

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN
Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA DE UNA TIORREDOXINA
GLUTATIÓN REDUCTASA DEL ESTADIO ADULTO DE *Moniezia expansa* (TGRMe).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

TOMÁS MERAZ TAY

ASESORES

DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO

DRA. GABRIELA NAVA BALDERAS



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.

DEDICATORIA

A mi madre, por allanar el camino para que camine confiado.

A mi padre, mi primer maestro, amigo y guía.

A Coccocho, mi ejemplo y mentor.

A mis hermanas, por su consejo y su protección.

A todos los colegas anteriores, posteriores y contemporáneos; que cada paso que den en su desarrollo profesional, haga eco en la eternidad.

A mis amigos, mis aliados en la vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT),
UNAM. Proyecto IN202816.

Al Dr. Agustín Plancarte Crespo por su consejo y pasión al transmitir conocimiento.

A la Dra. Gabriela Nava Balderas, por su paciencia y su disposición para instruirme en las técnicas empleadas para el desarrollo de este trabajo.

A Gerardo, Ziad y Cinthia, por aconsejarme, apoyarme y acompañarme durante la realización de este trabajo.

A Wendy, por mantener el laboratorio en las condiciones óptimas para trabajar en todo momento.

Al Dr. Javier A. Munguía del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), por haber proporcionado amablemente los parásitos utilizados en este trabajo.

Al MVZ Víctor Salgado, por su consejo y amistad.

Al Dr. Héctor Quiroz Romero por sus aportaciones al presente trabajo, sus anécdotas y sus lecciones.

A la Dra. Amanda Gayosso Vázquez, por sus aportaciones al presente trabajo, y por su amable disposición para ayudarme durante su desarrollo.

A la Dra. Cintli Martínez Ortiz de Montellano, por sus consejos, aportaciones y por orientarme en el ejercicio del método científico.

Al Dr. Raúl Ullóa Arvizu por sus aportaciones al presente trabajo, y por enseñarme a citar adecuadamente.

Al Dr. Froylan Ibarra Velarde, por su participación en la evaluación del presente trabajo.

A la Dra. Ma. Antonieta Castelló Leyva, por alentarme a descubrir la belleza de nuestra profesión, por sus enseñanzas y su cariño.

A Alejandra Solís y Diana C. Montaña, por acompañarme en la licenciatura desde el primer día, por todo lo vivido y aprendido a su lado.

A Alejandra Pico, a María del Pilar Suárez Ponce de León y a Vivian Meléndez, por su respaldo, cariño y sincera amistad.

A Kees y a Fran, por su amistad, su confianza y sus invaluable enseñanzas.

A mis padres, por proveer los medios y el cariño detrás de cada uno de mis logros.

A mis hermanas, por respaldarme, aconsejarme y acompañarme en cada momento.

A Cococho y Rocío, por su consejo y consuelo, por vivir en mí.

A Chuy, mi hermano, por caminar la vida a mi lado.

A Merino, por su amistad incondicional.

A Alberto, Jorge, Maru y Nuria, por hacer de la amistad y de esta vida una celebración .

A Rebeca, por su amor y apoyo en los momentos desesperados.

A María, por la risa, el consuelo y las profundas reflexiones.

CONTENIDO.

Dedicatoria	II
Agradecimientos.....	III
Lista de contenido.....	V
Lista de cuadros.....	IX
Lista de figuras.....	X
Lista de abreviaturas.....	XII
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 <i>Moniezia expansa</i>	2
1.1.2 Ciclo de vida de <i>M. expansa</i>	3
1.2 Especies reactivas de oxígeno, radicales libres de oxígeno y peroxidación lipídica.....	3
1.3 Sistemas enzimáticos detoxificantes.....	6
1.3.1 Enzimas.....	6
1.3.2 Sistemas tiorredoxina (Trx) y glutatión (GSH).....	7
1.3.3 Tiorredoxina glutatión reductasa.....	9
1.3.4 Selenocisteína.....	10
1.4 Cinética enzimática.....	11
1.4.1 Cinética histerética.....	12

1.5 Inhibición enzimática.....	13
1.5.1 Inhibición competitiva.....	13
1.5.2 Inhibición acompetitiva.....	14
1.5.3 Inhibición no competitiva.....	15
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
5.1 Colecta de los parásitos adultos de <i>M. expansa</i>	18
5.2 Preparación del lisado celular con un inhibidor de proteasas.....	19
5.2.1 Homogenización de los tejidos de <i>M. expansa</i>	19
5.2.2 Ultracentrifugación.....	19
5.2.3 Filtración de la fracción S1.....	19
5.3 Obtención de proteínas solubles y su separación cromatográfica en DEAE-Sefarosa..	19
5.3.1 Equilibrio de la resina DEAE-Sefarosa.....	19
5.3.2 Cromatografía de intercambio iónico con resina DEAE-Sefarosa.....	20
5.3.3 Gradiente.....	20
5.4 Diálisis de la fracción eluidas de DEAE-Sefarosa.....	20
5.5 Cromatografía de proteínas por afinidad en 2'5' ADP-Sefarosa.....	21
5.5.1 Equilibrio de la resina 2'5'ADP-Sefarosa.....	21
5.5.2 Cromatografía de afinidad en 2'5' ADP-Sefarosa	21

5.6 Concentración de fracciones eluidas de 2'5'ADP-Sefarosa.....	21
5.7 Elaboración de geles de poliacrilamida para determinar la pureza de la TGRMe.....	22
5.7.1 Tinción de los geles.....	23
5.8. Espectrofotometría de masas en tándem (LC/ESI-MS/MS).....	24
5.9 Ensayos enzimáticos de la TGRMe.....	24
5.9.1 Ensayo de actividad de tiorredoxina reductasa.....	25
5.9.2 Ensayo de la actividad de glutarredoxina.....	25
5.9.3 Ensayo de actividad de glutatión reductasa.....	26
5.10 Evaluación de la actividad de la TGRMe en función del pH.....	26
5.11 Evaluación de la actividad de la TGRMe en función de temperatura.....	27
5.12 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de afinidad (K_M), velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), número de recambio (K_{cat}) y constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M).....	27
5.13 Estudios de inhibición enzimática de la TGRMe.....	29
5.13.1 Determinación de la I_{50}	29
5.13.2 Determinación del tipo de inhibición.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Purificación de la TGRMe.....	30
6.1.1 Ultracentrifugación y filtrado del lisado celular de la fase adulta de <i>M. expansa</i>	30
6.1.2 Cromatografía de intercambio iónico.....	30
6.1.3 Cromatografía de afinidad.....	31

6.1.4 Rendimiento a través de la purificación.....	32
6.2 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida.....	33
6.3 Estudio de péptidos.....	34
6.4 Caracterización bioquímica.....	35
6.4.1 Actividad catalítica de la TGRMe en función del pH	35
6.4.2 Estabilidad de la TGRMe en función de la temperatura.....	36
6.4.3 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidad máxima de reacción (V_{max}), número de recambio (K_{cat}) y constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M).....	37
6.4.4 Ensayo de la actividad de glutarredoxina.....	38
6.5 Estudio de inhibición de la TGRMe.....	40
6.1 Inhibición I_{50}	40
6.5.2 Tipo de inhibición de TGRMe.....	41
6.6 Histéresis.....	42
6.6.1 Ensayo de la actividad de GR de la TGRMe para obtener el desarrollo completo de la reacción (kinetic full-time courses) empleando diferentes concentraciones de la enzima parasitaria	42
6.6.2 Ensayo de la actividad de GR de la TGRMe para obtener el desarrollo completo de la reacción (kinetic full-time courses) empleando diferentes concentraciones de disulfuro de glutatión (GSSG).....	43
VII DISCUSIÓN.....	44
VIII. REFERENCIAS.....	47
ANEXO.....	53

Lista de cuadros

Cuadro 1	Clasificación internacional de enzimas según la reacción que catalizan.	7
Cuadro 2	Amortiguadores de reacción con diferentes valores de pH	27
Cuadro 3	Concentraciones de sustratos.	28
Cuadro 4	Resumen de la purificación de la TGRMe	33
Cuadro 5	Actividad específica y eficiencia catalítica de la TGRMe con distintos sustratos.	39

Lista de figuras

Figura 1	La TGR.	9
Figura 2	Estructura simplificada de la TGR.	9
Figura 3	Modelo en forma de cintas y líneas de la estructura de la TGR.	10
Figura 4	Fórmulas de la selenocisteína y de la cisteína.	11
Figura 5	Gráfica de Michaelis-Menten.	12
Figura 6	Gráfica doble recíproca con un tipo de inhibición competitiva.	14
Figura 7	Gráfica doble recíproca con un tipo de inhibición acompetitiva.	15
Figura 8	Gráfica doble recíproca con un tipo de inhibición no competitiva.	16
Figura 9	Cromatografía de la fracción S1 de <i>M. expansa</i> en la resina DEAE-Sefarosa.	31
Figura 10	Cromatografía de afinidad del eluido de DEAE-Sefarosa en resina 2'5'ADP-Sefarosa.	32
Figura 11	Análisis de la TGRMe en dos geles de poliacrilamida-SDS al 15%	34
Figura 12	Variación en la actividad de la TGRMe sometida a diferentes valores de pH.	35
Figura 13	Variación en la actividad de la TGRMe ante diferentes temperaturas.	36
Figura 14	Actividad de la TGRMe en presencia de concentraciones ascendentes de DTNB.	37
Figura 15	Actividad de la TGRMe en presencia de concentraciones ascendentes de NADPH.	38
Figura 16	Actividad catalítica de la TGRMe ante concentraciones diferentes de HED.	39
Figura 17	Porcentaje de actividad residual de la TGRMe en presencia de concentraciones diferentes de auranofín	40
Figura 18	Gráfica doble recíproca.	41

Figura 19	Ensayo de actividad de glutatión reductasa.	42
Figura 20	Comportamiento histerético observado en la TGRMe.	43

Lista de abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
Cys	Cisteína
DTNB	5,5'-ditiobis-[2-ácido nitrobenzoico]
EDTA	Ácido dietilenaminotetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSSG	Disulfuro de glutación
GSH	Glutación
Gpx	Glutación peroxidasa
GST	Glutación transferasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HED	2-hidroxietil disulfido
I ₅₀	Inhibición al 50%
K _M	Constante de Michaelis
K _{cat}	Número de recambio
K _{cat} /K _M	Constante de eficiencia catalítica
LOO	Radical peroxilo
LOOH	Hidroperoxilo lipídico
MQ (agua)	Agua desionizada
Mr	Factor de movilidad relativa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO	Monóxido de nitrógeno
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
OH	Radical hidroxilo
ONOO	Peroxinitrito
PAGE	Electroforesis de geles de poliacrilamida
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PL	Peroxidación lipídica
Prx	Peroxirredoxina
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libres de oxígeno
RNA	Ácido ribonucleico
[S]	Concentración de sustrato
S1	Sobrenadante 1
Sec	Selenocisteína
TGI	Tracto gastrointestinal
TGR	Tiorredoxina glutatión reductasa
TGRMe	Tiorredoxina glutatión reductasa de <i>Moniezia expansa</i>
TsTGR	Tiorredoxina glutatión reductasa de <i>Taenia solium</i>
cTsTGR	Isoforma citosólica de la TGR de <i>Taenia solium</i>
mTsTGR	isoforma mitocondrial de la TGR de <i>Taenia solium</i>
TGRMe	Tiorredoxina glutatión reductasa de <i>Moniezia expansa</i>
TR	Tiorredoxina reductasa
Trx	Tiorredoxina
V _{máx}	Velocidad máxima
V _o	Velocidad inicial

Resumen

MERAZ TAY TOMÁS. Identificación, purificación y caracterización bioquímica y cinética de una tiorredoxina glutatión reductasa del estadio adulto de *Moniezia expansa* (TGRMe). (Bajo la dirección del Biol. Dr. Agustín Plancarte Crespo y la Biol. Dra. Gabriela Nava Balderas).

