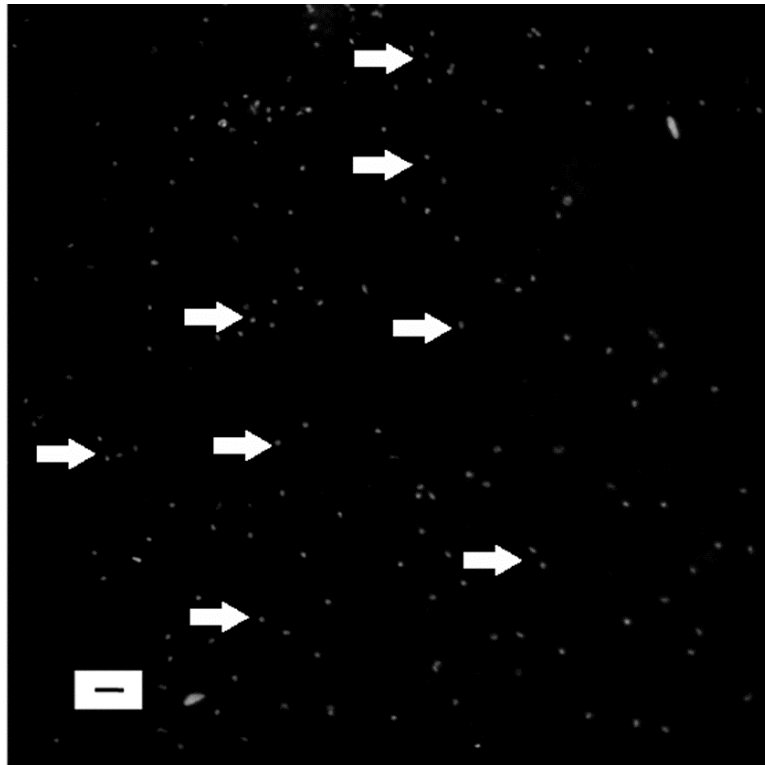


Figura 3. Preparación de núcleos obtenidos a partir de cisticercos de *T. solium*. Los núcleos teñidos con DAPI son señalados con flechas, la observación se realizó en un microscopio de fluorescencia con el objetivo de 20X. Barra = 25 μ m.

Determinación de interacciones ADN-Proteína en el promotor de *Ts2-CysPrx*

Para determinar interacciones entre proteínas y el promotor de *Ts2-CysPrx* se realizaron ensayos de geles de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSA) utilizando extractos de proteínas nucleares de *T. solium*. La sonda utilizada fue de 83 pares de bases, correspondientes a la región -41 a 42 relativa al TSS del gen, conteniendo la caja TATA y el Inr. Al mezclar las proteínas con la sonda se obtuvieron dos bandas retardadas. La de mayor retardo electroforético (flecha) tuvo una intensidad mayor respecto a la de menor retardo (asterisco). Con cantidades mayores de extractos nucleares la intensidad de ambas bandas se incrementó ligeramente (figura 10 carriles 2, 3, 4). Se observó competencia específica para la banda de mayor retardo, la más intensa, cuando la sonda sin marcar se agregó a la reacción como un competidor homólogo en todas las cantidades usadas, mientras que

la banda de menor retardo se hizo más intensa (figura 10 carriles 5, 6 y 7). Al agregar un oligonucleótido no relacionado (competidor heterólogo) no se encontró competencia por ninguna de las bandas retardadas a ninguna concentración (figura 10 carriles 8, 9, 10). Estos datos indican que la banda de mayor retardo (la más intensa) es una interacción específica ADN-proteína, mientras que la banda con menor movilidad electroforética (la menos intensa) es producida por interacciones inespecíficas.

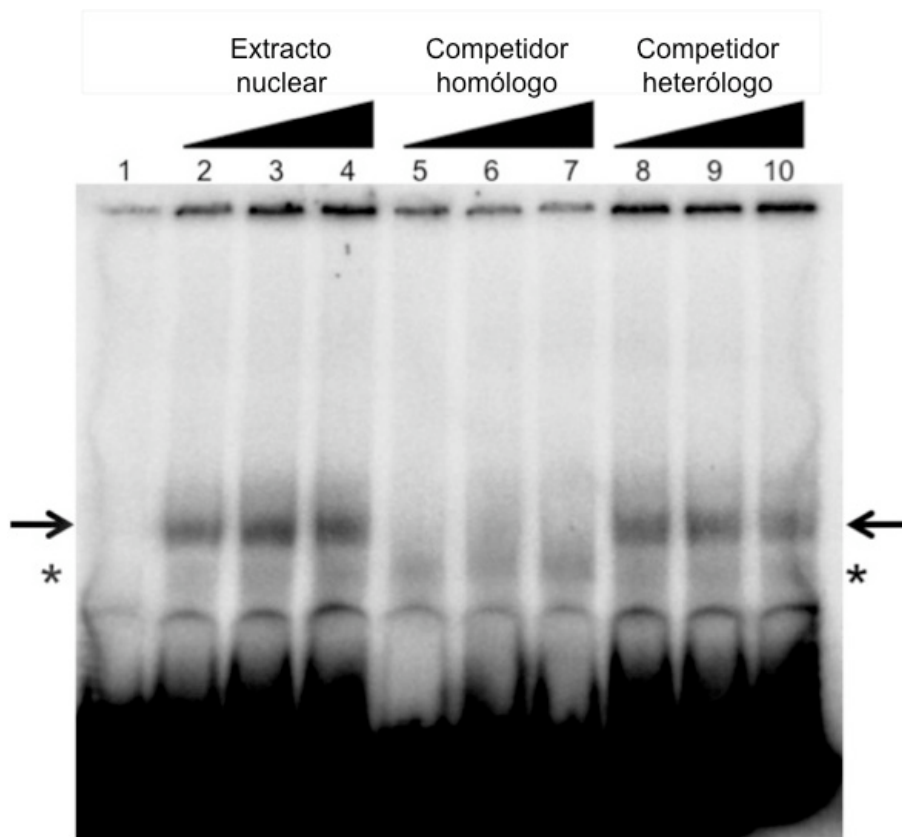


Figura 4. Determinación de interacciones ADN-Proteína en el promotor del gen *Ts2-CysPrx*. Diferentes cantidades de extractos de proteínas nucleares de *T. solium* fueron incubadas con una sonda de las secuencias TATA e Inr (-44 a 41 relativo al TSS) del gen *Ts2-CysPrx*. Carril 1, sonda libre; carriles 2-4, 5, 10, y 15 μ g respectivamente de extracto de proteínas nucleares; carriles 5-7, competidor homólogo 25X, 50X y 100X, respectivamente; carriles 8-10, competidor heterólogo 25X, 50X y 100X, respectivamente. En todos los carriles con competidores se usaron 15 μ g de extracto de proteínas nucleares.

Viabilidad de cisticercos *T. crassiceps* y expresión de Tc2-CysPrx bajo condiciones oxidantes

Con el propósito de detectar los niveles de expresión del gen de la Prx 2-Cys se realizaron experimentos con cisticercos de *T. crassiceps* crecidos en condiciones controladas. Se estableció una curva de viabilidad para cisticercos expuestos a H_2O_2 durante 1 h. Se asumió la viabilidad de los parásitos, como la capacidad de evaginar, para seguir a su siguiente estadio de vida: el gusano adulto. Se encontró que la viabilidad de los parásitos se redujo a medida que aumentó la concentración de H_2O_2 en el medio de cultivo. Dicho parámetro de viabilidad permaneció constante hasta 2 mM de H_2O_2 , y después de esta concentración comenzó a disminuir, hasta llegar a cero en 5 mM. Esta cinética de viabilidad mostró que la concentración letal 50 (CL₅₀) de H_2O_2 es 3.0 mM para este estadio del parásito (figura 11).

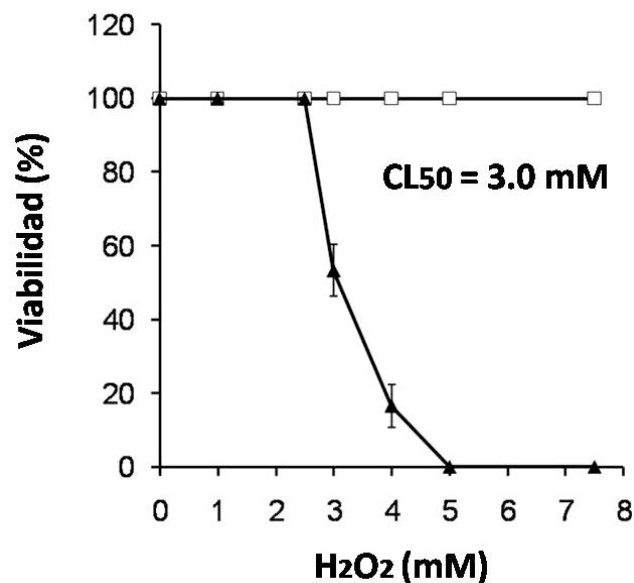


Figura 5. Determinación de la concentración letal 50 (CL₅₀) de *T. crassiceps* para el H_2O_2 . Cisticercos fueron expuestos a diferentes concentraciones de H_2O_2 por 1 h (triángulos) antes de determinar su viabilidad (ver Materiales y Métodos). Parásitos incubados sin H_2O_2 fueron usados como controles (cuadros). Los datos son el promedio \pm desviación estándar (n=8).

Estos datos fueron utilizados para determinar las condiciones de incubación para la determinación del perfil de expresión del gen *Tc2-CysPrx* a nivel de ARNm y proteína. Primero se evaluó el perfil de expresión del gen en parásitos incubados en medio sin H₂O₂. Estos experimentos demostraron que la expresión del ARNm de *Tc2-CysPrx* permanece constante en estos cisticercos incubados en medio hasta por 24 h (figura 12A). Por lo tanto, se decidió utilizar un periodo de preincubación en medio de 4 h antes de exponer a los parásitos a H₂O₂ en el medio de cultivo. Como se observa en la figura 12B, la expresión del ARNm de *Tc2-CysPrx* en parásitos incubados con diferentes concentraciones de H₂O₂ de 0 a 2 mM no cambió a los 30 min. De igual forma, la expresión del gen tampoco sufrió cambios en incubaciones con H₂O₂ 1 mM durante 0.5, 1, 2, 3 y 24 h (figura 12C). En estos experimentos el nivel de expresión del gen fue constante y la intensidad de las bandas fue similar a través de todos los tiempos y las concentraciones de H₂O₂ empleadas. Por otro lado, la expresión de *Tc2-CysPrx* a nivel de proteína permaneció constante en los cisticercos incubados con 1 y 2 mM de H₂O₂ por 30 minutos (figura 12D). Con estos experimentos se puede concluir que *Tc2-CysPrx* no es un gen inducible.

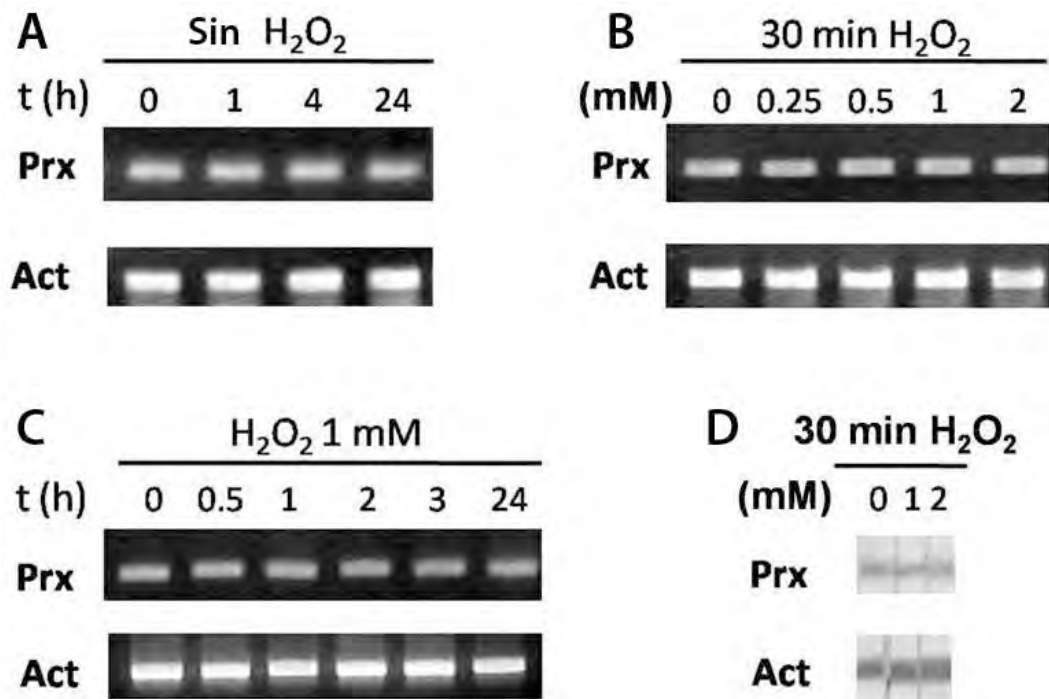


Figura 6. Perfil de expresión del gen *Tc2-CysPrx* en condiciones normales y de estrés oxidante medido por RT-PCR e inmunoelectrotransferencia. Determinación de la expresión del ARNm de *Tc2-CysPrx* en cisticercos: incubados en medio RPMI sin H₂O₂ (A); expuestos a diferentes concentraciones de H₂O₂ en el medio por 30 minutos (B) y expuestos a medio RPMI con 1 mM de H₂O₂ por diferentes tiempos (C). (D) Determinación de la expresión de *Tc2-CysPrx* a nivel de proteína en parásitos incubados en medio con 1 mM y 2 mM de H₂O₂. Los experimentos de expresión fueron hechos por triplicado y β -actina fue usado como control.

DISCUSIÓN

El céstodo parásito *T. solium* representa un problema de salud pública en grandes zonas geográficas que corresponden a países subdesarrollados, así como en algunas regiones de países desarrollados sujetas a una alta migración humana (DeGiorgio *et al.*, 1995; Shantz *et al.*, 1992). La forma más grave de la parasitosis, la neurocisticercosis, tiene severos efectos en la salud humana y, al igual que la cisticercosis del cerdo, representa un alto costo económico que incide en la ya grave situación social de las poblaciones endémicas (Flisser *et al.*, 2003; Praet *et al.*, 2009; Carabin *et al.*, 2006). Estos factores resaltan la importancia que tiene la investigación en *T. solium*, la cual podría repercutir en el desarrollo de estrategias encaminadas a su erradicación.

En este trabajo se clonaron los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* de *T. solium* y *T. crassiceps*, respectivamente. Su arquitectura genómica y su alta identidad a nivel de secuencia primaria y de nucleótidos sugiere que estos genes son homólogos. Mediante análisis *in silico* se encontraron en su región promotora proximal sitios putativos para Nrf2, un factor involucrado en la regulación de genes antioxidantes (Lee y Johnson, 2004). También se encontraron los sitios putativos de unión a NF1 y a Sp1. Se ha descrito que estos factores pueden interaccionar con los miembros de la maquinaria basal transcripcional TFIIB y TBP (Xiao *et al.*, 1994; Kim y Roeder, 1994; Emili *et al.*, 1994). Se requiere de estudios funcionales para corroborar que los sitios de unión a factores de transcripción determinados mediante análisis *in silico* participan en la transcripción de estos genes.

En los organismos eucariontes se ha descrito ampliamente la estructura de los promotores de la ARN polimerasa II (Lee and Young, 2000). Éstos se pueden dividir en secuencias reguladoras y una región promotora proximal. Las secuencias reguladoras frecuentemente están corriente arriba del sitio de posicionamiento de los factores de transcripción basales y la ARN polimerasa II. A ellas se unen factores de transcripción que pueden reprimir o activar la transcripción. Asimismo, los promotores de genes codificantes de proteínas tienen una región que se encuentra en la proximidad del sitio de inicio de la transcripción (TSS) en donde se posicionan los factores basales de transcripción y la ARN polimerasa II; ésta es la secuencia mínima

capaz de promover la transcripción, llamada promotor mínimo. Los promotores mínimos poseen diferentes secuencias que son reconocidas por los factores de transcripción basales. Por ejemplo, la caja TATA, cuya secuencia consenso para los organismos eucariontes es TATAWAR (W = A/T; R = G/C) y se encuentra ubicada en la posición -24 a -31 a partir del TSS (Thomas y Chiang, 2006). Asimismo, otra secuencia que aparece en promotores mínimos de estos organismos es el Iniciador (Inr; YYANWYY), que comprende de -2 a +5 y posiciona el TSS en la A (+1) presente en su secuencia (Juven-Gershon *et al.*, 2008). Los promotores de los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* tienen una caja TATA y un Inr, así como un TSS localizado en una A conservada dentro del Inr. Este resultado es consistente con la morfología de un grupo de promotores mínimos descrita en los organismos eucariontes y sugiere que las secuencias promotoras descritas en este trabajo son promotores mínimos (Smale and Kadonaga, 2003; Sandelin *et al.*, 2007). Análisis adicionales de secuencias disponibles de otros promotores de genes de céstodos mostraron que *pAT5*, *pAT6*, *EgactI* y *EgactII* tienen grandes similitudes con los promotores descritos en este trabajo, dado que todos tienen una caja TATA y un Inr con una A conservada localizada en el TSS mapeado en *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx*. Del mismo modo, se mapeó el TSS de *pAT6* y se encontró que coincide con los de *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx*, lo cual sugiere que el Inr presente en los genes estudiados es funcional y que el TSS de *pAT5*, *EgactI* y *EgactII* posiblemente esté conservado. En este sentido, se ha descrito que promotores mínimos con la esta arquitectura (TATA + Inr) presentan un posicionamiento muy cerrado y específico del TSS, ubicando el primer nucleótido transcrito en la A (YYANWYY) del Inr (Sandelin *et al.*, 2007). Para demostrar estos hallazgos, es necesario hacer ensayos funcionales para determinar si los elementos en *cis* encontrados en los promotores mínimos de los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* participan en la transcripción y el posicionamiento del primer nucleótido transcrito. Por otro lado, la región estructural de *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* tiene dos exones separados por un intrón delimitado por secuencias de corte y empalme conocidas (Breathnach y Cambon, 1981; Padgett *et al.*, 1986; Schellenberg *et al.*, 2008). Estas secuencias de corte y empalme se han descrito en los genes de actina *pAT5* y *pAT6*, así como en el de la paramiosina de *T. solium* (Vargas-Parada y Laclette, 2003; Campos *et al.*, 1990). De esta manera, nuestros análisis mostraron que las secuencias TATA e Inr, caracterizadas en genes de mamíferos

también están presentes en genes de céstodos y que las secuencias de corte y empalme del género *Taenia* no son diferentes a las de otros organismos eucariontes.

Mediante geles de retardamiento con proteínas nucleares purificadas a partir de cisticercos de *T. solium* se encontró que existe una interacción ADN-proteína en el promotor proximal de *Ts2-CysPrx*. El ligero retraso en la movilidad electroforética de la sonda sugiere que la interacción ocurre con una proteína o complejo de bajo peso molecular. Esta secuencia contiene los sitios putativos de unión para la proteína de unión a caja TATA (TBP) y para el dímero TAFII150-TAFII250, los cuales se unen a la caja TATA y al Inr, respectivamente (Chalkley *et al.*, 1999). Hasta el momento, estos factores de transcripción no han sido descritos en céstodos, pero se conoce que participan en la determinación del TSS, así como en la eficiencia de la transcripción de genes altamente expresados (Sandelin *et al.*, 2007). Lo anterior es consistente con los reportes que indican un alto nivel de expresión de las Prx en bacterias, células y algunos tejidos de mamíferos, lo cual podría ocurrir con los genes *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* (Chae *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2003b). Así mismo, se encontró que la CL₅₀ de H₂O₂ de los cisticercos de *T. crassiceps* incubados *in vitro* con este oxidante es 3.0 mM. Esta concentración tan elevada está fuera de los límites fisiológicos. Por ejemplo, las moléculas oxidantes liberadas por los neutrófilos o macrófagos alcanzan concentraciones nanomolares a micromolares, las cuales son inofensivas para *T. crassiceps* (Root *et al.*, 1975; Test y Weiss, 1984; Carreras *et al.*, 1994). Por lo tanto, la carencia de catalasa y probablemente la presencia de una GPx con baja actividad contra el H₂O₂ en estos parásitos sugiere que la resistencia a altas concentraciones de H₂O₂ está dada principalmente por las Prx 2-Cys típicas. En este contexto, reportes de *S. mansoni* y *S. japonicum* han demostrado que existen tres isoformas de las Prx 2-Cys típicas en esquistosomátidos: una Prx1 citosólica que es insensible a la inactivación por sobreoxidación, la cual se sobreexpresa bajo condiciones oxidantes y que podría participar en la defensa antioxidante frente al H₂O₂ exógeno; así como una Prx2 citosólica y una Prx3 con péptido señal mitocondrial, las cuales son genes de mantenimiento (Sayed y Williams, 2004). La Prx2 y Prx3 son susceptibles a la inactivación por sobreoxidación debido la presencia del motivo FM en su extremo carboxilo terminal, el cual es similar al motivo YF de los genes de *Taenia* estudiados en este trabajo (Sayed y Williams, 2004; Molina-López *et al.*, 2006). La ausencia de péptido señal mitocondrial y la presencia del motivo YF en el extremo carboxilo

terminal sugiere que las proteínas Ts2-CysPrx y Tc2-CysPrx son isoformas citosólicas y sensibles a la inactivación por sobreoxidación, tal como lo es la Prx2 de *Schistosoma*.

También se evaluó el perfil de expresión del gen *Tc2-CysPrx* en condiciones oxidantes. Se encontró que bajo estas condiciones los niveles de ARNm y de proteína de *Tc2-CysPrx* no presentan cambios. Asimismo, el nivel de expresión de *Tc2-CysPrx* fue menor al de actina, lo cual puede deberse a la detección de la suma de mensajeros y de isoformas pertenecientes a más de un gen de actina, ya que se sabe que la actina forma parte de una familia de genes altamente conservados entre especies y que también está presente en *T. solium* (Ambrosio *et al.*, 2003). El mismo patrón de expresión bajo condiciones oxidantes y con otros inductores se ha observado en otras Prxs 2-Cys típicas, tales como la PrxII de *H. sapiens* y la PFTPX-2 de *Plasmodium falciparum* (Diet *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2005). La falta de inducción del gen *Tc2-CysPrx* sugiere que esta proteína podría estar codificada por un gen antioxidante de mantenimiento que actúa sobre el H₂O₂ endógeno, y que podría participar como regulador redox, más que como un gen de respuesta antioxidante contra el estrés oxidativo exógeno. Esto es consistente con estudios previos realizados en Ts2-CysPrx, en donde la expresión del gen persiste durante todo el ciclo de vida del parásito, incluso en el estadio adulto, el cual no está sujeto a estrés oxidativo (Molina-López *et al.*, 2006). También es posible que otros sistemas antioxidantes no enzimáticos actúen para proteger al parásito, tal como se ha observado en *S. mansoni*, en donde condiciones oxidantes inducen la expresión del gen de la albúmina, en forma de una proteína de sacrificio susceptible a la oxidación (Williams *et al.*, 2006). Asimismo, es posible que la regulación de *Tc2-CysPrx* sea a nivel modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, ya se ha descrito en levaduras y en líneas celulares humanas que la presencia de motivos de sobreoxidación en las Prxs 2-Cys típicas causa la inactivación reversible de la enzima en condiciones oxidantes, lo cual origina la inducción de genes de respuesta antioxidante, tales como el de la sulfiredoxina, enzima que restituye la actividad de la Prx, así como la inducción de genes de la respuesta global a estrés, tales como la GST-3 y las proteínas de choque térmico HSP9 y HSP16 (Wood *et al.*, 2003a; Chen *et al.*, 2003). Es posible que algunos de estos mecanismos estén presentes en *Taenia*.

La arquitectura genómica compartida en los genes de céstodos presentados en este trabajo sugiere que la maquinaria transcripcional de genes codificantes en estos parásitos tiene similitudes a la de los mamíferos, y que los céstodos poseen secuencias Inr que sirven para posicionar el sitio de inicio de la transcripción. Este es el primer trabajo que describe la secuencia de un promotor en céstodos. Estos hallazgos proporcionan nuevas evidencias para futuras investigaciones de genes en ténidos de interés médico, las cuales podrían contribuir en el desarrollo de estrategias para su erradicación.

CONCLUSIONES

- La arquitectura genómica conservada y la alta identidad a nivel de aminoácidos sugiere que *Ts2-CysPrx* y *Tc2-CysPrx* son genes homólogos.
- Los promotores proximales de ambos genes tienen una caja TATA y una secuencia Inr, las cuales también están presentes en otros genes de ténidos.
- En ambos genes el sitio de inicio de la transcripción se localizó dentro de la secuencia Inr, lo cual sugiere que dicha secuencia es funcional y que la maquinaria transcripcional de los genes codificantes en los ténidos es similar a la de los mamíferos.
- Existe una interacción ADN-proteína entre la secuencia del promotor proximal del gen *Ts2-CysPrx*, la cual tiene una caja TATA y una secuencia Inr, y proteínas nucleares de *T. solium*.
- Cisticercos de *T. crassiceps* tienen una CL₅₀ para el H₂O₂ de 3 mM.
- El patrón de expresión de *Tc2-CysPrx* sugiere que este gen es de mantenimiento para el H₂O₂ endógeno y que posiblemente participa como regulador redox, y no como un gen de respuesta antioxidante contra el H₂O₂ exógeno.

REFERENCIAS

- Alvarez JI, Rivera J, Teale JM. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e218.
- Ambrosio JR, Reynoso-Ducoing O, Hernández-Sánchez H, Correa-Piña D, González-Malerva L, Cruz-Rivera M, Flisser A. Actin expression in *Taenia solium* cysticerci (cestoda): tisular distribution and detection of isoforms. *Cell Biol Int*. 2003;27:727-33.
- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P.A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res*. 1998;84:117-22.
- Arruda GC, da Silva AD, Quagliato EM, Maretti MA, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:152-5
- Baig S, Damian RT, Molinari JL, Tato P, Morales-Montor J, Welch M, Talhouk J, Hashmeys R, White AC Jr. Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG. *Parasitology*. 2005;131:411-6.
- Batra S, Srivastava JK, Gupta S, Katiyar JC, Srivastava VM. Role of reactive oxygen species in expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from rats. *Parasitology*. 1993;106:185-92.
- Baz A, Carol H, Marco M, Casabó L, Jones F, Dunne D, Nieto A. Fc-binding molecules specific for human IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite Immunol*. 1998;20:399-404.
- Biteau B, Labarre J, Toledano MB. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*. 2003;425:980-4.
- Bozonet SM, Findlay VJ, Day AM, Cameron J, Veal EA, Morgan BA. Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the

transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 2005 17;280:23319-27.