En el presente trabajo, se explican detalladamente los procesos de homogeneización, filtración y separación de moléculas en una columna de intercambio iónico (DEAE-sefarosa) y una segunda columna de afinidad (2´5´ADP-sefarosa), para purificar a partir de los tejidos del adulto de *M. expansa*, a la enzima tiorredoxina glutatión reductasa. Posteriormente, se describen los ensayos enzimáticos que se realizaron para demostrar la actividad catalítica de los dominios tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa de la enzima, al confrontarlos con dos sustratos conocidos: el 5,5'-ditiobis-[2-ácido nitrobenzoico] (DTNB) y el NADPH, y con auranofín como sustancia inhibitoria. Las pruebas anteriores, demostraron una actividad específica de 6.2 U/mg con DTNB como sustrato, y permitieron la obtención de las principales constantes catalíticas de la TGRMe, donde se tuvo una $V_{\text{máx}}$ de $12.8 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, y una K_M de $54 \mu\text{M}$ para el DTNB, y una $V_{\text{máx}}$ de $10.8 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una K_M de $1.4 \mu\text{M}$ para NADPH. Se encontró que la temperatura óptima para el funcionamiento de la TGRMe es 30°C , mientras su pH óptimo es 9.

1. Introducción.

Recientemente en el laboratorio de Inmunobioquímica de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina, UNAM se purificaron y caracterizaron las isoformas citoplásmica y mitocondrial de la TGR de los cisticercos de *Taenia solium* (Plancarte, 2015). Hasta el momento no existe información sobre la presencia de alguna TGR u otra reductasa en los estadios adultos de los cestodos. Dado que *M. expansa* es un cestodo cuya manipulación no representa ningún riesgo para la salud humana y, aunado a la relativa facilidad con que se pueden obtener muestras de este parásito, resulta un modelo conveniente para profundizar en este tema parasitológico.

1.1 *Moniezia expansa*.

Moniezia expansa es un parásito intestinal de bovinos, ovinos y caprinos de distribución mundial que ocasiona problemas clínicos de diarrea, deficiente conversión alimenticia y retardo en el crecimiento. Diversos productos de excreción de *M. expansa* ejercen efectos tóxicos y oxidativos sobre la mucosa del aparato digestivo ocasionando diversas manifestaciones entéricas. La caquexia se presenta en animales jóvenes causando la muerte en algunos casos, con presencia de edemas en las partes bajas.

En ocasiones, en los animales infectados se pueden encontrar a los parásitos con algún grado de degeneración rodeada de un proceso inflamatorio, debido a la producción de radicales libres de oxígeno (RLO) como un resultado de la respuesta inmune de los huéspedes ante la presencia del parásito (Sevanian, 1997).

Por otro lado, *M. expansa*, ubicada en el intestino delgado de los rumiantes, llega a medir de 1 a 5 metros de longitud y puede permanecer ahí por prolongados periodos, inclusive en animales inmunológicamente competentes, de tal forma que probablemente *M. expansa*

desarrolle mecanismos de evasión inmune para permanecer en sus huéspedes sin ser afectada.

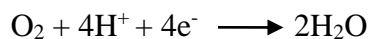
1.1.2 Ciclo de vida de *M. expansa*.

Los huevos de *M. expansa* son expulsados del tracto gastrointestinal (TGI) del huésped definitivo por medio de las heces. En ocasiones los proglótidos grávidos son liberados por acción física (Quiróz, 2012). Los huevos deben ser ingeridos por ácaros coprófagos de la familia *Oribatidae* y, una vez ingeridos, se forma el cisticercoide en la cavidad general del ácaro. Los huéspedes definitivos se infectan al alimentarse con pasturas contaminadas con dichos ácaros que, al ser digeridos, liberan al cisticercoide. Cuando el cisticercoide de *M. expansa* llega al intestino delgado, evagina y se adhiere a la mucosa del intestino donde alcanza su estadio adulto. Alrededor de las 6 semanas posteriores a la infección, se desarrollan los primeros proglótidos grávidos con la capacidad de liberar huevos, cerrando así el ciclo.

1.2 Especies reactivas de oxígeno (ERO), radicales libres de oxígeno (RLO) y peroxidación lipídica (PL).

Los organismos aerobios son aquellos que requieren del oxígeno [O₂] para respirar, reducen el O₂ en agua, y la energía de esta reacción, la emplean para formar ATP y transportar iones y metabolitos a través de las membranas celulares. Esta reacción es también conocida como reducción tetravalente del oxígeno, y consiste en la adición de cuatro protones y cuatro electrones por medio de la enzima citocromo C oxidasa; como resultado, se reduce al

oxígeno completamente y no se liberan especies parcialmente reducidas (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza, 2006):



El O₂ es indispensable para la vida de los organismos aerobios y en esta forma no es tóxico. Esto último es debido a que en su estado basal y a la temperatura ambiente el O₂ no reacciona, o lo hace lentamente con otros compuestos.

Una consecuencia en los organismos aerobios al utilizar el O₂ en diversos procesos fisiológicos, es la creación de especies reactivas de oxígeno (ERO), que incluyen a los radicales libres de oxígeno (RLO) y a los no radicales resultantes de la reducción molecular del oxígeno.

Los RLO son especies químicamente más reactivas que el O₂ por tener desapareado un electrón en su capa de valencia más externa. Para estabilizarse, los RLO realizan una función tóxica al extraer electrones de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, desnaturalizándolos. De esta forma los organismos pueden desarrollar enfermedades e incluso sucumbir por estos procesos oxidativos.

El oxígeno también forma compuestos con el nitrógeno y éstos pueden ser más reactivos y tóxicos que el O₂ en su estado basal de energía. Dentro de estas especies reactivas del nitrógeno (ERN) se encuentran el monóxido de nitrógeno u óxido nítrico (NO•), el dióxido de nitrógeno (NO₂•) y el peroxinitrito (ONOO-).

Se ha demostrado que las ERO y las ERN son utilizadas en una gran cantidad de procesos fisiológicos, desde el crecimiento y la proliferación hasta la diferenciación y la muerte

celular, pasando por la transducción de señales, en las que algunas de estas especies funcionan como segundos mensajeros (Warren,1989).

Adicionalmente, el O_2 es más soluble en ambientes hidrofóbicos que en el agua, y las membranas mitocondriales, en donde se lleva a cabo la respiración celular, están compuestas por lípidos que conforman un ambiente hidrofóbico. Estas observaciones en parte explican por qué en este organelo se originan la mayor cantidad de ERO en una célula.

También las respuestas inflamatorias, particularmente las dirigidas contra organismos patógenos, ocasionan la producción de ERO, por medio de reacciones de óxido-reducción o redox, las cuales inician los daños celulares presentes en diversas relaciones huésped-parásito.

Este daño celular es debido en buena parte a la peroxidación de los lípidos (PL) presentes en las membranas celulares, en el citoplasma y en los compartimentos extracelulares de los huéspedes. La PL forma parte de las respuestas inflamatorias que por su cronicidad originan granulomas (Tribble DL, 1987).

La PL es un conjunto de reacciones en cadena que se dividen en tres etapas denominadas: iniciación, propagación y terminación (Comporti M. 1993). La primera etapa consiste en la interacción de radicales libres (RL) con los ácidos grasos poliinsaturados. Las células inflamatorias al activarse con antígenos del organismo patógeno producen RL primarios como el O_2^{\bullet} . El O_2^{\bullet} se dismuta y en presencia de protones origina el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La interacción del H_2O_2 con el Fe^{++} vía la reacción de Fenton produce el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). Este OH^{\bullet} extrae hidrógenos alílicos de las cadenas de los ácidos grasos poliinsaturados originando un carbón radical en estas cadenas. Este carbón radical

reacciona fácilmente con moléculas de O_2 y forma el radical peroxilo (LOO^\bullet). El LOO^\bullet extrae hidrógenos de los ácidos grasos poliinsaturados vecinos y forma el correspondiente hidroperóxido lipídico ($LOOH$). La etapa de propagación es la reacción de un LOO^\bullet con otro ácido graso poliinsaturado produciendo un nuevo radical lipídico y un H_2O_2 . Adicionalmente, la descomposición de H_2O_2 catalizada por Fe^{++} origina radicales alcoxil y peroxil ampliando la etapa de propagación, ya que tal generación de radicales libres secundarios puede iniciar una nueva cadena de hidroperóxido lipídico. La etapa de terminación sucede cuando se combinan dos radicales originando un producto no radical.

1.3 Sistemas enzimáticos detoxificantes.

1.3.1 Enzimas.

Con la excepción de un pequeño grupo de moléculas de RNA catalíticas, todas las enzimas son proteínas (Lenhinger, 2013). Las enzimas son catalizadores de reacciones biológicas que permiten acelerar las reacciones en el cuerpo sin alterar su estructura, de manera que permanecen funcionales al terminar la reacción. De esta manera, todos los eventos metabólicos en el cuerpo están regulados por enzimas.

Algunas enzimas requieren de compuestos no proteicos para funcionar adecuadamente. A estos compuestos se les llama cofactores, en caso de tratarse de algún ión metálico, o coenzima si se trata de una molécula orgánica. El complejo enzima-cofactor se denomina holoenzima, y al separarse el cofactor, la proteína por sí sola se denomina apoenzima.

Ahora bien, si la enzima se encuentra covalentemente unida a su cofactor, el complejo se llamará grupo prostético (Lehninger, 2013).

Existe una clasificación internacional de las enzimas, que las divide en seis clases dependiendo del tipo de reacción que catalizan (Cuadro 1). La primera clase corresponde a las oxidoreductasas, que intervienen en reacciones de transferencia de electrones, es decir, reacciones de óxido-reducción, como las descritas en el apartado anterior.