Breathnach R, Chambon P. Organization and Expression of Eucaryotic Split Genes Coding for Proteins. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:349-83.

Brehm K, Hubert K, Sciutto E, Garate T, Frosch M. Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;122:105-10

Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today.* 1988;4:218-25.

Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gómez E, Hernández R, Willms K, Laclette JP. Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 1990;40:87-3.

Carabin H, Krecek RC, Cowan LD, Michael L, Foyaca-Sibat H, Nash T, Willingham AL. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop Med Int Health.* 2006;11(6):906-16.

Carreras MC, Pargament GA, Catz SD, Poderoso JJ, Boveris A. Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett.* 1994;341:65-8.

Castellanos-Gonzalez A, Jimenez L, Landa A. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int J Parasitol.* 2002;32:1175-82.

Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999;45:101-12.

Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:7017-21.

- Chalkley GE, Verrijzer CP. DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J* 1999;18:4835-45.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*. 2003;14:214–229.
- da Silva CM, Henrique FB, Picón M, Gorfinkiel N, Ehrlich R, Zaha A. Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:209-19.
- Davis SW, Hammerberg B. *Taenia taeniaeformis*: Evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. *International Journal for Parasitology*. 1990;20:587-593.
- DeGiorgio C, Pietsch-Escueta S, Tsang V, Corral-Leyva G, Ng L, Medina MT, Astudillo S, Padilla N, Leyva P, Martinez L, Noh J, Levine M, del Villasenor R, Sorvillo F. Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. *Acta Neurol Scand*. 2005;111:84-8.
- Del Brutto O, Noboa C. Late-onset epilepsy in Ecuador: an etiology and clinical features in 225 patients. *J Trop Geo Neurol*. 1991;1:31-34.
- Diet A, Abbas K, Bouton C, Guillon B, Tomasello F, Fourquet S, Toledano MB, Drapier JC, 2007.Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages. *J Biol Chem*. 2007;282:36199–205.
- Eddi C, Nari A, Amanfu W. Veterinary public health activities at FAO activities; FAO support possibilities. *Acta Trop*. 2003;87:145-148.
- Ellis HR, Poole LB. Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxides reductase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*. 1997;36:13349–13356.
- Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:1582–1593.

- Espíndola NM, De Gaspari EN, Nakamura PM, Vaz AJ. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. *Vet Parasitol.* 2000;89:321-6.
- Flisser A, Espinoza B, Tovar A, Plancarte A, Correa D. Host--parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet Parasitol.* 1986;20:95-102.
- Flisser A, Malagon F (eds). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigacion en mexico.* Limusanoriega CONACyT. 1989.
- Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.* 2003;87:43-51.
- Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today* 1988;4:131-7.
- Freeman RS. Studies on responses of intermediate hosts to infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (Cestoda). *Can J Zool.* 1964;42: 367–85.
- Freeman RS. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool.* 1962;40:969–90.
- García HH, Gilman R, Martínez M, Tsang VC, Pilcher JB, Herrera G, Diaz F, Alvarado M, Miranda E. Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. *Lancet.* 1993;341:197-200.
- Garcia HH, Tsang VC, Gilman RH. A high degree of cross reactivity between the antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*, potentially useful for the diagnosis of human neurocysticercosis (NCC). *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:693-4.
- Henkle-Dührsen K, Kampkötter A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol;* 2001;114:129-141.
- Herrera LA, Santiago P, Rojas G, Salazar PM, Tato P, Molinari JL, Schiffmann D, Ostrosky-Wegman P. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat Res.* 1994;305:223-8.

- Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*. 2004;117:625-35.
- Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:253-9.
- Kalinna B, McManus DP. An IgG (Fcg)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology*. 1993;106:289–296.
- Kim TK, Roeder RG. Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:4170–4174.
- Kozac M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nuc Ac Res*. 1987;20:8125-48.
- Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T. Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. *Mol Biochem Parasitol* 2009;164(1):26-31.
- Kumsta C, Jakob U. Redox-Regulated Chaperones. *Biochemistry*. 2009 (en prensa).
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology*. 1992;148: 124–128.
- Laemmli UK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.
- Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol*. 1993;60:343-7.
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid.

- Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114:926-8.
- Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol.* 2004; 37:139–143.
- Lee TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet.* 2000; 34:77-137.
- Li T, Craig PS, Ito A, Chen X, Qiu D, Qiu J, Sato MO, Wandra T, Bradshaw H, Li L, Yang Y, Wang Q. Taeniasis/cysticercosis in a Tibetan population in Sichuan Province, China. *Acta Trop.* 2006;100:223-31.
- Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med.* 1990;150:323.
- Mkoji GM, Smith JM, Prichard RK. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. *Int J Parasitol.* 1988;18:661–66.
- Molina-López J, Jiménez L, Ochoa-Sánchez A, Landa A. Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*. *J Parasitol* 2006;92:796-802.
- Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:1119-50.
- Pardini AX, Peralta RH, Vaz AJ, Machado Ldos R, Peralta JM. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Trop Med Int Health.* 2005;10:1005-12.
- Plancarte A, Flisser A, Larralde C. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios.* 1983;36:83-93.
- Praet N, Speybroeck N, Manzanedo R, Berkvens D, Nsame Nforinwe D, Zoli A, Quet F, Preux PM, Carabin H, Geerts S. The Disease Burden of *Taenia solium* Cysticercosis in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e406.

- Rabiela MT, Hornelas Y, García-Allan C, Rodríguez-del-Rosal E, Flisser A. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. *Arch Med Res.* 2000;31:605-7.
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005;38:1543-52.
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life.* 2001;52:35-41.
- Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, García H, de Bittencourt PRM, Trelles L, Arriagada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-Franca A. A proposal to declare neurocysticercosis an International reportable disease. *World Health Organization Bulletin.* 2000;78:399-406.
- Romano MC, Valdéz RA, Cartas AL, Gómez Y, Larralde C. Steroid hormone production by parasites: the case of *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;85:221-5.
- Root RK, Metcalf J, Oshino N, Chance B. H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. *J Clin Invest.* 1975;55:945-55.
- Salinas G, Selkirk ME, Chalar C, Maizels RM, Fernández C. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol.* 2004;20:340-6.
- Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet.* 2007;8:424-36.
- Sayed AA, Williams DL. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 2004;279:26159–26166.
- Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *N Engl J Med.* 1992;327:692-5.

- Schantz PM, Wilkins PP, Tsang VCW. Immigrants, imaging and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. En: Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, eds. *Emerging infections 2*. Washington: ASM Press. 1998: 213–41.
- Schellenberg MJ, Ritchie DB, MacMillan AM. Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci*. 2008;33:243–246.
- Sciutto E, Fragoso G, Diaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res*. 1991;77:243-6.
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *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. *Microbes Infect*. 2000;2:1875-90.
- Silverman, PH. Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1954;48:356-66.
- Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:449-79.
- Sotelo J, Del Brutto OH. Brain cysticercosis. *Arch Med Res*. 2000;31:3-14.
- Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol*. 2000;22:297-05.
- Steers NJ, Rogan MT, Heath S. In-vitro susceptibility of hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* to nitric oxide and the effect of the laminated layer on nitric oxide production. *Parasite Immunol*. 2001;23(8):411-7.
- Subahar R, Hamid A, Purba W, Wandra T, Karma C, Sako Y, Margono SS, Craig PS, Ito A. *Taenia solium* infection in Irian Jaya (west Papua), Indonesia: a pilot

- serological survey of human and porcine cysticercosis in Jayawijaya district. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95:388-90.
- Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL.A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res.* 2004;92:197-204.
- Test ST, Weiss SJ. Quantitative and temporal characterization of extracellular H₂O₂ generated by human neutrophils. *J Biol Chem.* 1984;259:399-405.
- Thomas MC, Chiang CM. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2006;41:105-78.
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 1999;67:2522-30.
- Tong-Shin Chang, Woojin Jeong, Hyun Ae Woo, Sun Mi Lee, Sunjoo Park, Sue Goo Rhee. Characterization of Mammalian Sulfiredoxin and Its Reactivation of Hyperoxidized Peroxiredoxin through Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in the Active Site to Cysteine. *J Biol Chem.* 2004;279: 50994–51001.
- Torres-Rivera A, Landa A. Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 2008;477:372-8.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4.
- Vaca-Paniagua F, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, et al. *Taenia solium*: antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines. *Curr Top Med Chem.* 2008;8:393-9.
- Vargas-Parada L, Laclette JP. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res.* 2003;89:375-78.

- Vargas-Parada L, Solís CF, Laclette JP. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology*. 2001;122:583-8.
- Vibanco-Perez N, Jimenez L, Mendoza-Hernandez G, Landa A. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res* 2002;88:398-404.
- White AC Jr. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med*. 2000; 51: 187–206.
- Williams DL, Sayed AA, Ray D, McArthur AG. *Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Dec;150:359-63.
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*. 2003a;300:650-3.
- Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. 2003b;28:32-40.
- Xiao H, Lis JT, Xiao H, Greenblatt J, Friesen JD. The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22:1966–1973.
- Yano K, Komaki-Yasuda K, Kobayashi T, Takemae H, Kita K, Kano S, Kawazu S. Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage. *Parasitol Int*. 2005;54:35-41.
- Zoli A, Shey-Njila O, Assana E, Nguekam JP, Dorny P, Brandt J, Geerts S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. *Acta Trop*. 2003;87:35-42.

Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*

Felipe Vaca-Paniagua · Ricardo Parra-Unda · Abraham Landa

Received: 26 March 2009 / Accepted: 24 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract The *Taenia* genus is capable of living for long periods within its hosts. Reports have shown that this successful establishment is related to its efficient defense mechanisms against host immune response and its high tolerance to oxidative stress. In this work, we describe the genomic sequences of one *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* typical 2-Cys peroxiredoxins (*Ts2-CysPrx*, *Tc2-CysPrx*) genes, which are 94% identical in primary sequence with the typical 2-Cys Prxs catalytic motifs. Both genes have the same genomic architecture, showing a TATA box and Initiator (Inr) sequence in their proximal promoter, two exons split by a 67-bp type III intron and one unique transcription start site located inside the Inr. We show that *T. crassiceps* cysticerci are highly tolerant to H₂O₂ presenting a lethal concentration 50 of 3.0 mM and demonstrate that the typical *Tc2-CysPrx* gene is not induced by H₂O₂, showing a behavior of an antioxidant housekeeping gene. This study describes for first time the gene structure of a typical 2-Cys Prx in the *Taenia* genus.

Introduction

The cestode *Taenia solium* is the causal agent of cysticercosis in humans and pigs. This parasite is present in most

non-developed countries and massive human migration has spread it to developed countries as well. The most severe form of the disease, neurocysticercosis, is of worldwide importance due to its impact in human health and economy and although many efforts have been oriented to parasite control or eradication, it is still a public health problem; therefore, more studies are needed to fully accomplish this goal (Carabin et al. 2006).

Several reports have shown that the successful establishment of this taeniid and other helminths in the host is related to its evasion of the immune response and its antioxidant defense (Alvarez et al. 2008; Vaca-Paniagua et al. 2008; Batra et al. 1993). It is known that in the Taeniidae family of parasitic worms the enzymatic antioxidant system is composed by a Cu/Zn superoxide dismutase, two glutathione transferases, a thioredoxin glutathione reductase, and one typical 2-Cys Peroxiredoxin (Vaca-Paniagua et al. 2008; Torres-Rivera and Landa 2008; Rendón et al. 2004; Leid and Suquet 1986; Salinas et al. 1998; Salinas and Cardozo 2000; Li et al. 2004; Bonilla et al. 2008; Chalar et al. 1999). Peroxiredoxins (Prx) are antioxidant enzymes that reduce hydrogen peroxide (H₂O₂) to water and a wide range of hydroperoxides to the corresponding alcohol (Rhee et al. 2005). They are classified in 1-Cys Prxs and 2-Cys Prxs depending on if they use one or two cysteines for catalysis. The 2-Cys Prxs are further divided in typical and atypical regarding if they are dimeric or monomeric, respectively. In human helminth parasites, only typical 2-Cys Prxs have been found and they have been characterized principally in trematodes and nematodes, but in cestodes their studies are limited. They are involved in redox state balance (Sayed et al. 2006), signal and transcriptional regulation (Wood et al. 2003), and antioxidant and parasite defense (Li et al. 2004). For example, in the trematode parasites *Schistosoma mansoni* and *Schisto-*

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 80134) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA IN 207507-3). FVP was supported by CONACyT (195340) and is a student of PDCB.

F. Vaca-Paniagua · R. Parra-Unda · A. Landa (✉)
Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio A 2do piso, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico
e-mail: landap@servidor.unam.mx

soma japonicum, three typical 2-Cys Prxs have been characterized, of which Prx1 is induced under oxidant conditions, while Prx2 and Prx3 are housekeeping genes (Kumagai et al. 2006; Sayed and Williams 2004; Sayed et al. 2006). The silencing of typical 2-Cys Prxs genes with dsRNAi drastically increased parasite sensibility against H₂O₂ (Sayed et al. 2006). The lack of catalase and the fact that no high H₂O₂-reducing activity glutathione peroxidase has been found in the Platyhelminthes phylum (Callahan et al. 1988; Mei and LoVerde 1997) highlight the biological role of typical 2-Cys Prx as a major source of H₂O₂ detoxification in these parasites (Pérez-Torres et al. 2002; Lu et al. 1998). Moreover, the localization of *T. solium* 2-Cys Prxs on the parasite tegument suggests that they are in direct contact with the host immune response (Molina-López et al. 2006).

Here, we describe the genomic structure of a *T. solium* and a *Taenia crassiceps* typical 2-Cys Prx gene (*Ts2-CysPrx*, *Tc2-CysPrx*) and show that *Tc2-CysPrx* is not induced under oxidant conditions. Additionally, we show that *T. crassiceps* is highly resistant to H₂O₂.

Materials and methods

Biological materials

T. solium cysticerci were dissected from naturally infected pork, washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS), and stored at -70°C until use. *T. crassiceps* WFU strain was extracted from the peritoneum of infected BALB/cAnN female mice killed with CO₂ and washed three times with sterile PBS (Everhart et al. 2004).

Cloning of *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx* genes

T. solium and *T. crassiceps* genomic DNA was extracted as described previously (Campos et al. 1990). Briefly 1.5 g cysticerci was digested with Proteinase K for 2–3 h at 55°C in TRIS 50 mM, EDTA 1 mM, and sarcosyl 0.5%, followed by centrifugation at 1,000×g for 15 min, phenol/chloroform extractions, and isopropanol precipitation. *Eco*RI-digested *T. solium* genomic DNA was used for the construction of a λ-ZAP library using the Uni-ZAP[®]XR vector System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). One hundred and twenty thousand clones were screened overnight at 60°C with a [α -³²P]dCTP-labeled *Ts2-CysPrx* probe comprising the complete complementary DNA (cDNA) sequence of the gene labeled by nick-translation with random primers (Amersham Biosciences). After secondary and tertiary screenings, phage-positive clones were converted to Bluescript plasmids using ExAssist helper phage (Stratagene). Bacterial colonies containing the plasmid Bluescript were grown overnight in LB ampicillin (100 µg/mL) medium.

Plasmid DNA was prepared with alkaline lysis standard method and sequenced on an automated fluorescent dye DNA sequencer ABI Prism model 373 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems). *T. crassiceps* 2-Cys Prx gene cloning was done by polymerase chain reaction (PCR) amplification using 100 ng of parasite DNA and primers designed from 5' and 3' non-coding sequences of *Ts2-CysPrx* (forward: 5'-⁸⁸GCCAATGTGTT TAAGGCTAGG⁻⁶⁸-3' and reverse: 5'-⁷⁰⁵CAACCAGTT CAAAGAGTGGC⁶⁸⁵-3') with the following program: 1 cycle of 94°C, 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min; and one final extension of 72°C 5 min. The PCR product was cloned into pCRII dual promoter (Invitrogen) and the plasmid preparation was sequenced as mentioned before. Putative transcription factor binding sites were determined with the sequence analysis program PROMO: http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3.

Transcription start site determination

T. solium and *T. crassiceps* total RNA was prepared with TRIzol (Invitrogen) and used as template for transcription start site (TSS) determination using the Smart RACE cDNA Amplification Kit and Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Both 5' parasite Prx RACE fragments were amplified by PCR using reverse primer Prx6R (5'-AACA TCTTTGAGTTCACCATCGACAA-3') and forward primer SMARTII (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC GCGGG-3'), following the manufacturer's directions. The 5' fragment of *T. solium* actin *pAT6* gene was done using the reverse primer PAT6R (5'-AGGGAGGGGAAGACAG CACGAGG-3') designed from the *pAT6* gene (Campos et al. 1990) and SMARTIII. The resulting band of each PCR reaction was cloned into pCRII and sequenced.

Determination of *T. crassiceps* viability under oxidative conditions

After a preincubation of 4 h in RPMI 1640 (Sigma) with 5% CO₂ at 37°C, parasites were immediately incubated in medium with 1–7.5 mM of H₂O₂ for 1 h at the same conditions. Afterwards, parasites were washed and incubated in 0.2 mL of pig bile diluted 1:3 in RPMI 1640 for 30–60 min to evaluate scolex evagination, which was observed in an inverted microscope (Nikon Eclipse TS100).

Tc2-CysPrx messenger RNA expression

Three different groups of *T. crassiceps* cysticerci were used for the expression studies: (1) in RPMI 1640 medium for 0, 1, 4, and 24 h; (2) in medium with H₂O₂ (0.25, 0.5, 1, and 2 mM) for 30 min; and (3) in medium with H₂O₂ 1 mM for

0, 0.5, 1, 2, 3, and 24 h. Groups 2 and 3 were preincubated 4 h as mentioned before the addition of the medium with H₂O₂. Messenger RNA expression was determined by reverse transcriptase (RT)-PCR with One Step RT-PCR kit (Invitrogen) using 1 µg of *T. crassiceps* total RNA template and primers PRX-3 (5'-CTCCGTGGTCTCTTATCA-3') and PRX-9R (5'-CTATCTTGAGCTCATGAACG-3') to amplify 2-Cys Prx. Likewise, β-actin amplification was done with primers PAT6-5' (5'-TCCGGTATGTGCAAAGCC-3') and PAT6-3' (5'-GTGATGCCAGATCTTCTCC-3'). Empirically, we determined that in 30 cycles of PCR amplification all the amplicons were within the linear range of product formation and did not plateau as a saturated product. The program used in all reactions was 50°C for 30 min for reverse transcriptase reaction and 30 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 1 min, of 72°C for 1 min; and final extension of 72°C 5 min for PCR reaction. Amplicons were visualized by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

Tc2-CysPrx protein expression by Western blot

Preincubated *T. crassiceps* cysts were incubated in RPMI medium with H₂O₂ (0, 1, and 2 mM for 30 min) and used to prepare crude protein extracts. Approximately 60 mg of tissue was sonicated four times at 40 W for 1 min leaving 1 min on ice between each pulse in 500 µL of lysis buffer (urea 8 M, CHAPS 0.5 M, pepstatin 1 µM, leupeptin 0.6 µM, phenylmethanesulfonyl fluoride 0.2 mM, DTT 0.5 mM). One hundred microliters of the parasite suspension was purified with 2-D Clean-Up Kit (Amersham) following the manufacturer's instructions. The resulting pellets containing the total crude proteins were resuspended in 100 µL and centrifuged at 12,000×g for 5 min at 4°C. The supernatant was quantified by the Bradford method, aliquoted, and stored until use at -20°C. Protein extract (15 µg/lane) integrity was determined in 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with 2-mercaptoethanol and stained with Coomassie blue. For Western blot, 12% SDS-PAGE gels with 2 µg of protein extracts per millimeter of lane were transferred to PVDF membranes (Towbin et al. 1979). Membranes were incubated with rabbit serum anti-*Ts2-CysPrx* (1:1,000) or rabbit anti-β-actin (Abcam, 1:2,000), washed, and incubated with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG. Bound antibodies were revealed with 3,3'-diaminobenzidine and 1% H₂O₂.

Results

Analysis of 2-Cys Prx gene structure

The *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx* genes were cloned from a genomic λ-ZAP library and by PCR using genomic DNA,

respectively. The genomic sequences of both genes were deposited in GenBank under accession numbers FJ621569 and FJ621570, respectively. Both Prxs have the typical 2-Cys Prxs catalytic motifs (⁴⁷FVCP⁵⁰, ¹⁶⁸EVCP¹⁷¹ for *Ts2-CysPrx*; and ⁴⁶FVCP⁴⁹, ¹⁶⁷EVCP¹⁷⁰ for *Tc2-CysPrx*), where amino-terminal catalytic and resolving carboxy-terminal cysteines are located. They also have residues and motifs similar to that reported for phosphorylation in S⁸⁸ and overoxidation in ⁹²GGVQ⁹⁵ and ¹⁹¹FM¹⁹² in *Ts2-CysPrx* and in *Tc2-CysPrx* in S⁸⁷, ⁹¹GGVQ⁹⁴, and ¹⁹⁰FM¹⁹¹ (Wood et al. 2003). As seen in Fig. 1, sequence analysis showed that both proximal promoters have a TATA box and an Initiator (Inr) sequence, as well as putative binding sites for NF-1 (at -62 and -65 pb for *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx*, respectively), Nrf-2 (at -46 and -153 for *Ts2-CysPrx* and at -49 for *Tc2-CysPrx*), and Sp1 (at -275 for *Ts2-CysPrx*). It is interesting to note that both genes contain the -3 and +4 guanines (in respect to the translation start codon; GNNATGG) described by Kozak to be translation enhancers (Kozak 1987). Both genes had two exons separated by one small type III intron of 67 bp that has NGT-AGN donor-acceptor sites placed in codon 102 for *Ts2-CysPrx* and 101 for *Tc2-CysPrx*. Sequence analysis of both introns showed a putative U1 recognition sequence (*Ts2-CysPrx*: ¹⁵⁵GTGAGT¹⁶⁰; *Tc2-CysPrx*: ¹⁶⁰GTGACT¹⁶⁵; numbering from the first transcribed nucleotide, see below) spanning the donor site (underlined), and a pyrimidine-rich tract for U2 Associated Factor (U2AF) binding (*Ts2-CysPrx*: ²⁰⁴TTACGTTGCTCTTCCTAG²²¹; *Tc2-CysPrx*: ²⁰⁸TAGCGTTGCTCTTCTAG²²⁵) positioned in the acceptor site (underlined). For *Ts2-CysPrx*, exon 1 is 134 pb and exon 2 is 454 pb, while exon 1 and 2 of *Tc2-CysPrx* are 131 and 454 nt.

Transcription start site

Analysis of the sequences located upstream of the ATG in *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx* indicated the presence of an Inr sequence and a TATA box. To localize the TSS in both genes, we performed 5' RACE experiments and sequenced the amplified products of *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx*. The TSS in *Ts2-CysPrx* was mapped 20 nt upstream of the translation start codon (ATG), whereas in *Tc2-CysPrx* it was located 27 nt upstream of the ATG. In both cases, the TSS corresponds to an A located within Inr sequence (TGAATTCC, for *Ts2-CysPrx* and TGAATCC for *Tc2-CysPrx*; where the A is the first transcribed nucleotide; Fig. 1). Further sequence analysis showed that the Inr and TATA sequences of *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx* are conserved in the Cestoda genes, such as *T. solium* actin genes *pAT5* and *pAT6*, as well as to the *Echinococcus granulosus* actin genes *EgactI* and *EgactII* (Campos et al. 1990; da Silva et al. 1993); moreover, the nucleotide distance between both elements is conserved in all the

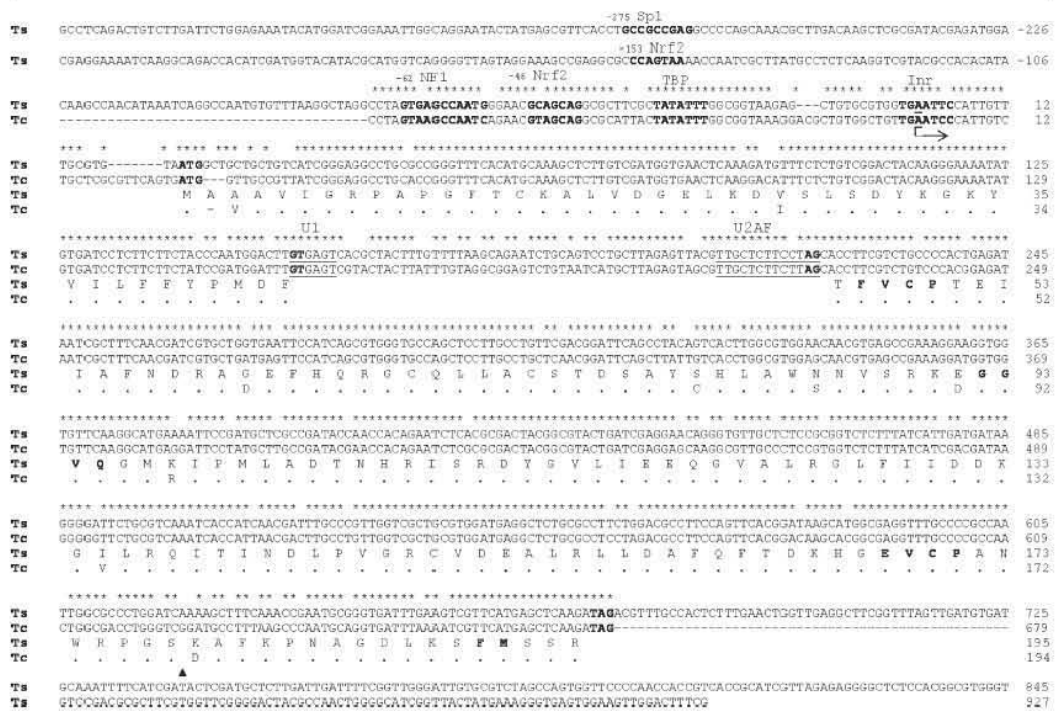


Fig. 1 Gene structure of *T. solium* (*Ts*) and *T. crassiceps* (*Tc*) 2-Cys Prxs. The transcription start point is marked with an arrow. Initiator (*Inr*) sequence, TATA box, start (ATG) and stop (TAG) codons, donor and acceptor intron sequences, and protein regulatory and catalytic motifs are in *bold*. Nucleotide and amino acid identity is denoted with

asterisks and dots, respectively. The *Ts* 2-CysPrx polyadenylation site is denoted with a triangle. Putative splicing factor sites for U1 and U2AF are underlined. Putative transcription factor binding sites are written above their corresponding motifs

sequences analyzed (Fig. 2). In order to know if the TSS located in the *Inr* sequence of the Prxs genes studied is conserved in *T. solium* *pAT6*, we conducted more 5' RACE experiments, which mapped actin gene TSS also inside the *Inr* sequence (Fig. 2). This result demonstrates sequence conservation between different taeniids gene proximal promoters. The *T. solium* splice leader sequence reported for a group of parasite genes was absent in all transcripts analyzed (Brehm et al. 2002).