Cuadro 1

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE ENZIMAS SEGÚN LA REACCIÓN QUE CATALIZAN. (Adaptación de Murray R. *et al.*, 2012)

<i>Número</i>	<i>Clase</i>	<i>Descripción</i>
1.	Oxidoreductasas	Reacciones de oxidación-reducción (transferencia de electrones)
2.	Transferasas	Transferencia de un grupo químico de un donador a un aceptor
3.	Hidrolasas	Ruptura hidrolítica de algún enlace del sustrato
4.	Liasas	Ruptura no hidrolítica de enlaces
5.	Isomerasas	Reacciones de isomerización
6.	Ligasas (sintetasas)	Formación de enlaces covalentes entre dos sustratos

1.3.2 Sistemas tiorredoxina (Trx) y glutatión (GSH).

Una de las múltiples formas conocidas para evitar que las ERO causen daño oxidativo a las células, es la acción de diversos sistemas enzimáticos detoxificantes que originan productos en cascada con los que interceptan a las ERO. Anteriormente, se han propuesto algunas enzimas detoxificantes que podrían participar en los mecanismos de evasión inmune en los helmintos. Entre estos se encuentran los sistemas detoxificantes y reguladores de la

homeostasis tiol/disulfuro redox en organismos aerobios como son el sistema tiorredoxina (Trx) y el sistema glutatión (GSH) (Salinas, 2004; Song *et al.*, 2012). El primero está formado por la enzima tiorredoxina reductasa (TR) y la proteína tiorredoxina (Arnér, 1999). En general, las tiorredoxinas son proteínas de alrededor de 12 kDa, que presentan un sitio activo redox disulfuro/ditiol dentro de la secuencia conservada Cis-Gli-Pro-Cis. Muchas enzimas importantes en los sistemas antioxidantes dependientes de tiol, como la glutarredoxina (Grx) (Aslund y Holmgren, 1997) (Dalle-Donne *et al.*, 2007) (Martin, 1995), glutatión transferasa (GST) (Sheehan *et al.*, 2001) y peroxirredoxina (Prx) (McGonigle *et al.*, 1998), tienen esta secuencia conservada llamada el pliegue de tiorredoxina (Martin, 1995) (Hirota *et al.*, 2002).

Por otro lado, el sistema GSH está conformado por el tripéptido glutatión (GSH), la glutatión peroxidasa [(Gpx) E.C. 1.11.1.9], la glutatión reductasa [(GR) E.C. 1.6.4.2 NADPH: GSSG oxidoreductasa] y la glutarredoxina [(Grx) EC 1.8.4.2].

En estudios anteriores sobre los sistemas redox tiol-disulfuro en platelmintos como *Schistosoma mansoni* (Alger, 2002), *Echinococcus granulosus* (Agorio *et al.*, 2003), *Taenia crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004) y *Taenia solium* (Plancarte, 2015) se ha encontrado que en contraste con otros organismos, estos parásitos no poseen las enzimas tiorredoxina reductasa (TR) y glutatión reductasa (GR), de forma independiente, ambas enzimas convencionales que regulan dichos sistemas. En su lugar se encuentra la tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR) como única enzima reguladora de ambos sistemas (Figura 1). (Salinas 2004).

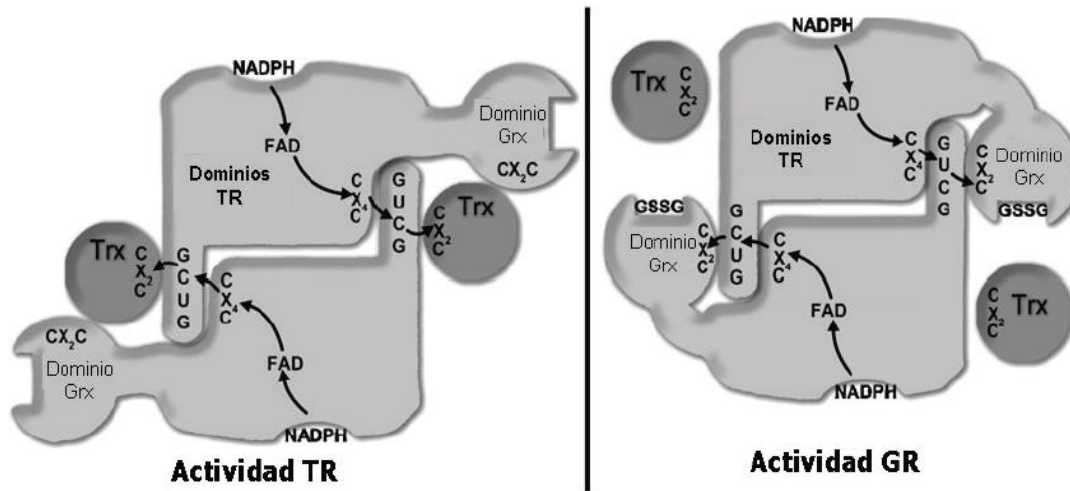


Figura 1. La TGR. Enzima híbrida reguladora de los sistemas tioredoxina y glutatión. Tomado de Salinas, 2010.

1.3.3 Tiorredoxina-glutatión reductasa (TGR).

La TGR, es una proteína homodimérica de alto peso molecular, dependiente de NADPH, en cuya estructura encontramos un dominio TR carboxi-terminal con un residuo esencial de selenocisteína fusionado a un dominio Grx amino terminal (Figura 2). Ambos dominios poseen un sitio activo independiente, cualidad que le permite proveer equivalentes reductores para los dos sistemas. (Williams, 2013).

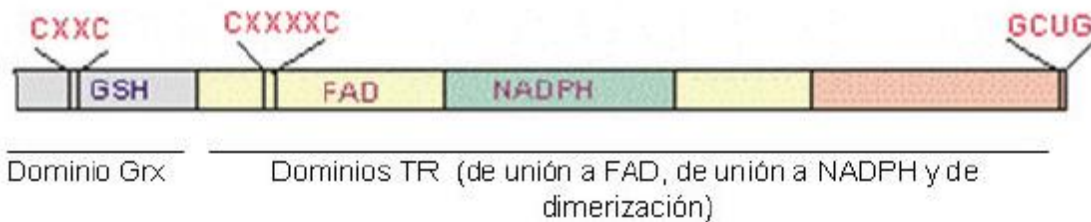


Figura 2. Estructura simplificada de la TGR. Tomado de Salinas, 2010.

Ambos dominios tienen la capacidad de contribuir en la reducción de los sustratos naturales del otro, sin embargo no son tan eficientes como con los sustratos propios debido a su especificidad.

En la figura 3, se muestra la estructura de una TGR en tres dimensiones. La simetría del cristal nos permite distinguir cada monómero conformado por un dominio TR y un dominio Grx.

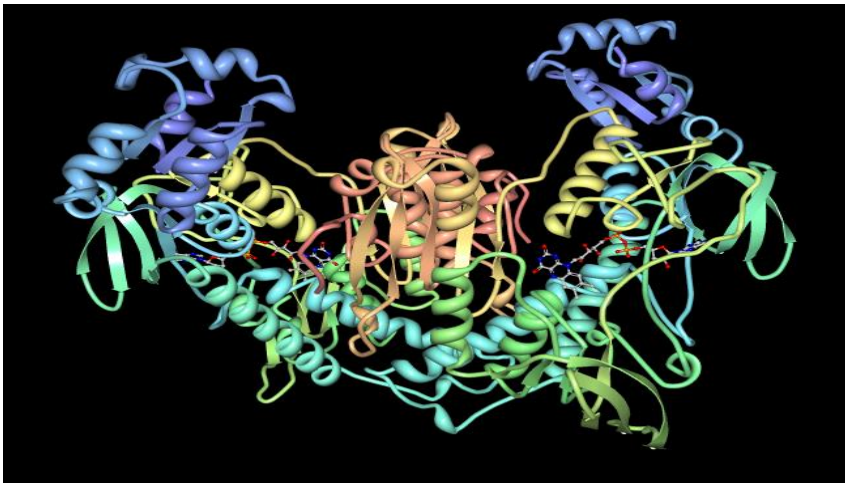


Figura 3. Modelo en forma de cintas y líneas de la estructura de la TGR de *S. mansoni*. Se identifican el dominio glutarredoxina (azul) y el dominio tiorredoxina (verde).

1.3.4 Selenocisteína.

La mayoría de los elementos traza que encontramos en los organismos vivos, funcionan como cofactores enzimáticos, sin embargo podemos encontrar al selenio formando parte de la estructura del aminoácido selenocisteína (Sec), presente en las selenoproteínas. Así, éstas proteínas participan en las funciones redox en un rango más amplio de pH que su aminoácido análogo, la cisteína (Cys), ya que a un pH neutro el tiol de cisteína se encuentra mayormente en su forma neutra, mientras el grupo selenol de la selenocisteína se encuentra

cargado negativamente (Figura 4). Además el átomo de selenio es más polarizable que el de azufre de la cisteína. (Salinas 2010).

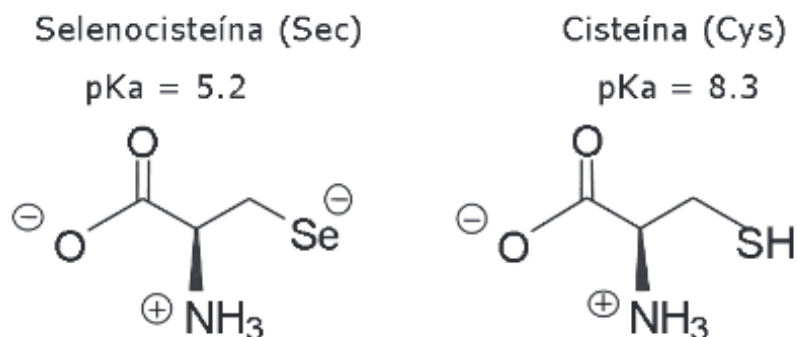


Figura 4. Fórmulas de la selenocisteína y de la cisteína. La cadena lateral de la selenocisteína está cargada negativamente a diferencia de la cisteína a pH neutro.

1.4 Cinética enzimática.

La cinética enzimática consiste en analizar matemáticamente el comportamiento catalítico de las enzimas. Gracias a dichos análisis, es posible determinar entre otras cosas: la duración y el comportamiento de las enzimas en sus diferentes fases; su afinidad por uno o varios sustratos; su sensibilidad a diferentes inhibidores; así como el rango óptimo de temperatura y pH en que funciona la enzima.

Cuando un ensayo enzimático se realiza con una cantidad de enzima constante y sustrato variable (de menor a mayor cantidad) se obtiene la gráfica de Michaelis-Menten (Figura 5) (Herve *et al.*, 2003). La ecuación de Michaelis-Menten, permite obtener la constante de Michaelis (K_M), que expresa el incremento en la velocidad de una reacción enzimática proporcionalmente a la cantidad de sustrato. En otras palabras, la ecuación de Michaelis-Menten expresa cuantitativamente la relación entre la velocidad inicial de la reacción (V_0),

la velocidad máxima que esta puede alcanzar, cuando toda la enzima presente está conformando un complejo enzima-sustrato ($V_{m\acute{a}x}$) (Segel, 1993), y la concentración inicial de sustrato $[S]$. Es apreciable que conforme se incrementa la cantidad de sustrato en la reacción, la enzima se satura, por lo que se forma una hipérbola apreciable en una gráfica de Michaelis-Menten. De esta manera, la expresión simplificada de la ecuación de Michaelis-Menten es:

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} [S]}{K_m + [S]}$$

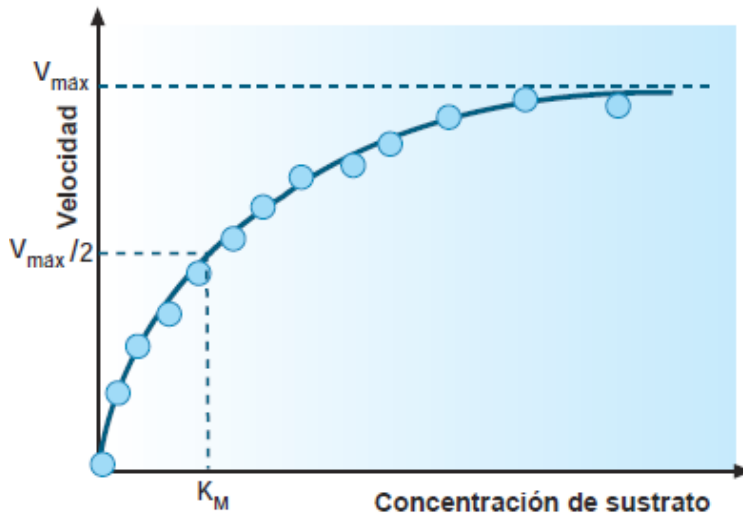


Figura 5. Gráfica de Michaelis-Menten. La gráfica presenta los valores de velocidad máxima en condiciones de saturación ($V_{m\acute{a}x}$) y el valor de la constante de Michaelis-Menten (K_M) que expresa la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$.