Viability of *T. crassiceps* and *Tc2-CysPrx* expression under oxidant conditions

In order to know if *T. crassiceps* 2-Cys Prx gene is induced under oxidant conditions, expression experiments were conducted using *T. crassiceps* cysticerci in controlled conditions. First, we established a concentration curve to determine viability in cysticerci incubated in medium with H₂O₂ for 1 h. Viability of the parasites was assumed as the

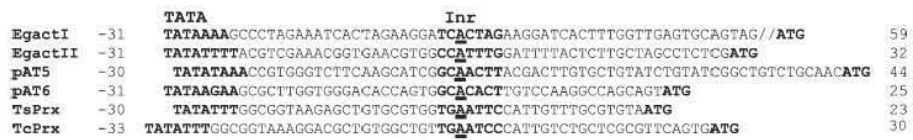


Fig. 2 Multiple alignment of Cestoda promoter nucleotide sequences. Non-coding 5' upstream sequences of *E. granulosus* actin I and actin II (*EgactI*, *EgactII*) (da Silva et al. 1993), *T. solium* actins *pAT5* and *pAT6* (M2896, M2897), *Ts2-CysPrx* (*TsPrx*, FJ621569), and *Tc2-*

CysPrx (*TcPrx*, FJ621570) were manually aligned. TATA box and *Inr* sequence, and ATG start codon are in *bold*. The TSS is underlined. The symbol // denotes the lacking nucleotides 5'-AGAAGACAAATCCTTTGGTGAGCC-3'

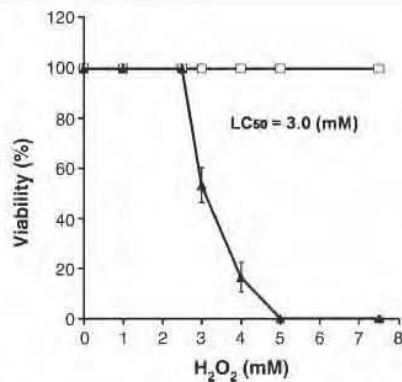


Fig. 3 Determination of the lethal concentration (LC₅₀) of *T. crassiceps* to H₂O₂. Cysticerci were exposed to different H₂O₂ concentrations for 1 h (triangles) prior viability determination (see “Materials and methods”). Parasites incubated in medium without H₂O₂ were used as a control (open boxes). Data are mean ± SD (*n*=8)

capacity of cysticerci scolex evagination, to follow its life cycle to adult worm. We found that parasite viability is reduced when H₂O₂ concentration is increased. Parasite viability remains unaffected up to 2 mM of H₂O₂, and after this concentration, it begins to decrease until it reaches zero at 5 mM. This viability kinetics showed that lethal concentration 50 (LC₅₀) of H₂O₂ is 3.0 mM (Fig. 3). These data were used to determine conditions for *Tc2-CysPrx* messenger RNA (mRNA) and protein expression assays. We evaluated the expression profile of the gene in parasites incubated in medium without oxidative insult. These experiments showed that *Tc2-CysPrx* mRNA expression levels remained un-

changed in cysticerci incubated in medium for up to 24 h (Fig. 4a). Therefore, we used 4 h of preincubation prior to the incubation of parasites with H₂O₂. As seen in Fig. 4b, *Tc2-CysPrx* mRNA expression level did not change in parasites incubated for 30 min with H₂O₂ concentrations ranging from 0 to 2 mM. Also gene mRNA expression level was not changed in parasites incubated with 1 mM of H₂O₂ for 0.5, 1, 2, 3, and 24 h (Fig. 4c). In these experiments, the expression level of *Tc2-CysPrx* mRNA was constant and the intensity of the bands was similar throughout time and concentrations of H₂O₂ used. On the other hand, *Tc2-CysPrx* protein expression level remained the same in parasites incubated with 0, 1, and 2 mM of H₂O₂ for 30 min (Fig. 4d).

Discussion

We have cloned one gene of a typical 2-Cys Prx in *T. solium* and *T. crassiceps*. Their genomic architecture and high identity at the level of primary and nucleotide sequence suggest that both genes are homologous. Computational analyses showed two putative sites for Nrf2 in their promoter sequence, a factor involved in the regulation of antioxidant genes (Lee and Johnson 2004). Besides we found putative sites for the transcription factors NF1 and Sp1, it is known that these transcription factors can interact with members of the basal transcription factor machinery, such as TBP and TFIIB (Xiao et al. 1994; Kim and Roeder 1994; Emili et al. 1994). However, functional studies should be done to corroborate these findings.

The proximal promoters of both genes have a TATA box, an Inr sequence, and a single TSS that corresponds to an A

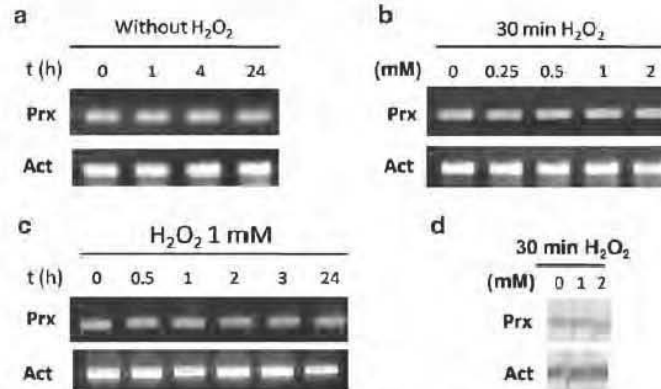


Fig. 4 Gene expression profile of *Tc2-CysPrx* from cysticerci exposed to H₂O₂ determined by RT-PCR and WB. Determination of expression of *Tc2-CysPrx* mRNA in cysticerci: a incubated in RPMI medium without H₂O₂ at 0 to 24 h; b exposed to different H₂O₂ concentrations for 30 min and c exposed to H₂O₂ 1 mM for different

times. d Determination of *Tc2-CysPrx* protein expression in parasites incubated 30 min in RPMI with H₂O₂ 1 and 2 mM. Expression experiments were done by triplicate and β-actin was used as a control. A representative gel and blot of each experiment is shown

located within the Inr sequence. This result is consistent with the data reported for a subset of mammalian genes where TSS is located in the Inr consensus sequence (YYANWYY) comprising -2 to +5 and which has a TATA box located at -28 to -34 from the TSS (Smale and Kadonaga 2003; Sandelin et al. 2007). Additional sequence analysis of other Cestoda genes showed that *pAT5*, *pAT6*, *EgactI*, and *EgactII* proximal promoters present strong similarities to the ones reported in this work, since all have a TATA and an Inr sequence with a conserved A placed in the mapped TSS on *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx*. Therefore, we mapped the TSS of *pAT6* and found it matches to the TSS of *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx*, which suggests that the Inr present in the genes analyzed could be functional and the TSS of *pAT5*, *EgactI*, and *EgactII* is conserved. The structural region of *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx* has two exons split by one intron with known splicing sequences (Padgett et al. 1986; Schellenberg et al. 2008). These analyses showed that proximal promoter sequences, such as Inr and TATA boxes, characterized in mammalian genes are also present in Cestoda genes and that splicing signals in *Taenia* genus are not different from other eukaryotic organisms.

Besides, we showed in vitro that *T. crassiceps* cysticerci have a LC₅₀ to H₂O₂ of 3 mM. This extreme concentration of H₂O₂ is never reached in the host. Therefore, the lack of catalase and probably the presence of a low GPx activity toward H₂O₂ in these parasites suggests that resistance to high H₂O₂ concentration in the medium could be conferred mainly by the typical 2-Cys Prxs. In this context, reports on *S. mansoni* and *S. japonicum* show that there are three typical 2-Cys Prxs isoforms in schistosomatids: a cytosolic overoxidation insensitive Prx1, which is overexpressed under oxidant conditions and which could participate in responsive antioxidant defense against exogenous H₂O₂; and a cytosolic Prx2 and a peptide-targeted mitochondrial Prx3, which are both housekeeping genes. The latter two are prone to overoxidation by the presence of a C-terminal overoxidation FM motif, which is similar to the YF motif of the *Taenia* genes studied (Sayed and Williams 2004; Molina-López et al. 2006). The absence of a mitochondrial signal peptide and the presence of the C-terminal YF motif suggest that *Ts2-CysPrx* and *Tc2-CysPrx* are cytosolic overoxidation susceptible Prxs, such as schistosomal Prx2. We found that at the RNA and protein levels *Tc2-CysPrx* is not overexpressed under oxidant conditions. This expression pattern has been observed in other typical 2-Cys Prxs, such as human Prx2 (Diet et al. 2007), the nematode *Haemonchus contortus* 2-Cys Prx (Bagnall and Kotze 2004), the *S. mansoni* Prx2 (Sayed et al. 2006) and *Plasmodium falciparum* PFTPX-1 (Yano et al. 2005). Lack of induction of *Tc2-CysPrx* suggests that this protein could be an antioxidant housekeeping gene for endogenous H₂O₂

that possibly participates as a redox regulator, rather than a responsive gene against exogenous oxidative stress. This is in accordance with our previous observations made in *Ts2-CysPrx*, where gene expression persists through all the life cycle of *T. solium*, even in the adult stage which is not subject to oxidative stress (Molina-López et al. 2006). It is likely that other non-enzymatic antioxidant systems could act to protect the parasite, as seen in *S. mansoni*, where oxidant conditions induce albumin silent gene expression as a sacrificial protein prone to oxidation (Sayed et al. 2006).

The shared proximal promoter architecture found in the Cestoda genes presented here suggests that the transcription machinery in these parasites is similar to their mammalian counterpart, and that Cestoda genes possess TATA and Inr sequences that serve for TSS positioning. This is the first report which describes a proximal promoter sequence of a gene in cestodes. Our findings provide new insights for further investigations of genes in taeniids of medical interest, which could contribute for their eradication.

Acknowledgments We thank MD. Alicia Ochoa Sánchez for technical help. The authors declare that the experiments comply with the current laws for animal use and care (NOM-062-ZOO-1999) of the country in which they were performed.

References

- Alvarez JI, Rivera J, Teale JM (2008) Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e218
- Batra S, Srivastava JK, Gupta S, Katiyar JC, Srivastava VM (1993) Role of reactive oxygen species in expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from rats. *Parasitology* 106:185–192
- Bonilla M, Denicola A, Novoselov SV, Turanov AA, Protasio A, Izmendi D, Gladyshev VN, Salinas G (2008) Platyhelminth mitochondrial and cytosolic redox homeostasis is controlled by a single thioredoxin glutathione reductase and dependent on selenium and glutathione. *J Biol Chem* 283:17898–17907
- Brehm K, Hubert K, Sciutto E, Garate T, Froesch M (2002) Characterization of a spliced leader gene and of trans-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *Mol Biochem Parasitol* 122:105–110
- Callahan HL, Crouch RK, James ER (1988) Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today* 4:218–225
- Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gómez E, Hernández R, Willms K, Lalette JP (1990) Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 40:87–93
- Cambin H, Kreczek RC, Cowan LD, Michael L, Foyaca-Sibat H, Nash T, Willingham AL (2006) Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop Med Int Health* 11:906–916
- Chalar C, Martinez C, Agorio A, Salinas G, Soto J, Ehrlich R (1999) Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from *Echinococcus granulosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 262:302–307

- da Silva CM, Henrique FB, Picón M, Gorfinkiel N, Ehrlich R, Zaha A (1993) Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 60:209–219
- Diet A, Abbas K, Bouton C, Guillon B, Tomasello F, Fourquet S, Toledano MB, Drapier JC (2007) Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages. *J Biol Chem* 282:36199–36205
- Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14:1582–1593
- Everhart ME, Kuhn RE, Zelmer DA (2004) Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. *J Parasitol* 90:79–84
- Kim TK, Roeder RG (1994) Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4170–4174
- Kozak M (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 20:8125–8148
- Kumagai T, Osada Y, Kanazawa T (2006) 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum*: the expression profile and localization in the life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 149:135–143
- Lee JM, Johnson JA (2004) An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol* 37:139–143
- Leid RW, Suquet CM (1986) A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniiformis*. *Mol Biochem Parasitol* 18:301–311
- Li J, Zhang WB, Loukas A, Lin RY, Ito A, Zhang LH, Jones M, McManus DP (2004) Functional expression and characterization of *Echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage. *Gene* 326:157–165
- 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
- Mei H, LoVerde PT (1997) *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp Parasitol* 86:69–78
- Molina-López J, Jiménez L, Ochoa-Sánchez A, Landa A (2006) Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*. *J Parasitol* 92:796–802
- Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 55:1119–1150
- Pérez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, de Aluja AA (2002) *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res* 88:150–152
- Rendón JL, del Arenal IP, Guevara-Flores A, Uribe A, Plancarte A, Mendoza-Hernández G (2004) Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Mol Biochem Parasitol* 133:61–69
- Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38:1543–1552
- Salinas G, Cardozo S (2000) *Echinococcus granulosus*: heterogeneity and differential expression of superoxide dismutases. *Exp Parasitol* (94):56–59
- Salinas G, Fernández V, Fernández C, Selkirk ME (1998) *Echinococcus granulosus*: cloning of a thioredoxin peroxidase. *Exp Parasitol* 90:298–301
- Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA (2007) Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8:424–436
- Sayed AA, Williams DL (2004) Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 279:26159–26166
- Sayed AA, Cook SK, Williams DL (2006) Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. *J Biol Chem* 281:17001–17010
- Schellenberg MJ, Ritchie DB, MacMillan AM (2008) Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition. *Trends Biochem Sci* 33:243–246
- Smale ST, Kadonaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72:449–479
- Torres-Rivera A, Landa A (2008) Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 477:372–378
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350–4354
- Vaca-Paniagua F, Torres-Rivera A, Parra-Unda R, Landa A (2008) *Taenia solium*: antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines. *Curr Top Med Chem* 8:393–399
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300:650–653
- Xiao H, Lis JT, Xiao H, Greenblatt J, Friesen JD (1994) The upstream activator CTF/NF1 and RNA polymerase II share a common element involved in transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 22:1966–1973
- Yano K, Komaki-Yasuda K, Kobayashi T, Takemae H, Kita K, Kano S, Kawazu S (2005) Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage. *Parasitol Int* 54:35–41

Taenia solium: Antioxidant Metabolism Enzymes as Targets for Cestocidal Drugs and Vaccines

F. Vaca-Paniagua, A. Torres-Rivera, R. Parra-Unda and A. Landa*

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio A, 2° Piso, Ciudad Universitaria, 04510 México D. F., México

Abstract: This review focuses in the role that antioxidant enzymes play in protection and other important physiological functions such as signal transduction, cell differentiation, growth and apoptosis. Parasites use these enzymes to evade ROS produced by the host immune response and for development inside the host. In the cestoda *Taenia solium*, three antioxidant enzymes have been studied: a cytosolic Cu,Zn superoxide dismutase that is a target of cestocidal drugs (bencimidazoles); a 2-Cys peroxiredoxin that is a regulatory enzyme of H₂O₂, molecule essential for several physiological functions; and two isoforms of glutathione transferases that are immunological targets, since they protect immunized mice against cysticercosis. Moreover, all these enzymes are present in all stages of the parasite. These findings suggest that antioxidant enzymes have an important role in *T. solium* physiology and infection, therefore they might represent the Achilles' heel of the parasite.

Keywords: *Taenia solium*, antioxidant metabolism, superoxide dismutase, 2-Cys peroxiredoxin, glutathione transferase.

ENZYMES OF ANTIOXIDANT METABOLISM

Taenia solium, in human and pig infection, must confront host immune response [1]. Oxidative damage produced by reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl radical is one of the major challenges that the parasite must confront. Besides, ROS attack all cellular components and produce new and more aggressive ROS such as lipid hydroperoxides and reactive carbonyls [2]. It is well known that these molecules can damage or kill parasites [3]. Nevertheless, ROS are necessary for the physiology of organisms, in processes such as signal regulation, cell differentiation, growth and apoptosis [4, 5]. *Taenia solium* is armed with enzymatic ROS scavengers such as superoxide dismutase (SOD), 2-Cys peroxiredoxin (2-Cys Prx), and two glutathione transferases (GSTs). Antioxidant enzymes are also responsible for maintaining a fine balance between external and internal ROS in cells. To date, only these three enzymes from the antioxidant metabolism have been studied in *T. solium*.

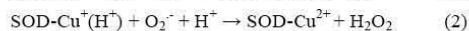
1) Superoxide dismutases are a family (SOD, E.C. 1.15.1.1) of metalloenzymes which catalyze the O₂⁻ dismutation into H₂O₂ and oxygen (O₂). They are classified in four types, according to the metal present in the catalytic site of the enzyme: manganese (Mn-SOD); copper-zinc (Cu,Zn-SOD); iron (Fe-SOD); and nickel (Ni-SOD) [6, 7, 8]. Each SOD is encoded by a different gene and they have different structures and subcellular localizations. To date, two types of SODs have been reported in helminths: a Mn-SOD that is localized into the mitochondrial matrix with a homotetrameric structure of ~96 kDa, constituted by monomers of ~22 kDa. Every monomer contains a Mn³⁺ atom coordinated with the H²⁶, H⁸¹, H¹⁷¹, D¹⁶⁷, Q¹⁴⁶ amino acids [9]. It is an essential gene, since knock out mice (Mn-SOD^{-/-}) are severely affected and die only a few days after

birth [10]. Helminths also possess two enzymes of Cu,Zn-SOD, an extracellular Cu,Zn-SOD (ECCu,Zn-SOD), which is secreted, due it has a hydrophobic signal peptide; and a cytoplasmic Cu,Zn-SOD (Cu,Zn-SOD), widely distributed in the cytosol and in the cell nucleus. ECCu,Zn-SOD is a tetrameric glycoprotein composed by four identical 30kDa subunits and prevents cell damage initiated by extracellular superoxide [11]. In contrast, Cu,Zn-SOD has a homodimeric structure with ~32 kDa. Recent reports showed that Cu,Zn-SOD-null *Drosophila melanogaster* and knock-out mice (Cu,Zn-SOD^{-/-}) exhibit a decreased growth rate and shortened lifespan [12, 13]. In addition, Cu,Zn-SOD expression is upregulated by phosphatidylinositol 3 kinase and nuclear factor-κB in rat cells [14]. Also, SOD is implicated in regulation and cell growth through the control of O₂⁻ levels in the activation of signaling pathways (e.g. ras/rac-Raf1-MAPK and Raf/MEK/ERK) [15, 16].

Both Cu,Zn-SOD enzymes contain one atom of Cu²⁺ and one of Zn²⁺ at the active site. Copper is coordinated with histidines (H⁴⁶, H⁴⁸, H⁶³, H²²⁰), one of which makes a bridge between Cu and Zn. Zinc is bound to amino acids H⁶³, H⁷¹, H⁸⁰ and D⁸³, forming a structure that resembles a Zn finger domain [17]. Each monomer folds as a flattened Greek-key β-barrel, made of eight antiparallel β-strands connected by seven loops. This barrel forms a channel by which O₂⁻ is directed to the active site by a positive electrostatic field constituted by charged residues. The channel and metal-binding amino acid residues are conserved in virtually all known Cu,Zn-SODs [11]. The mechanism of catalysis involves two general steps. 1) Cu²⁺ reduction by one molecule of O₂⁻ to produce molecular oxygen, and 2) Cu⁺ oxidation by another O₂⁻ molecule to generate H₂O₂. First step involves coordination of O₂⁻ to the oxidized copper center stabilized by a conserved R¹⁴¹, where one electron is transferred from O₂⁻ to SOD-Cu²⁺, yielding O₂ and the reduced SOD-Cu⁺(H⁺) complex. In this process imidazole ring of H⁶¹ is protonated. In the second step another O₂⁻ is driven electrostatically through the channel to the active site and coordinated with SOD-Cu⁺ and R¹⁴¹. The proton gained by H⁶¹ is transferred to the O₂⁻, while another proton is taken from one water

*Address correspondence to this author at the Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio A, 2° Piso, Ciudad Universitaria, 04510 México D. F., México; Tel: (52 55) 5623-2357; Fax: (52 55) 5623-2382; E-mail: landap@servidor.unam.mx

molecule. This reaction produces H_2O_2 and the regeneration of active-site copper (SOD-Cu^{2+}) and H^{61} , completing the catalytic cycle.



In platyhelminthes such as *Schistosoma mansoni* (Trematoda), two Cu,Zn-SOD enzymes have been identified: a cytosolic and other extracellular that contains a signal peptide. Both are coded by different genes. They are localized in the subtegumental tissue and one is secreted to the host-parasite interface [18, 19]. The Cu,Zn-SOD cDNAs of *S. mansoni* and *Fasciola hepatica* have been cloned and characterized [20, 21]. Recently, a crystal structure of *S. mansoni* cytosolic Cu,Zn-SOD (SmCtSOD) was solved [22]. This study showed that SmCtSOD and human Cu,ZnSOD have differences in two amino acids (L^{132} and V^{135}) that are in the entrance of the channel near the active site. These amino acids play an important role in conformation and charge distribution for substrate attraction; therefore they could be used to develop inhibitors against the parasite enzyme. On the other hand, SOD has been used as target for drugs and in vaccination studies. For example, immunization experiments using *S. mansoni* Cu,Zn-SOD enzyme and DNA constructs of the gene showed significant levels of protection in mice [23]. Moreover, *in vitro* inhibition assays with benzimidazoles and pyrimidine derivatives on crude extracts from trematodes (*F. hepatica* and *Dicrocoelium dentriticum*) and cestodes (*Moniezia expansa*, *M. benedeni*, *Avitellina centripunctata*, *Dipylidium caninum* and *T. hydatigena*) showed a decrease in SOD activity [24, 25]. In other study, mice infected with *Echinococcus granulosus* cysts, treated with mebendazole showed an increase in the parasite SOD activity. In contrast, albendazole and praziquantel had no effect on the activity of this enzyme [26]. On the other hand, there are several reports in nematodes of the existence of Mn-SOD [27], and only one report in trematodes [28], but there are not reports for cestodes.

Cu,Zn-SOD has been purified of cysticerci extracts from *T. taeniaeformis* and *T. solium* (Cestoda). These enzymes have tetrameric and dimeric structures, with ~64 and ~30 kDa, respectively [29, 30]. In *T. solium* a clone encoding a Cu,Zn-SOD was isolated from a cDNA library of the larval stage. The deduced amino acid clone indicates that the enzyme has a predictive monomeric Mr of ~15.6 kDa, the classical motifs and amino acids involved in the function of cytosolic Cu,Zn enzymes. Amino acid sequence analysis revealed 71% identity with *S. mansoni*, 60% with mammalian and less than ~54% with other helminth Cu,Zn-SODs, and the conserved β -barrel structure of the enzyme consisting of eight antiparallel β -strands joined by loops (Fig. 1). This barrel constitutes the channel through O_2^- is conducted to the catalytic site, where H_2O_2 and O_2 are produced. A functional recombinant *T. solium* Cu,Zn-SOD of 30 kDa was produced and western blot analysis with antibodies against this enzyme showed that this enzyme is expressed in all stages of the parasite. Antibodies did not affect the enzymatic activity; nevertheless, they crossreacted with several *Taenia* species but not with trematodes, nematodes, pig, human or bovine Cu,Zn-SOD enzymes. In

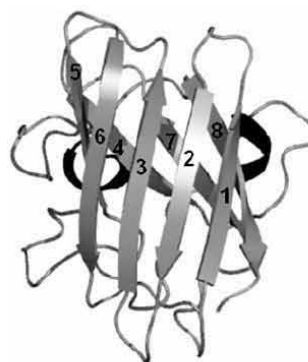
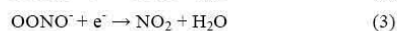
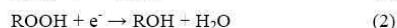
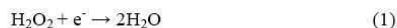


Fig. (1). Structural model of *Taenia solium* Cu,Zn-SOD monomer. It shows the β -barrel structure formed of eight antiparallel β -strands (arrows) joined by loops (lines). Model was constructed by MODELLER program [32].

in vitro studies with thiabendazole and albendazole inhibited the activity of *T. solium* Cu,Zn-SOD, but not the bovine Cu,Zn-SOD [31]. Interestingly, these data show structural differences between the SOD of this parasite and its hosts.

2) Peroxiredoxins (Prxs, E.C. 1.11.1.15) are conserved enzymes reported from archaeobacteria to humans, covering plants, mammals, protozoa and helminths [33]. These peroxidases catalyze the reduction of 1) hydrogen peroxide (H_2O_2) to water; 2) hydroperoxides (ROOH) to the corresponding alcohol and water; and 3) peroxyxynitrite (OONO^-) to nitrite and water, using thioredoxin as electron donor [34-36].