1.4.1 Cinética histerética.

Histéresis se refiere, en física, al retardo que presenta un cuerpo en reaccionar a fuerzas externas. Análogamente, se puede decir que las enzimas histeréticas, son aquellas que

presentan un retardo en cierta propiedad cinética, en respuesta a un cambio repentino en la concentración de las sustancias que influyen sobre esa propiedad. (Frieden, 1970). El fenómeno de histéresis en la actividad catalítica de una enzima, indica que esta está experimentando una transición lenta de un estado inactivo a un estado activo. (Kadirvelraj, 2013).

Una característica de las TGR de helmintos es la de desplegar una cinética histerética en concentraciones moderadas y altas de disulfuro de glutatión (GSSG), pero no de enzima (Guevara-Flores, 2010)

1.5 Inhibición enzimática.

Los estudios de inhibición catalítica son importantes para la caracterización de las enzimas ya que son uno de los mecanismos regulatorios más importantes en las reacciones enzimáticas; nos hablan de la especificidad y de la estabilidad de las enzimas y de las particularidades físicas y químicas de su sitio activo (Segel, 1993).

Existen tres sistemas de inhibición catalíticos simples: competitiva, acompetitiva y no competitiva.

1.5.1 Inhibición competitiva.

Este tipo de inhibición ocurre cuando el inhibidor y el sustrato compiten por un mismo sitio activo. Si esto ocurre, la relación entre la concentración de sustrato es inversamente proporcional a la inhibición, ya que el sustrato en mayor cantidad es capaz de desplazar al inhibidor del sitio activo. Otra característica de la inhibición competitiva es que el valor de la K_M aumenta mientras el de la $V_{m\acute{a}x}$ no se altera. Esto puede apreciarse con mayor detalle

en gráficas de doble recíprocas (Figura 6) confrontando a la enzima y al sustrato en presencia y ausencia de inhibidor. El resultado será la intersección de dos líneas sobre el eje de las ordenadas, evidenciando un cambio en el valor de la K_M . (Nava *et al.*, 2007).

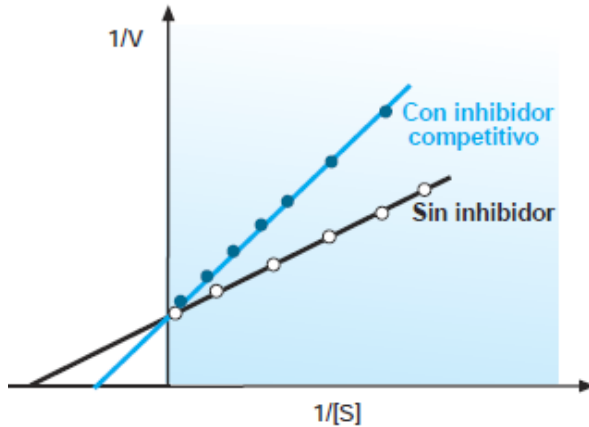


Figura 6. Gráfica de doble recíprocas con un tipo de inhibición competitiva. Tomado de Lozano *et al.* (2005).

1.5.2 Inhibición acompetitiva.

La inhibición acompetitiva ocurre cuando el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato para formar un complejo enzima-sustrato-inhibidor, cuyo resultado no será la transformación en el producto habitual de la reacción. En una gráfica doble recíproca con concentraciones constantes de enzima e inhibidor y variables de sustrato, se apreciará que la pendiente de las rectas no sufre alteración alguna, sin embargo la $V_{m\acute{a}x}$ decrece (Figura 7).

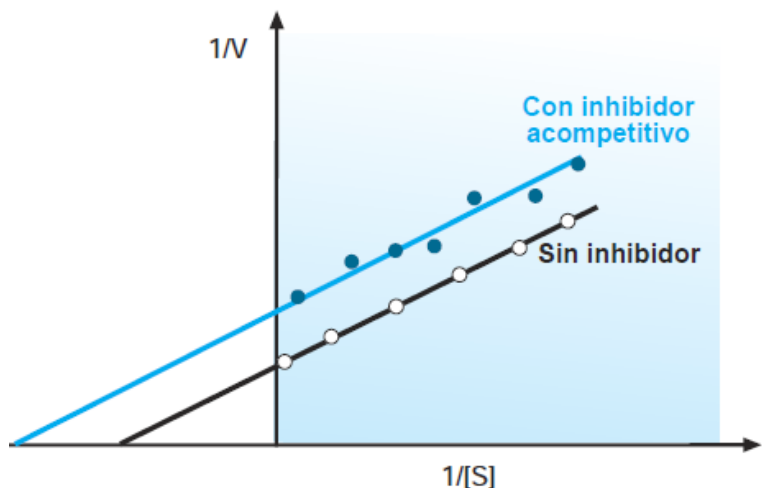


Figura 7. Gráfica de doble recíprocas con un tipo de inhibición acompetitiva. Tomado de Lozano *et al.* (2005).

1.5.3 Inhibición no competitiva.

La inhibición no competitiva se caracteriza por la unión del inhibidor a la enzima en un sitio distinto del sitio activo, distorsionando su conformación y afectando su velocidad. Este tipo de inhibición no se ve anulada al aumentar la concentración de sustrato, dado que no se compite por el mismo sitio activo. En una gráfica característica de inhibición no competitiva, las líneas respectivas a las diferentes concentraciones de inhibidor no tienen intersección sobre el eje $1/V_0$, pero sí en el eje $1/[S]$ (Figura 8). Se pueden ver variaciones tanto en K_M como en $V_{m\acute{a}x}$.

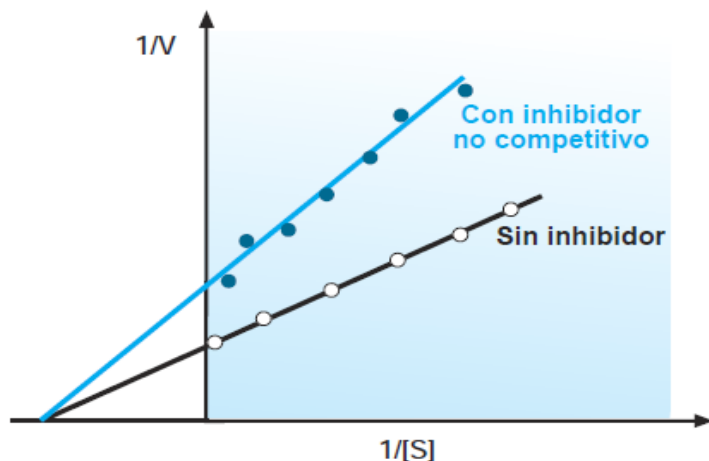


Figura 8: Gráfica característica de inhibición no competitiva. Tomado de Lozano *et al.* (2005).

2. Justificación.

En este estudio se analiza la actividad de los sistemas detoxificantes tiorredoxina y glutatión, como posibles responsables de la permanencia de los helmintos en el tracto gastrointestinal de sus huéspedes por períodos prolongados y a pesar de la respuesta inmune que inducen. Evaluar la eficiencia de estos sistemas nos permitirá dimensionar su importancia en la biología de estos parásitos, y podría facilitar el desarrollo de fármacos para contrarrestar dichos mecanismos de evasión de la respuesta inmune.

Adicionalmente, la identificación y el análisis del comportamiento catalítico de la TGR de *Moniezia expansa*, confirmará su existencia por vez primera en el estadio adulto de un cestodo, y permitirá asimismo describir su actividad y compararla con las descritas en otros organismos en estadios inmaduros.

Moniezia expansa, es un organismo cuya manipulación no representa un riesgo significativo para la salud humana, por lo que resulta un modelo muy útil para el desarrollo del presente trabajo.

3. Hipótesis.

En la fase adulta de *M. expansa* existe una tiorredoxina glutatión reductasa (TGRMe) funcional.

4. Objetivos.

Objetivo general:

Identificar, purificar y caracterizar bioquímica y cinéticamente a la tiorredoxina-glutatión reductasa de la forma adulta de *M. expansa*, para confirmar su presencia en un cestodo adulto y describir su comportamiento catalítico.

Objetivos particulares:

- Identificar por medio de sustratos específicos para las TGRs la actividad catalítica de la TGRMe en homogeneizados citoplásmicos de la forma adulta de este cestodo.
- Purificar por procedimientos bioquímicos a la forma nativa de la TGRMe de los tejidos del adulto de *M. expansa* para su caracterización bioquímica y cinética.

- Evaluar la pureza de la TGRMe y realizar ensayos catalíticos que revelen sus características fisicoquímicas.
- Analizar las principales constantes catalíticas de la TGRMe, utilizando modelos matemáticos, para describir cuantitativamente sus propiedades catalíticas.
- Evaluar el efecto del auranofín sobre la TGRMe, para observar los cambios en su actividad catalítica en presencia de una sustancia inhibitoria específica de las selenoproteínas.
- Demostrar la existencia del fenómeno de histéresis en la TGRMe por medio de su actividad de GR en diferentes condiciones experimentales, para comparar dicho fenómeno con el apreciado en otras TGRs ya descritas.

5. Material y métodos.

5.1 Colecta de los parásitos adultos de *M. expansa*.

Las formas adultas de *M. expansa* fueron obtenidas de intestinos de caprinos sacrificados en el rastro municipal de Ciudad Obregón, Son., México. Las cabras se infectaron de manera natural con las formas maduras del cisticercoide de *M. expansa*. Los parásitos extraídos del intestino de sus huéspedes fueron lavados exhaustivamente con solución salina fisiológica, y almacenados a -70 °C en tubos de plástico, hasta su uso.

5.2 Preparación del lisado celular con un inhibidor de proteasas.

La siguiente metodología se repitió en diversas ocasiones dependiendo del requerimiento de TGRMe purificada que se necesitó para su caracterización. (Plancarte, 2015)

5.2.1 Homogeneización de los tejidos de *M. expansa*.

Se empleó un procesador de tejidos Politron (Brinkman Ins.) para homogenizar 15 g de parásitos en 15 ml de solución amortiguadora de reacción: 50 mM imidazol-HCl (pH 6.5), 1 mM EDTA, 100 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF). (Plancarte, 2015)

5.2.2 Ultracentrifugación.

Para obtener las proteínas solubles o sobrenadante (S1), el homogenado proteico fue centrifugado a 105,000 g, durante 45 minutos a 15 °C, utilizando un rotor 50 Ti en una ultracentrífuga (Beckman). (Plancarte, 2015)

5.2.3 Filtración de la fracción S1.

El S1 se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa con un corte de 0.45 μ M (Amicon Milipore). (Plancarte, 2015)

5.3 Obtención de proteínas solubles y su separación cromatográfica en DEAE-sefarosa.

5.3.1 Equilibrio de la resina DEAE-Sefarosa.

Se hidrataron 50 ml de la resina dietil-amino-etil sefarosa (DEAE-Sefarosa) con el amortiguador de equilibrio: 50 mM imidazol-HCl, 1mM EDTA, (pH 6.5). La resina fue

colocada en una columna de vidrio de 40 cm de largo y diámetro de 2.8 cm (Pharmacia Biotech), se dejó sedimentar y posteriormente se equilibró pasando por ella 150 ml del amortiguador de equilibrio. (Plancarte, 2015)

5.3.2 Cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sefarosa).

Se filtraron ~15 ml del S1 por la columna de DEAE-Sefarosa con un flujo de 1 ml/min. De forma continua se siguió lavando la resina de las proteínas que no interaccionaron utilizando el amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones de 5 ml y se registró su absorbancia a 280 nm. A través del software LP Data View, se graficó en tiempo real la variación de absorbancia. (Plancarte, 2015)

5.3.3 Gradiente.

Al obtener valores de absorbancia a 280 nm de cero durante el proceso del lavado de la resina para eliminar las proteínas que no interactuaron con la misma, se adicionó al amortiguador un gradiente de NaCl (0 – 0.5 M). Esto permitió eluir a las proteínas parasitarias que interaccionaron con la resina. (Plancarte, 2015)

5.4 Diálisis de las fracciones eluidas de DEAE-Sefarosa.

Una vez que se identificaron por valores de absorbancia, y al observar su actividad durante el ensayo de actividad de tiorredoxina reductasa que se describe más adelante, las fracciones eluidas se dializaron durante 16 horas a 4°C en amortiguador: 0.1M Tris-HCl (pH 7.8), 1mM EDTA. (Plancarte, 2015)

5.5 Cromatografía de proteínas por afinidad en 2'5' ADP-Sefarosa

5.5.1 Equilibrio de resina 2'5'ADP-Sefarosa.

Se hidrataron 6 ml de resina 2'5' ADP-Sefarosa y se colocan en una columna de vidrio (0.9 cm x 8 cm) (Pharmacia Biotech). Se equilibró dejando pasar por ella tres volúmenes (18 ml) de amortiguador 0.1M Tris-HCl (pH 7.8), 1mM EDTA. (Plancarte, 2015)

5.5.2 Cromatografía de afinidad 2'5'ADP-Sefarosa.

La muestra eluida de la cromatografía DEAE-Sefarosa con actividad de reductasa se dializó en el amortiguador de equilibrio para la cromatografía de afinidad. Inmediatamente después la muestra mencionada se filtró por la 2'5'ADP-Sefarosa a un flujo de 0.5 ml/min y se colectaron fracciones de 1 ml. Se registraron los valores de absorbancia a 280 nm para conocer la ubicación de las proteínas en las distintas fracciones. En el momento del decremento de la absorbancia a valores de cero se cambió el amortiguador de equilibrio por un gradiente de NADPH (0 - 120 μ M) preparado en el mismo amortiguador. A las fracciones eluidas se les analizó su actividad de reductasa, aquellas con dicha actividad se concentraron y analizaron en geles de poliacrilamida. (Plancarte, 2015)

5.6 Concentración de fracciones eluidas de 2'5' ADP-Sefarosa.

Cada una de las fracciones eluidas en cada cromatografía se colectaron, permaneciendo juntas las correspondientes para cada cromatografía, y concentraron hasta un volumen de ~1ml, utilizando un sistema de filtración Amicon Milipore con presión negativa. (Plancarte, 2015)

5.7 Elaboración de geles de poliacrilamida (PAGE) para determinar la pureza de la TGRMe.

Se realizaron PAGE analíticos siguiendo la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970) para evaluar el proceso de purificación de la reductasa parasitaria.

Las muestras evaluadas fueron el S1, las fracciones con actividad de TR eluidas de la DEAE-Sefarosa y las eluidas de la 2'5'ADP-Sefarosa.

Para la realización de la electroforesis se concentraron 60 μL de la muestra eluida de la 2'5'ADP-Sefarosa hasta obtener un volumen de 25 μL y se le adicionaron 5 μL de coctel de corrida (5X), posteriormente se ingresó la muestra en un carril del gel. De forma similar se realizó con el S1 (10 μL) y la fracción concentrada y con actividad de TR eluida de la DEAE-Sefarosa (20 μL). Inmediatamente se suministra al sistema de electroforesis una corriente eléctrica (15 mA / 100 V) y se monitoreó el desplazamiento de las proteínas con el frente de corrida originado con azul de bromofenol.

Para determinar el peso molecular de la subunidad de la TGRMe y del resto de las proteínas de interés se empleó un control de pesos moleculares conocidos (Amersham Biosciences 17-0446-01) que permitió obtener el factor de movilidad relativa (Mr). Este parámetro indica la separación entre las proteínas según la movilidad de éstas en la electroforesis. Al ser conocido este factor en el control de pesos moleculares, se puede estimar el peso molecular de las bandas que forme las muestras de interés cuando se comparan con él. (Plancarte, 2015)

5.7.1 Tinción de los geles.

Una vez que se terminó la electroforesis, los geles fueron teñidos mediante dos técnicas:

Tinción con azul de Coomassie:

El gel fue sumergido en una solución de 1.25 gr de azul de Coomassie en 454 mL de metanol al 50% y 46 mL de ácido acético al 7%, durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron lavados en solución de ácido acético al 10% en agua destilada, hasta que permanezcan sólo las bandas color azul en un fondo transparente.

Tinción con nitrato de plata (Anexo 1)

- 1) Se colocó el gel en un recipiente con 50 ml de solución fijadora.
- 2) Permaneció en agitación lenta por 30 minutos (Cole-Parmer® Rocker Platform).
- 3) Se realizaron tres lavados con agua MQ (Simplicity®) de 5 minutos cada uno.
- 4) El agua se sustituyó por metanol al 50% en agua MQ y se dejó en agitación lenta 30 minutos.
- 5) Se hizo un lavado con agua MQ formaldehizada al 0.1% durante 20 minutos en agitación.
- 6) Se hicieron dos lavados con agua MQ de 20 minutos cada uno.
- 7) Se colocó el gel en solución teñidora y se agitó lentamente durante 15 a 20 minutos.
- 8) Se retiró la solución teñidora e hicieron tres lavados rápidos con agua MQ.
- 9) El gel permaneció en agua MQ en agitación por 15 minutos.

10) Se desechó el agua y se agregó solución reveladora al gel hasta obtener el bandeo deseado.

11) Una vez que se observaron las bandas en el gel se reemplazó la solución reveladora por solución de paro y se dejó 5 minutos en agitación.

12) Finalmente, se desechó la solución de paro y el gel permaneció en solución de conservación.

5.8 Espectrofotometría de masas en tándem (LC/ESI-MS/MS).

Diversas bandas proteicas correspondientes a la TGRMe y obtenidas en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Commassie se recortaron cuidadosamente usando una navaja de disección, y se enviaron a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM para llevar a cabo su secuenciación.

Los resultados obtenidos se analizaron en búsqueda de homologías proteicas por medio de la base de datos del NCBI-BLAST del PubMed-Protein.

5.9 Ensayos enzimáticos de la TGRMe.

Se realizaron ensayos de actividad de tiorredoxina reductasa (TR), glutatión reductasa (GR) y glutarredoxina (Grx) para demostrar la presencia y funcionalidad de los dominios TR, GR y Grx en la enzima del parásito, así como para apreciar el fenómeno de histéresis descrito en las TGRs conocidas. (Plancarte, 2015)

5.9.1 Ensayo de actividad de tiorredoxina reductasa.

En este ensayo, se observó la reducción del 5,5'-ditiobis (2- ácido nitrobenzoico) (DTNB), midiendo los cambios de absorbancia en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Biosciences) a 412 nm.

El procedimiento fue el siguiente:

Para un volumen de reacción de 0.5 ml se incubó 2 µg de enzima y 0.35 mM de DTNB por 3 minutos en amortiguador de ensayo formado de 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.1 mM EDTA. La reacción se inició al agregar 90 µM de NADPH y se siguió su desarrollo espectrofotométricamente tomando lecturas cada dos segundos a 412 nm. El análisis de estas lecturas es realizó por medio del software Origin Pro (Scientific Graphing and Analysis Software) de Origin® 7SR2 Origin Lab Corporation. (Plancarte, 2015)

5.9.2 Ensayo de la actividad de glutarredoxina.

Para este ensayo se utilizó 2-hidroexietil disulfuro (HED) (Sigma 380474), que es un disulfuro. Este es un ensayo acoplado en cuya primera parte de la reacción, el HED es reducido por el dominio Grx de la TGRMe que obtiene los reductores equivalentes del GSH transformándose este en GSSG. En la segunda parte, el GSSG es reducido por la glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH.

Los ensayos se realizaron al incubar en amortiguador de ensayo 0.7 mM de HED y 1 mM de GSH durante 2 minutos. Posteriormente se adicionan 90 µM de NADPH y 0.05 U de GR. La reacción se inició al agregar 30 µg de la TGRMe . Durante el desarrollo de la

reacción se observa un decremento en la absorbancia a 340 nm puesto que a esta longitud de onda se registra la oxidación del NADPH. (Plancarte, 2015)

5.9.3 Ensayo de actividad de glutatión reductasa.

Se realizaron diversos ensayos de la velocidad inicial de la actividad de GR de la TGRMe para obtener el desarrollo completo de la reacción (kinetic full-time courses), (Bates D, Frieden C. 1973). Para este fin se evaluaron al GSSG y diferentes concentraciones de la enzima parasitaria como reguladores del efecto histerético de la TGRMe. En relación al primero, se incubaron en tubos de ensayo diferentes concentraciones de GSSG (3 – 8 mM) con 150 µg de TGRMe más NADPH (100 µM) y se observó el desarrollo de la reacción espectrofotométricamente a 340 nm durante 1 – 3 h.

Para evaluar diversas concentraciones de la TGRMe (50, 100 y 150 µg) cada concentración se incubó con concentraciones constantes de NADPH (100 µM) y de GSSG (2 mM) y el registro de las reacciones se realizaron como se describió previamente. (Plancarte, 2015)

5.10 Evaluación de la actividad de la TGRMe en función del pH.

Para el análisis del comportamiento de la enzima en diferentes condiciones de pH, se realizaron ensayos de su actividad de TR con el sustrato DTNB (Cuadro 2).