Prxs do not need prosthetic groups, metals or coenzymes for their catalysis. Their structural classification is based on whether they use one or two cysteines for catalysis. According to this, there are 1-Cys and 2-Cys Prxs. The 1-Cys Prxs have only one cysteine inside the amino terminal motif PVCT (N-Cys), while the 2-Cys have the conserved N-Cys in the motif FVCP and a carboxy terminal cysteine (C-Cys) in the motif VCPA [37]. Additionally, 2-Cys Prxs can be further divided into 2-Cys typical and 2-Cys atypical. In the three classes the first step of catalysis, thiolate and sulfenic acid formation, is the same. Typical 2-Cys Prxs are homodimers joined head to tail, where the N-Cys is facing the C-Cys of the adjacent monomer. Their catalytic mechanism involves the formation of the thiolate form of the N-Cys (N-Cys-S⁻), stabilized by guanidino group of R¹²⁷. This highly reactive thiolate reduces the peroxide in a nucleophilic attack yielding the cysteine sulfenic acid (N-Cys-SOH) and water. The reaction causes a local rearrangement of the active site exposing the N-Cys-SOH to the solvent. This structural modification brings the otherwise far (~10 Å) C-Cys of the other monomer close enough for the formation of an intermolecular disulphide bond in a conden-

sation reaction between the two cysteines. The next step is the reduction of the disulfide by thioredoxin, which renders the active form of the enzyme ready for thiolate formation [38]. Atypical 2-Cys Prxs are monomeric proteins in which the N-Cys sulfenic acid reacts with the C-Cys of the same monomer forming an intramolecular disulfide bond, which is reduced by thioredoxin. The 1-Cys Prxs are monomers that have only the N-Cys. The identity of the molecule or molecules that react with the N-Cys sulfenic acid of 1-Cys Prx are still uncertain. Recent studies in mammals and yeasts have demonstrated that 2-Cys Prxs, although antioxidant, are not just backup systems for other peroxidases, instead, they participate in signal transduction regulation [39]. For example, knock out experiments of 2-Cys Prx in mammalian cells showed an up regulation of JNK and p38 MAPK pathways in response to TNF α . In contrast, the increased expression of the enzyme had a down regulation effect on these two signaling pathways after induction with TNF α [40]. In this respect, it has been demonstrated their participation in regulation resides in the capacity of the active site sulfur to be oxidized from Cys-SOH (cysteine sulfenic acid) to Cys-SO₂H (cysteine sulfinic acid) under oxidative stress during catalysis [41]. This "overoxidation" is absent in all other known peroxidases (e.g. catalase, glutathione peroxidase) and renders 2-Cys Prxs catalytically inactive. Overoxidation, previously thought to be biologically irreversible, is slowly reversed by two ATP-dependent reductases, sulfiredoxin and sestrin [42, 43]. Although there are other proteins with cysteines that can be oxidized to the sulfinic form, sulfiredoxin reduction of this group is specific for 2-Cys Prxs [44]. Under this light, Wood and colleagues have suggested that they may act as molecular sensors or "floodgates" of hydrogen peroxide, distinguishing between signal transduction and the deleterious effect of this oxidant molecule. This model postulates that under normal conditions H₂O₂ is reduced by Prxs, while in elevated endogenous production caused by signal transduction, they become temporally inactive (opening the floodgate) enough time for the signal to take place [45]. Two motifs are responsible for overoxidation of the 2-Cys Prx enzyme, the GGLG and the YF motifs localized in the carboxy terminal site. In a *S. mansoni* 2-Cys Prx, Sayed and colleagues demonstrated that the transference of an YF motif from an overoxidation sensitive 2-Cys Prx to an overoxidation insensitive 1-Cys Prx converts the last in an overoxidation sensitive enzyme [46]. This work highlights the biological significance of these motifs in the regulation of catalysis. In Prxs with N-Cys-SOH, these motifs face each other burying the catalytic site away from the C-Cys-SH of the adjacent monomer, preventing the formation of the disulfide bond. This fact permits N-Cys-SOH to be further oxidized to N-Cys-SO₂H, resulting in the inactivation of the enzyme [45].

Several 2-Cys Prxs have been cloned in platyhelminthes, and due to the apparent lack of catalase and low activity of glutathione peroxidase in these organisms, it's believed that they play an important role in parasite defence against host immune-derived oxidative stress [27]. *S. mansoni* (SmPrx2, SmPrx3) and *F. hepatica* (FhePrx) enzymes have revealed similar structure and overoxidation (GGLG and YF) motifs as their mammalian homologues [46, 47].

Taenia solium possess a typical 2-Cys Prx (Ts2-CysPrx) encoded by a single copy gene. The recombinant enzyme showed activity with both H₂O₂ and cumene hydroperoxide and has the regulatory GGVQ and FM motifs [48] (Fig. 2). Prxs of other cestodes, such as *E. granulosus* and *E. multilocularis*, also presented these motifs [49]. Additionally, Ts2-Cys Prx has the phosphorylation site V⁹⁰SRKE, described recently as an inactivating element for enzyme catalysis during mitosis, and two other putative sites (F¹⁶TCKA and F¹⁶⁴TDKH) that could be implicated in enzyme regulation [50]. Moreover, Ts2-Cys Prx is expressed during the entire life cycle and is localized in the parasite tegument. Furthermore, 2-Cys Prxs are expressed among the *Taenia* genus, as has been demonstrated by western blotting, where antibodies against Ts2-Cys Prx recognized a band of same molecular mass in *T. saginata* adult and *T. crassiceps* cysticerci protein extracts [48]. It has been proven that these organisms are resistant to extreme hydrogen peroxide concentrations *in vitro*, however, these significant mechanisms remain still unclear.

3) Glutathione transferases (GST, E.C. 2.5.1.18) comprise a versatile family of enzymes that were identified as glutathione (GSH) conjugators. This fact, placed them only as detoxification enzymes for a long time. The general reaction of conjugation of GSH to electrophilic compounds generates a conjugate that is transported out to the cell by several pathways [51-53]. The reaction can be a nucleophilic attack, aromatic substitution, epoxide ring opening, reversible Michael addition, isomerization or peroxidation.



In recent years a wide diversity of functions have been attributed to GSTs, such as leukotriene and prostaglandine biosynthesis, catabolism of aromatic amino acids, xenobiotic transport, modulation in signal process, ion channel modulation and/or formation [51-55].

The GSTs are grouped in three subfamilies according to their cell location: 1) mitochondrial GSTs; 2) microsomal or MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism); and 3) cytosolic or canonical GSTs. The first group includes the unique kappa (K) class. This class has a very high peroxidase activity and its location suggests a main role in β -oxidation of fatty acids. Formerly, K class was included with cytosolic GSTs, but a new hypothesis about its evolution postulates this class is not the ancestor of cytosolic GSTs, instead, both evolved together and then diverged [52, 53]. The second group, microsomal GSTs, is the less characterized of the three. Some studies have identified four classes (I, II, III and IV). However, these classes are not well defined yet. Microsomal GSTs are very different to mitochondrial and cytosolic GSTs in gene, primary and tertiary structure. They are involved in eicosanoid metabolism, synthesis of leukotrienes and prostaglandins and activation of some lipoxygenases. The first microsomal GST was identified by conjugation with GSH, but this activity is not their main function [52, 54].

The last group, cytosolic GSTs, is the best characterized. The group members could be divided in 1) organism-specific GST classes such as lambda (L), phi (F) and tau (U) in plants, beta (B) in prokaryotes, delta (D) and epsilon (E) in

HsPrx2	-----MASGN-----ARIGKPAPDFKATAVVDGAFKEVKLSDYKGYV	39
SmPrx2	-----MLLPNQAPDFEGTAVIGTELRLPISLSQFQGYVL	35
SmPrx3	MLLQGFIKGALRYNRSSVSNLCRHYAAHVQRPAVDFCGTAVVDGQFKEIKLRDFAGKYL	60
Ts-2CysPrx	-----MHEAAAVIGRPAPGFTCKALVDGELKDVLSLDYKGYVI	39
EgPrx	-----MAAVVGKLA ^{PSFT} CKALVDGELKDVLSLDYR ^{GKYVI}	36
EmPrx	-----MVALVGKLA ^{PSFT} CKALVDGELKDVLSLDYR ^{GKYVI}	36
HsPrx2	LFFYP ^{LDFT} FVCPTEIIAFSNRAEDFRKLGCEVLGVSVDSPNHLAWINTPRKEGGLG ^{PL}	99
SmPrx2	LVFYP ^{LDFT} FVCPTEIIAFSERA ^{EFQSRG} CVIACSTDSVYAH ^{LAWTKLDRKAGGLG} QM	95
SmPrx3	LFFYP ^{LDFT} FVCPTEIIAFSDRID ^{EFKNEG} VEVGVSTDSH ^{FSHLAWINTPRKEGGLG} GL	120
Ts-2CysPrx	LFFYPMD ^{FTFV} CPTEIIAFNDRAGEFH ^{QRGCQLL} ACSTDSAYSHLAWNNVSRKEGGV ^{QGM}	99
EgPrx	LFFYPMD ^{FTFV} CPTEIIAFNDRAGEFH ^{QRGCQLL} ACSTDSGYCHLAWNNVSRKEGGV ^{QGM}	96
EmPrx	LFFYPMD ^{FTFV} CPTEIIAFNDRAGEFH ^{QRGCQLL} ACSTDSGYCHLAWNNVSRKEGGV ^{QGM}	96

HsPrx2	NIPLLGDVTRRLSE ^{DYGL} KTDEGIAYRGLFIIDGKGLRQITVNDLPVGRSVDEALRLV	159
SmPrx2	NIPLLSDKNLRISR ^{AYEVL} DEQEGHAFRGMFLIDRKGILRQITVNDLPVGRSVDEAIRLL	155
SmPrx3	RYPLLDYQKQVTRDY ^{GVLH} EELGVALRGLFIISADGIIRQITINDLPAGRSVDEVLRLV	180
Ts-2CysPrx	KIPMLADTNHRI ^{SRDYGL} IEEQGVALRGLFIIDDKGILRQITINDLPVGRSVDEALRLV	159
EgPrx	RIPMLADTNHRI ^{SRDYGL} IEDQGIALRGLFIIDDKGILRQITINDLPVGRSVDEALRLV	156
EmPrx	RIPMLADTNHRI ^{SRDYGL} IEDQGIALRGLFIIDDKGILRQITINDLPVGRSVDEALRLV	156
HsPrx2	QAFQYTD ^{EHGEV} CPAGWKPGSDTIKPNVDSK ^{EYF} SKHN	198
SmPrx2	DAFIFFEKHGEVCPANWKPNSATIKPDPVASL ^{SYF} SSVH	194
SmPrx3	RAFQYTDKYGEVCPADWQPKGPTIKPDLK ^{KYK} EYFHKVN	219
Ts-2CysPrx	DAFQFTDKHGEVCPANWRPGSKAFKPNAGDLK ^{FMSS} --	197
EgPrx	DAFQFTDKHGEVCPANWQPGSKTFKPSAGDLK ^{FMSS} --	193
EmPrx	DAFQFTDKHGEVCPANWHPGSKTFKPSAGDLK ^{FMSS} --	193

Fig. (2). Alignment of 2-Cys Prxs of human and platyhelminthes. HsPrx2, *Homo sapiens* (P32119); SmPrx2, *Schistosoma mansoni* (AAG15598); SmPrx3, *Schistosoma mansoni* (AAG15509); Ts-2CysPrx, *Taenia solium* (AAV91322); EgPrx, *Echinococcus granulosus* (AAD02002); EmPrx, *Echinococcus multilocularis* (BAC11863). Catalytic domains are marked with asterisks, overoxidation regulatory motifs are in bold and Cestoda putative phosphorylation sites are underlined. Alignment was done with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

insects; and 2) ubiquitous classes such as mu (M), alpha (A), pi (P), theta (T), sigma (S), zeta (Z) and omega (O) classes. This classification was established according to biochemical, genetic, immunological and structural properties. All these enzymes have subunits of 24 to 27 kDa, with an average of 250 amino acids in their primary structure and all share the same tertiary and quaternary structure: dimers with subunits composed of two domains. The first domain, the G site, is located at the N-terminal portion and is responsible for GSH binding. This domain is conserved in all classes and has a thioredoxin like fold constructed by three helices and four sheets ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$). In the G site, according to the class, the amino acids Y⁷ (M, P and A classes) or S¹⁷ (T, Z, F, U and D classes) or C¹⁰ (O and B classes) are responsible for GSH activation. Activation allows the nucleophilic attack to the electrophilic compound. Second domain, named H site, embraces C-terminal region. This region binds the substrate and it is constituted exclusively by α -helices. The number of the helices can change from four to seven among classes. This variation has been used as an argument to explain the wide range of substrates for detoxification and also specificity among classes [51-53, 55]. Each monomer contains the G and H domains. The dimer can be formed by identical (homodimers) or different (heterodimers) subunits of the same class. Until now, the reason for activity of GST as dimers is not clear, however, the stabilization of dimeric structure has been related to the cooperativity between

subunits. This process has been shown in some GSTs, although allosteric changes have not been demonstrated [56].

In Platyhelminthes, first GSTs identified came from the Trematoda *S. japonicum*, *S. mansoni* and *F. hepatica* [58, 59]. In Cestoda two native GSTs of *T. solium* with a molecular mass of 25.5 (SGSTM1) and 26.5 kDa (SGSTM2) were copurified from a soluble extract of cysticerci [60]. Amino terminal sequences and preliminary activity determinations with 1-Chloro-2, 4-nitrobenzene (CNDB, the universal substrate for GSTs) and other substrates showed that both GSTs have resemblance to the M class [60, 61]. Primary structure of a recombinant SGSTM1 revealed the presence of the mu-loop, the typical motif of that class. In addition, the activity ranges with substrates such as ethacrynic acid, bromosulphophthalein, some alkenals, cumene hydroperoxide, and its sensitivities to inhibitors such as cibacron blue, bromosulphophthalein and chlorotriphenyltin, confirmed its mu nature. Furthermore, vaccination assays carried out in a *T. crassiceps* murine cysticercosis model with both GSTs as antigens, showed a 90% decrease in parasite load, where 25% of that protection was given by SGSTM1 and the resting other 65% by SGSTM2. This finding suggests that both GSTs have great significance for the parasite survival [61]. Recently, a SGSTM2 was purified from a soluble extract of cysticerci, and characterized. In that study, properties such as activities with different substrates and sensitivities to class-specific inhibitors suggested that the

Table 1. Comparison Among Platyhelminthes Glutathione Transferases

Organism (Enzyme)	MW GST (kDa)	Pattern of activities with class markers (alternative substrates*)	Pattern of sensitivities class markers inhibitors*	Ref.
<i>Schistosoma japonicum</i> Sj26	26	M, P, A	M	[59]
<i>Schistosoma mansoni</i> Sm28	28	P	M	[59]
<i>Fasciola hepatica</i>				
Fh1	26	M	A	[58]
Fh7	26	A, P	M	
Fh47	26	M, P, A	A	
Fh51	26	M, P, A	M	
<i>Taenia solium</i>				
SGSTM1	25	M	M	[61]
SGSTM2	26	A, M, P	M	[62]
<i>Clonorchis sinensis</i>				
Cs28GST	28	A, M, P	A, M	[63]
CsGSTM1	26	A, M, P	A, M	[64]

* See text, section glutathione transferases.
M= mu class, A= alpha class, P= pi class.

enzyme shares characteristics of M and A classes [62]. Our biochemical studies on a recombinant SGSTM2 enzyme confirm this hybrid behavior (unpublished results), findings that are comparable with other platyhelminth GSTs (Table 1).