Cuadro 2
AMORTIGUADORES CON DIFERENTES VALORES DE pH

Amortiguador	pH
50 mM citrato de sodio – 50 mM ácido cítrico	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0
50 mM de fosfato de sodio monobásico-dibásico	6.5, 7.0, 7.5, 8.0
50 mM Tris – HCL	8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0

5.11 Evaluación de la estabilidad de la TGRMe en función de temperatura.

Para evaluar la estabilidad de la TGRMe a diferentes temperaturas, se realizaron ensayos de la actividad de TR con DTNB como sustrato. Se incubaron 2 μ g de enzima en 0.46 ml de amortiguador de ensayo por 5 minutos en un baño de circulación de agua, aumentando la temperatura 5 °C sucesivamente para cada ensayo.

5.12 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de afinidad (K_M), velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), número de recambio (K_{cat}) y la constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M).

Para la obtención de las constantes cinéticas de reacción de la TGRMe, se realizaron dos grupos de ensayos de actividad de tiorredoxina reductasa. El primero variando la

concentración de DTNB y manteniendo constante la concentración de NADPH (90 μM). El segundo variando la concentración de NADPH y manteniendo constante la concentración de DTNB (35 μM) (Cuadro 3). En todos los ensayos se mantuvo constante una cantidad de 2 μg TGRMe.

Cuadro 3

CONCENTRACIONES DE SUSTRATOS (μM)

DTNB (NADPH 90 μM)	NADPH (DTNB 35 μM)
17.5	3
35	6
52.5	9
70	15
87.5	30
105	60
140	90
175	120
227	150
262	180
315	210
350	240
402.5	
437.5	

5.13 Estudios de inhibición enzimática de la TGRMe

5.13.1 Determinación de la I_{50} .

Para los estudios de inhibición se utilizó auranofín, ya que tiene la capacidad de unirse a la selenocisteína presente en su grupo carboxilo, a pesar de no ser un inhibidor natural para las TRs; siendo el mismo caso para las TGR. De este modo inhibe la transferencia de electrones al sustrato impidiendo su reducción, por lo que es útil como modelo de estudio del comportamiento de la TGRMe en presencia de inhibidores.

La determinación de la cantidad de auranofín necesaria para inhibir al 50% la actividad catalítica de la TGRMe, se realizó mediante ensayos de la actividad de TR utilizando concentraciones constantes de DTNB (0.35 mM) y NADPH (90 μ M), y una cantidad constante de enzima (2 μ g); e incrementando gradualmente la concentración de auranofín (1.28-32 nM) en cada uno de ellos.

5.13.2 Determinación del tipo de inhibición.

El tipo de inhibición se calculó por medio de gráficas de dobles recíprocas obtenidas de las reacciones de la actividad de TR de la TGRMe, confrontando concentraciones en aumento de DTNB contra dos diferentes concentraciones de auranofín.

En este estudio la cantidad de la enzima se mantuvo constante (2 μ g), el DTNB en el rango de concentración de 35-350 μ M y el auranofín en concentraciones de 10 nM y 20 nM. Un control del efecto no inhibitorio de este inhibidor fue su ausencia en ensayos similares. El desarrollo de la actividad de TR de la enzima de *M. expansa* se siguió

espectrofotométricamente a 412 nm. Los valores de absorbancia se analizaron con la ecuación de *Lineweaver-Burk*. (Leningher, 2013).

6. Resultados.

6.1 Purificación de la TGRMe.

6.1.1 Ultracentrifugación y filtrado del lisado celular de la fase adulta de *M. expansa*.

Tras centrifugar y filtrar el lisado celular de tejidos de la fase adulta de *M. expansa*, se obtuvieron 17 ml de sobrenadante (Sn) con una concentración de 13 mg/ml de proteína (Cuadro 4).

6.1.2 Cromatografía de intercambio iónico.

La figura 9 muestra las variaciones de absorbancia a 280 nm y de actividad del S1 a su paso por una resina DEAE-Sefarosa. Se pueden apreciar dos picos correspondientes a las fracciones 13-23 y 27-33, respectivamente. El primer pico constituye el excluido, que contiene las proteínas que no se unieron a la resina. El segundo pico constituye el eluido, que contiene las proteínas que se unieron a la resina y fueron arrastradas posteriormente por la acción del gradiente de NaCl. El volumen de eluido obtenido fue de 35 ml con una concentración de 1mg/ml.

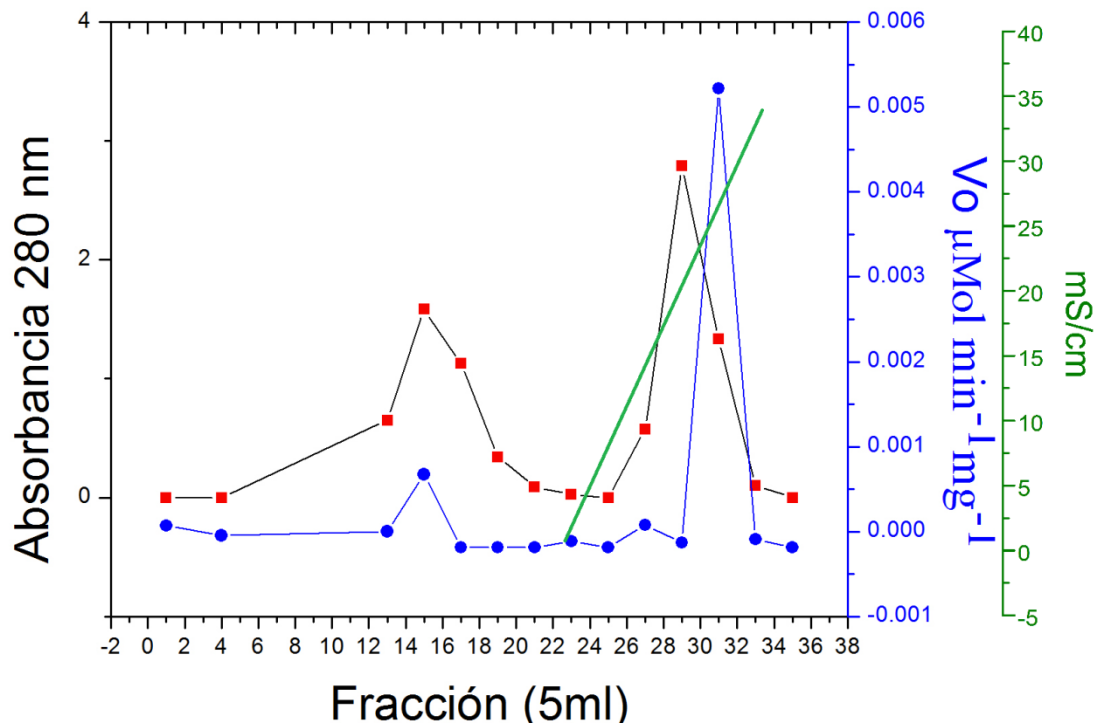


Figura 9. Cromatografía de la fracción S1 de *M. expansa* en la resina de DEAE-Sefarosa. La línea azul representa la actividad de TR en cada fracción de 5 ml, y la línea roja corresponde a la lectura de absorbancia a 280 nm. La línea verde indica el momento en que conecta el gradiente y el incremento en la conductividad a partir de este momento.

6.1.3 Cromatografía de afinidad.

La figura 10, muestra los cambios de absorbancia registrados al paso del eluido de la resina DEAE-Sefarosa por una columna 2'5'ADP-Sefarosa. Se aprecia la formación de un primer pico correspondiente a las fracciones 9 a 17, que contienen proteínas cuyas características no permiten la unión con el ligando de la resina. Cuando se registra absorbancia de cero después de este primer pico, se conecta el gradiente de NADPH, lo que lleva a la formación de un segundo pico conformado por las fracciones 25 a 45 que constituyen el eluido de la columna de afinidad y que contienen a las proteínas que se unieron al 2'5'ADP de la resina.

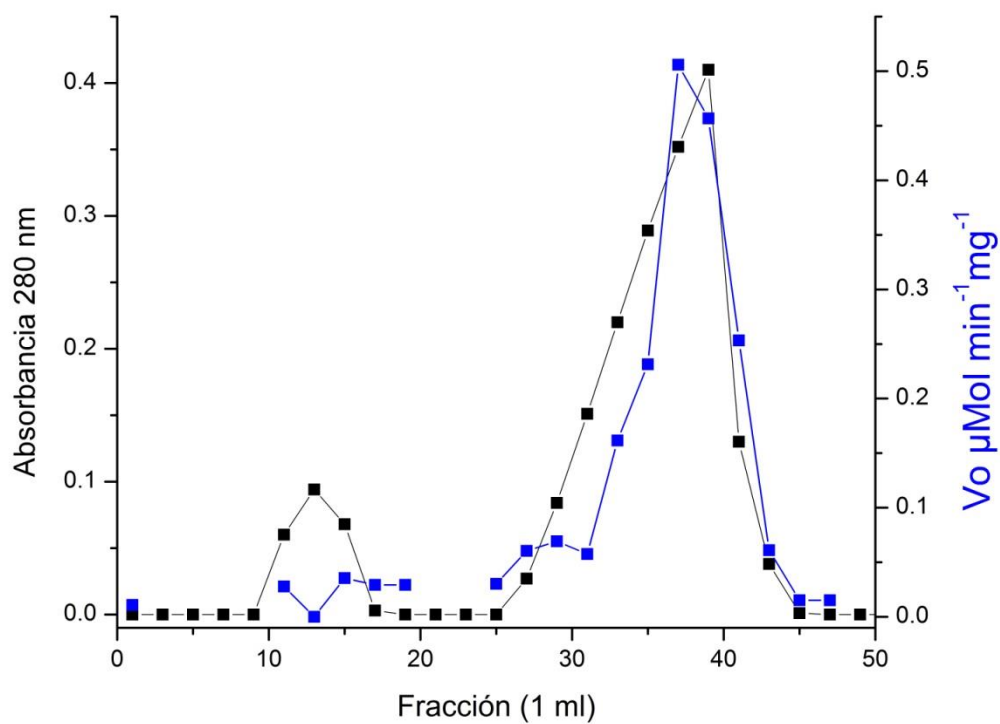


Figura 10. Cromatografía de afinidad del eluido de DEAE-sefarosa en resina 2'5' ADP-Sefarosa. La línea negra representa la medición de absorbancia a 280 nm, la línea azul corresponde a la actividad de TR de las diferentes fracciones de 1 ml colectadas.

6.1.4 Rendimiento a través de la purificación.

El Cuadro 4, registra el volumen, la cantidad de proteína y la actividad catalítica, además del rendimiento de la muestra a través de cada paso en la purificación de la TGRMe.

Cuadro 4
RESUMEN DE LA PURIFICACIÓN DE LA TGRMe

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (U)	Rendimiento %	Veces purificadas
Sn	17	221	0.225	51.55	100	1
DEAE	35	35	1.4	49	95	6
2'5'ADP	1.7	0.17	6.2	1.05	2.03	26

6.2 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida.

La figura 11, muestra dos geles de poliacrilamida-SDS utilizando dos técnicas para teñirlos. El gel "A", muestra las proteínas obtenidas a cada paso de la purificación utilizando la técnica de tinción con nitrato de plata. El gel "B" teñido con azul de Coomassie, muestra una banda bien definida que corresponde a la proteína obtenida del eluido de la resina 2'5'ADP-Sefarosa, y un marcador de peso molecular que permite estimar que el de la proteína es de 60 kDa.

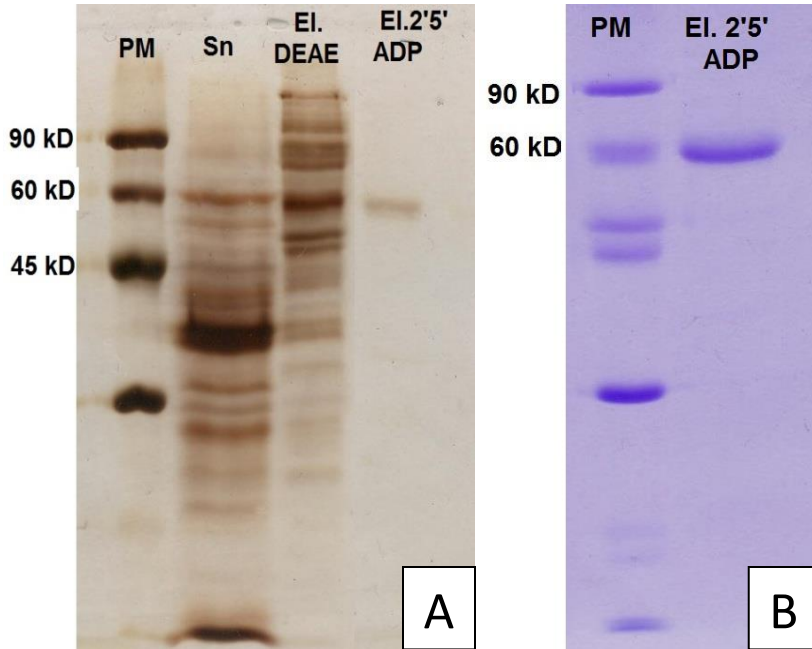


Figura 11. Análisis de la TGRMe en dos geles de poliacrilamida-SDS al 15%. Uno utilizando tinción de plata (A) y otro con azul de Coomassie (B). Marcador de peso molecular (PM), sobrenadante (Sn), eluido de DEAE sefarosa (El. DEAE), eluido de 2'5' ADP-Sefarosa (El. 2'5'ADP).

6.3 Estudio de péptidos.

En el estudio de espectrofotometría de masas del eluido de 2'5' ADP-Sefarosa, se logró identificar un péptido con la secuencia de aminoácidos: GFVDEFLR, con una identidad del 88% con una oxidoreductasa dependiente de flavín adenin dinucleótido (FAD) de *Mycobacterium sp.* Adicionalmente, se comparó este péptido con la secuencia de la TGR de *Taenia solium*, y se encontró un péptido similar:

<i>Taenia solium</i>	MAPIGGSA	EQV-EKLR	NKINNAAVLVFTKSFCPYCKKVMERFNNLKIPFGYLDLCLKKNGSDYQKM
<i>Mycobacterium sp.</i>		GFIDEFLR	
<i>Moniezia expansa</i>		GFVDEFLR	

6.4 Caracterización bioquímica.

6.4.1 Actividad catalítica de la TGRMe en función del pH.

En la Figura 12, se puede observar el comportamiento de la actividad de TR de la TGRMe sometida a variaciones de pH en el amortiguador de ensayo. Para lo anterior se utilizaron diferentes amortiguadores de reacción con valores de pH de 4 - 11. La actividad catalítica de la TGRMe se incrementó en forma directamente proporcional al valor del pH hasta alcanzar un máximo en el valor de 9. A mayor alcalinidad vemos que la actividad decae, desnaturalizándose la enzima a un pH 11.

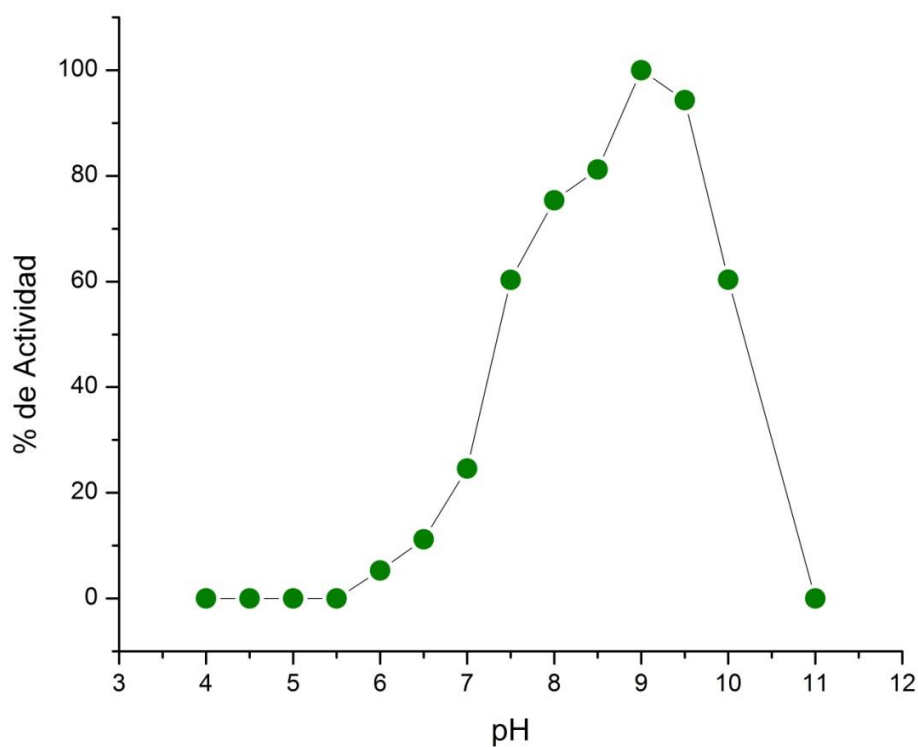


Figura 12. Variación en la actividad de la TGRMe sometida a diferentes valores de pH.

6.4.2 Estabilidad de la TGRMe en función de la temperatura.

En la figura 13, se muestra la estabilidad de la TGRMe en función de la temperatura. El primer punto corresponde a 5°C donde se observó un 13.5% de actividad de TR en relación al 100% correspondiente a la misma actividad observada a 30°C. Después de este punto, la enzima empieza a desnaturalizarse hasta su inactivación a 50°C.

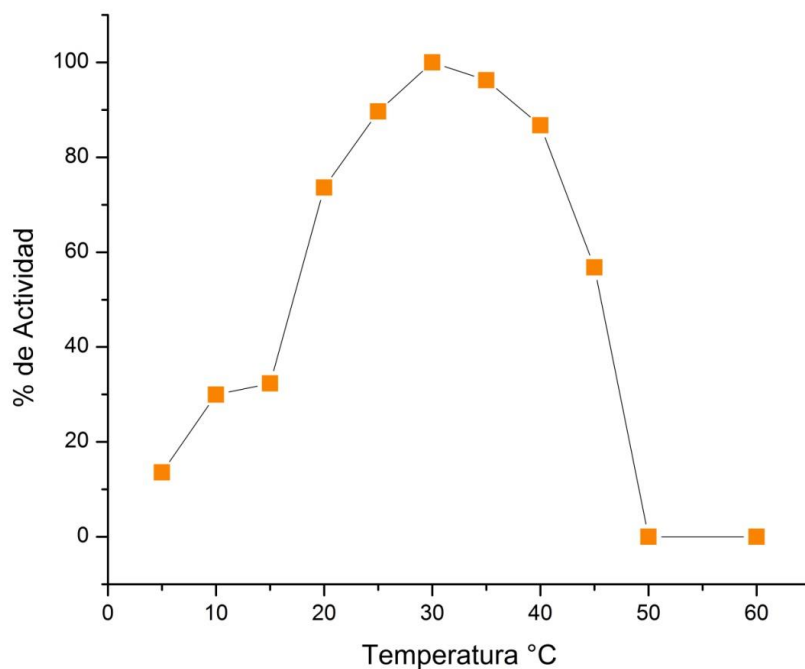


Figura 13. Variación en la actividad de la TGRMe ante variaciones de temperatura.

6.4.3 Determinación de las constantes cinéticas de reacción: Constante de Michaelis-Menten (K_M) y velocidad máxima de reacción (V_{max}), número de recambio (K_{cat}) y constante de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M).

Las figuras 14 y 15, muestran las gráficas de Michaelis-Menten, que expresan la actividad específica en función de diferentes concentraciones de sustrato. En la figura 14 se aprecia el comportamiento michaeliano ante variaciones de DTNB. El resultado fue una $V_{m\acute{a}x(DTNB)} = 12.8 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, y una $K_{M(DTNB)} = 54 \mu\text{M}$. La K_{cat} fue 14.07s^{-1} por lo que la eficiencia catalítica resultó ser $2.6 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La figura 15 muestra los valores obtenidos variando la concentración de NADPH, donde se obtuvieron una $V_{m\acute{a}x(NADPH)} = 10.8 \mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y una $K_{M(NADPH)} = 1.4 \mu\text{M}$; K_{cat} de 11.87s^{-1} y una eficiencia catalítica de $8.5 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

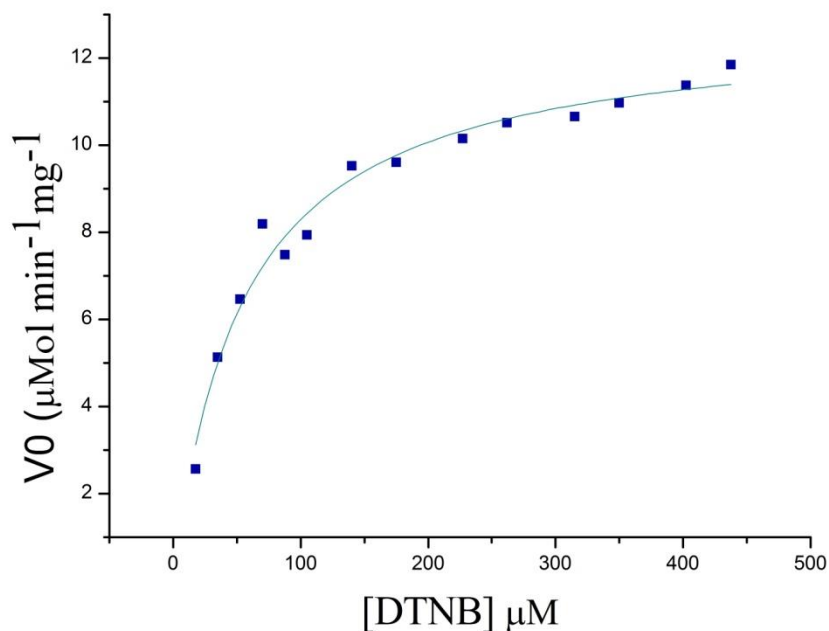


Figura 14. Actividad de la TGRMe en presencia de concentraciones ascendentes de DTNB.