CONCLUDING REMARKS

After *T. solium* infects its host, it must defend against the immune response for establishment. Antioxidant enzymes act not only as ROS scavengers for cell protection, they operate also as regulators of its levels, permitting to carry out important physiological processes. It is well known that the resistance of the helminths on their hosts depend on the quantity of parasite antioxidant enzymes.

Three enzymes in *T. solium*, Cu,Zn-SOD, 2-Cys Prx and two forms of GST (GSTM1 and GSTM2) can inactivate ROS. Moreover, they are localized in the larval tegument, where the battle against immune host response takes place. On the other hand, the findings: 1) about the inactivation of the Cu,Zn-SOD activity by benzimidazoles; 2) the novel regulatory motifs found in Ts2-Cys Prx address the questions: are these motifs implicated in the ability of cysticerci to tolerate high quantities of H₂O₂? Are redox and signaling regulation processes similar or different in parasites and its hosts?; 3) the vaccination assays, where the glutathione transferases were able to confer high protection against cysticercosis in mice and 4) the discovery of epitopes on these enzymes, not found in the host enzymes, suggest that these enzymes can be used as targets to kill the parasite.

Our future efforts will be led to obtain the crystal structure of these enzymes to identify, by docking simulation and biochemical techniques, the binding sites for new

inhibitors and immunogenic regions to develop safe drugs and vaccines against *T. solium*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 43806-M) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA IN 207507-3). FVP, ATR and RPU were supported by scholarships (195340, 186255, 169062) from CONACyT.

REFERENCES

- Willms, K.; Merchant, M. T.; Diaz, S.; Arcos, L. Host-parasite interface in the metacystode of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*; Flisser, A.; Willms, K.; Lacleste, J. P.; Ridaura, C.; Beltran, F.; Eds.; Academic Press: New York, 1982, pp. 397-411.
- Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993, 15, 213-219.
- Callahan, H. L.; Crouch, R. K.; James, R. E. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanisms against host oxidants. *Parasitol. Today* 1988, 4, 218-225.
- Rhee, S. G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006, 312, 1882-1883.
- Buetler, T. M.; Krauskopf, A.; Ruegg, U. T. Role of Superoxide as a signaling molecule. *News Physiol. Sci.* 2004, 19, 120-123.
- Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 1995, 64, 97-112.
- Youn, H. D.; Kim, E. J.; Roe, J. H.; Hah, Y. C.; Kang, S. O. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* 1996, 15, 889-896.
- Beyer, W. F. Jr.; Fridovich, I. *In vivo* competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 303-308.
- Smith, M. W.; Doolittle, R. F. A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *J. Mol. Evol.* 1992, 34, 175-184.

- [10] Li, Y.; Huang, T. T.; Carlson, E. J.; Melov, S.; Ursell, P. C.; Olson, J. L.; Noble, L. J.; Yoshimura, M. P.; Berger, C.; Chan, P. H.; Wallace, D. C.; Epstein, C. J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 376-381.
- [11] Fattman, C. L.; Schaefer, L. M.; Oury, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35*, 236-256.
- [12] Reveillaud, I.; Phillips, J.; Duyf, B.; Hilliker, A.; Kongpachith, A.; Fleming, J. E. Phenotypic rescue by a bovine transgene in a Cu/Zn superoxide dismutase-null mutant of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1302-1307.
- [13] Reaume, A. G.; Elliott, J. L.; Hoffman, E. K.; Kowall, N. W.; Ferrante, R. J.; Siwek, D. F.; Wilcox, H. M.; Flood, D. G.; Beal, M. F.; Brown, R. H. Jr.; Scott, R. W.; Snider, W. D. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 43-47.
- [14] Rojo, A.I.; Salinas, M.; Martín, D.; Perona, R.; Cuadrado, A. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7324-7334.
- [15] Zimmerman, M. C.; Lazzarigues, E.; Lang, J. A.; Sinnayah, P.; Ahmad, I. M.; Spitz, D. R.; Davison, R. L. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 1038-1045.
- [16] Huang, W. C.; Chio, C. C.; Chi, K. H.; Wu, H. M.; Lin, W. W. Superoxide anion-dependent Raf/MEK/ERK activation by peroxisome proliferator activated receptor gamma agonists 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2, ciglitazone, and GW1929. *Exp. Cell. Res.* **2002**, *277*, 192-200.
- [17] Banci, L.; Benedetto, M.; Bertini, I.; Del Conte, R.; Piccioli, M.; Viezzoli, M. S. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* **1998**, *37*, 11780-11791.
- [18] Hong, Z.; LoVerde, P.T.; Thakur, A.; Hammarskjöld, M.L.; Rekosch, D. *Schistosoma mansoni*: a Cu/Zn superoxide dismutase is glycosylated when expressed in mammalian cells and localizes to a subtegumental region in adult schistosomes. *Exp. Parasitol.* **1993**, *76*, 101-114.
- [19] Mei, H.; LoVerde, P. T. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Exp. Parasitol.* **1997**, *86*, 69-78.
- [20] Mei, H.; Hirai, H.; Tanaka, M.; Hong, Z.; Rekosch, D.; LoVerde, P. T. *Schistosoma mansoni*: cloning and characterization of a gene encoding cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **1995**, *80*, 250-259.
- [21] Kim, T. S.; Jung, Y.; Na, B. K.; Kim, K. S.; Chung, P. R. Molecular cloning and expression of Cu/Zn-containing superoxide dismutase from *Fasciola hepatica*. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 3941-3948.
- [22] Cardoso, R. M.; Silva, C. H.; Ulian de Araujo, A. P.; Tanaka, T.; Tanaka, M.; Garratt, R. C. Structure of the cytosolic Cu,Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 569-578.
- [23] Shalaby, K. A.; Yin, L.; Thakur, A.; Christen, L.; Niles, E. G.; LoVerde, P.T. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine* **2003**, *22*, 130-136.
- [24] Sanchez-Moreno, M.; Garcia-Ruiz, M. A.; Garcia-Rejon, L.; Valero, A.; Leon, P. Superoxide dismutase in cestodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by a series of benzimidazoles and by pyrimidine derivatives of recent synthesis. *Arzneimittelforschung* **1989**, *39*, 759-761.
- [25] Sanchez-Moreno, M.; Leon, P.; Salas-Peregrin, J. M.; Garcia-Ruiz, M. A.; Monteliva, M. Superoxide dismutase in trematodes. Isoenzymatic characterization and studies of inhibition by a series of benzimidazoles and by pyrimidines of recent syntheses. *Arzneimittelforschung* **1987**, *37*, 903-905.
- [26] Feng, J. J.; Guo, H. F.; Yao, M. Y.; Xiao, S. H. Effects of mebendazole, albendazole, and praziquantel on glutathione S-transferase and superoxide dismutase of *Echinococcus granulosus* cyst wall harbored in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* **1995**, *16*, 297-300.
- [27] Henkle-Duhrsen, K.; Kampkotter, A. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *114*, 129-142.
- [28] Li, A. H.; Kong, Y.; Cho, S. H.; Lee, H. W.; Na, B. K.; Pak, J. K.; Kim, T. S. Molecular cloning and characterization of the copper/zinc and manganese superoxide dismutase genes from the human parasite *Clonorchis sinensis*. *Parasitology* **2005**, *130*, 687-697.
- [29] Leid, R. W.; Suquet, C. M. A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1986**, *18*, 301-311.
- [30] Gonzalez, R.; Mendoza-Hernandez, G.; Plancarte, A. Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitol.* **2002**, *88*, 881-887.
- [31] Castellanos-Gonzalez, A.; Jiménez, L.; Landa, A. Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* **2002**, *32*, 1175-1182.
- [32] Sali, S.; Blundell, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779-815.
- [33] Rhee, S. G.; Kang, S.W.; Chang, T. S.; Jeong, W.; Kim, K. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **2001**, *52*, 35-41.
- [34] Jacobson, F. S.; Morgan, R. W.; Christman, M. F.; Ames, B. N. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1488-1496.
- [35] Dubuisson, M.; Vander-Stricht, D.; Clippe, A.; Etienne, F.; Nauser, T.; Kissner, R.; Koppenol W. H.; Rees, J. F.; Knoops, B. Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Lett.* **2004**, *571*, 161-165.
- [36] Fujii, J.; Ikeda, Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 123-130.
- [37] Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1543-1552.
- [38] Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin-Harris, J.; Poole, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 32-40.
- [39] Kang, S. W.; Rhee, S. G.; Chang, T. S.; Jeong, W.; Choi, M. H. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 571-578.
- [40] Kang, S. W.; Chang, T. S.; Lee, T. H.; Kim, E. S.; Yu, D. Y.; Rhee, S. G. Cytosolic peroxiredoxin attenuates the activation of Jnk and p38 but potentiates that of Erk in Hela cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2535-2543.
- [41] Woo, H. A.; Kang, S. W.; Kim, H. K.; Yang, K. S.; Chae, H. Z.; Rhee, S. G. Reversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid. Immunoblot detection with antibodies specific for the hyperoxidized cysteine-containing sequence. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47361-47364.
- [42] Biteau, B.; Labarre, J.; Toledano, M. B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **2003**, *425*, 980-984.
- [43] Budanov, A. V.; Sablina, A. A.; Feinstein, E.; Koonin, E. V.; Chumakov, P. M. and Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* **2004**, *304*, 596-600.
- [44] Woo, H. A.; Jeong, W.; Chang, T. S.; Park, K. J.; Park, S. J.; Yang, J. S.; Rhee, S. G. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3125-3128.
- [45] Wood, Z. A.; Poole, L. B.; Karplus, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **2003**, *300*, 650-653.
- [46] Sayed, A. A.; Williams, D. L. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26159-26166.
- [47] Salazar-Calderon, M.; Martin-Alonso, J. M.; Ruiz de Eguino, A. D.; Casais, R.; Marin, M. S.; Parra, F. *Fasciola hepatica*: heterologous expression and functional characterization of a thioredoxin peroxidase. *Exp. Parasitol.* **2000**, *95*, 63-70.

- [48] Molina-Lopez, J.; Jimenez, L.; Ochoa-Sanchez, A.; Landa, A. Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*. *J. Parasitol.* **2006**, *92*, 796-802.
- [49] Salinas, G.; Fernandez, V.; Fernandez, C.; Selkirk, M. E. *Echinococcus granulosis*: cloning of a thioredoxin peroxidase. *Exp. Parasitol.* **1998**, *90*, 298-301.
- [50] Chang, T. S.; Jeong, W.; Choi, S. Y.; Yu, S.; Kang, S. W.; Rhee, S. G. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25370-25776.
- [51] Armstrong, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the Glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 2-18.
- [52] Frova, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 149-169.
- [53] Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 51-88.
- [54] Jakobsson, P. J.; Morgenstern, R.; Mancini, J.; Ford Hutchinson, A.; Persson, B. Common structural features of MAPEG—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 689-692.
- [55] Sheehan D.; Meade G.; Foley V. M.; Dowd C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classifications of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **2001**, *360*, 1-16.
- [56] Board, P. G.; Coggan, M.; Watson, S.; Gage, P. W.; Dulhunty, A. F. CLIC-2 modulates cardiac ryanodine receptorCa²⁺ release channels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1599-1612.
- [57] Liebau, E.; De Maria, F.; Burmeister, C.; Perbandt, M.; Turella, P.; Antonini, G.; Federici, G.; Giansanti, F.; Stella, L.; Lo Bello, M.; Caccuri, A. M.; Ricci, G. Cooperativity and Pseudo-cooperativity in the Glutathione S-Transferase from *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26121-26128.
- [58] Salvatore, L.; Wijffels, G.; Sexton, J.; Panaccio, M.; Mailer, S.; McCauley, I.; Spithill, T. Biochemical analysis of recombinant glutathione S-transferase of *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1995**, *69*, 281-288.
- [59] Walker, J.; Crowley, P.; Moreman, A.; Barret, J. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferase from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *61*, 255-264.
- [60] Vibanco-Pérez N.; Jiménez L.; Merchant M. T.; Landa A. Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* **1999**, *85*, 448-453.
- [61] Vibanco-Perez, N.; Jimenez, L.; Mendoza-Hernandez, G.; Landa, A. Characterization of a recombinant mu class glutathione S transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* **2002**, *88*, 398-404.
- [62] Plancarte, A.; Rendon, J. L.; Landa, A. Purification, characterization and kinetic properties of the *Taenia solium* glutathione S-transferase isoform 26.5 kDa. *Parasitol. Res.* **2004**, *93*, 137-144.
- [63] Kang, S.; Ahn, I.; Park, C.; Chung, Y.; Hong, S.; Kong, Y.; Cho, S.; Hong, S. *Clonorchis sinensis*: Molecular Cloning and Characterization of 28-kDa Glutathione S-Transferase. *Exp. Parasitol.* **2001**, *97*, 186-195.
- [64] Hong, S.; Lee, J.; Lee, D.; Sohn, W.; Cho, S. Molecular cloning and characterization of a mu-class glutathione S-transferase from *Clonorchis sinensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *115*, 69-75.

Copyright of *Current Topics in Medicinal Chemistry* is the property of Bentham Science Publishers Ltd. and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.