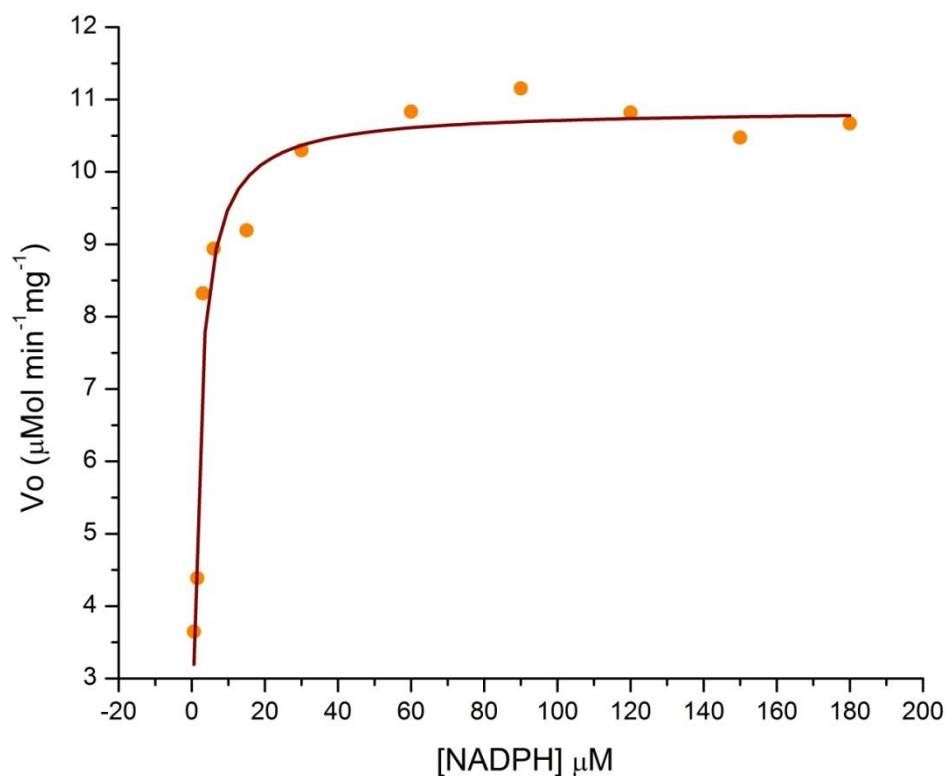


Figura 15. Actividad de la TGRMe en presencia de concentraciones ascendentes de NADPH.

6.4.4 Ensayo de la actividad de glutarredoxina.

Se midió la actividad de glutarredoxina ante variaciones en la concentración de HED (35-1050 μM) y se obtuvo una $V_{\text{máx}}$ de $201.85 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, y una K_M de $189.09 \mu\text{M}$. Una K_{cat} de 221.94 s^{-1} , y por ende una eficiencia catalítica de $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La figura 16 muestra la actividad de glutarredoxina ante variaciones en la concentración de HED.

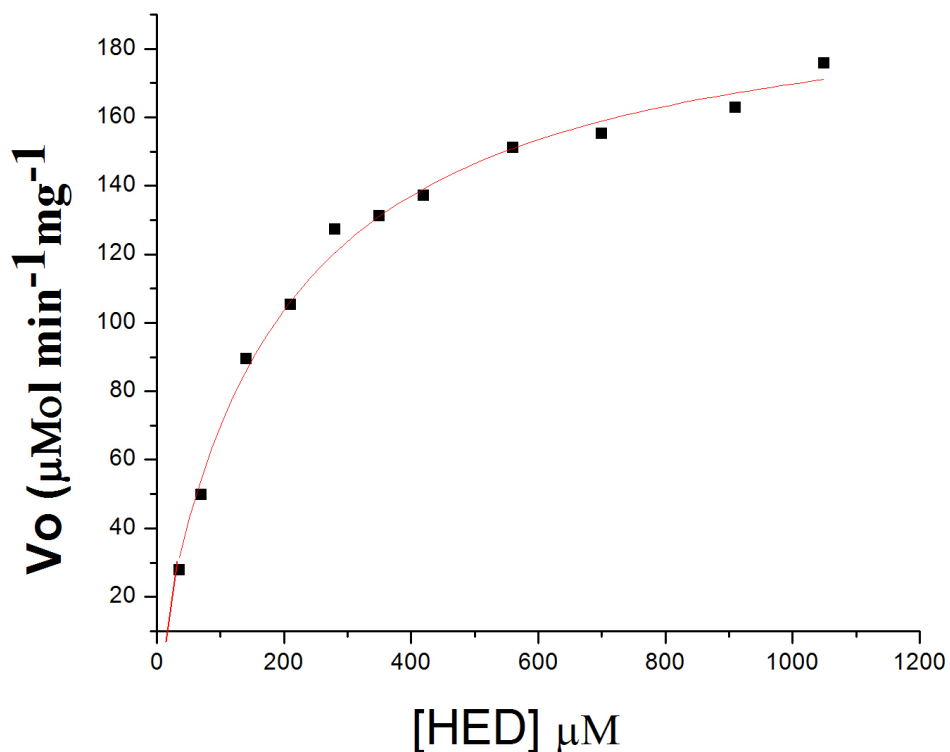


Figura 16: Actividad catalítica de la TGRMe ante concentraciones diferentes de HED.

Cuadro 5

ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y EFICIENCIA CATALÍTICA DE LA TGRMe CON DISTINTOS SUSTRATOS.

Actividad	Sustrato	K_M (μM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{M min}^{-1}\text{mg}^{-1}$)	Actividad específica (mU/mg)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
TR	DTNB	54	12.80	6.2	14.07	2.6×10^5
TR	NADPH	1.4	10.86	6.2	11.87	8.5×10^6
Grx	HED	189	201.85	128.20	221.9	1.2×10^6

6.5 Estudio de inhibición de la TGRMe.

6.5.1 Inhibición I₅₀.

La figura 17, corresponde a la gráfica de actividad residual de TR de la TGRMe al ser expuesta a diferentes concentraciones de auranofín, utilizando como sustrato 35 μM de DTNB. La enzima fue inhibida al 100% a una concentración de 160 nM, mientras el valor de I₅₀ corresponde a una concentración de 25.5 nM.

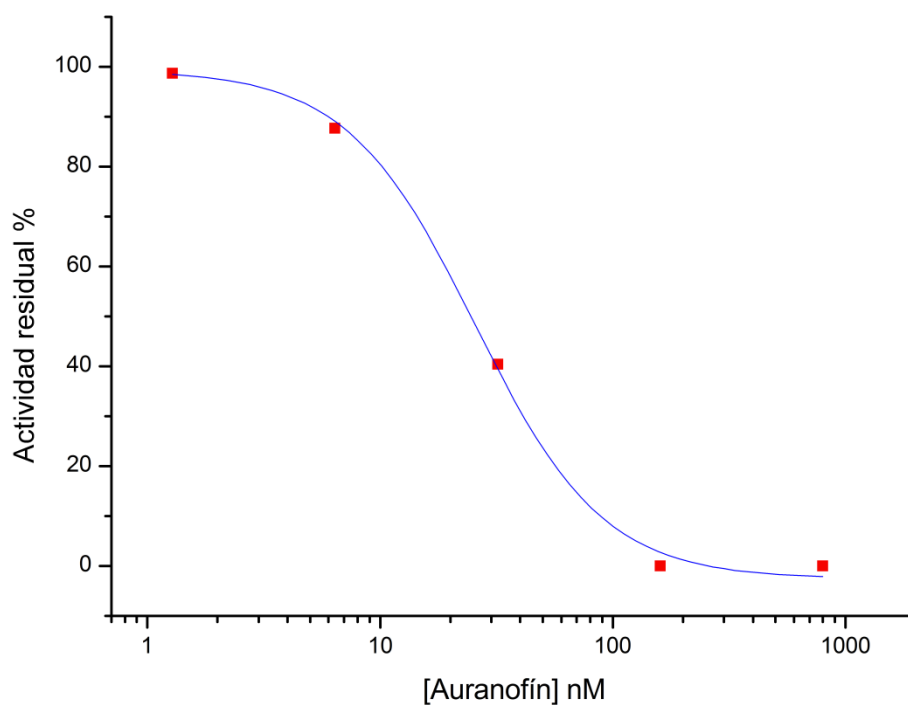


Figura 17: Porcentaje de actividad residual de la TGRMe en presencia de diferentes concentraciones de auranofín.

6.5.2 Tipo de inhibición de TGRMe.

La figura 18, contiene la gráfica obtenida mediante la ecuación de *Lineweaver-Burk* o doble recíproca, teniendo en el eje de las abscisas los valores recíprocos correspondientes a la concentración de DTNB, mientras el eje de las ordenadas corresponde a los valores recíprocos de la velocidad inicial de la TGRMe en presencia de dos concentraciones diferentes de auranofín (0.5 y 1 μM), y en ausencia de dicho inhibidor. Se observan tres líneas rectas que representan los valores para las tres condiciones mencionadas de $K_M/V_{\text{máx}}$, donde la intersección de cada línea sobre el eje $1/V_0$ es $1/V_{\text{máx}}$; y la intersección entre el eje $1/[\text{DTNB}]$ es $-1/K_M$. La gráfica obtenida sugiere un tipo de inhibición no competitiva, dado que no existe un punto de intersección entre las líneas para cada concentración de auranofín sobre el eje $1/V_0$.

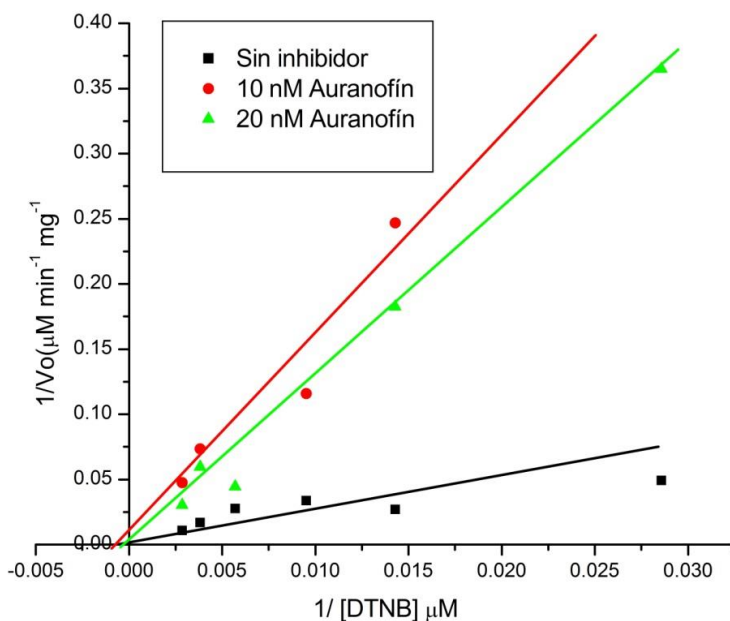


Figura 18: Gráfica de doble recíproca. Cada línea corresponde a una concentración diferente de auranofín.

6.6 Histéresis.

6.6.1 Ensayo de la actividad de GR de la TGRMe para obtener el desarrollo completo de la reacción (kinetic full-time courses) empleando diferentes concentraciones de la enzima parasitaria.

La figura 19, muestra el comportamiento de la TGRMe a diferentes concentraciones, en presencia de una cantidad constante de disulfuro de glutatión (2 mM).

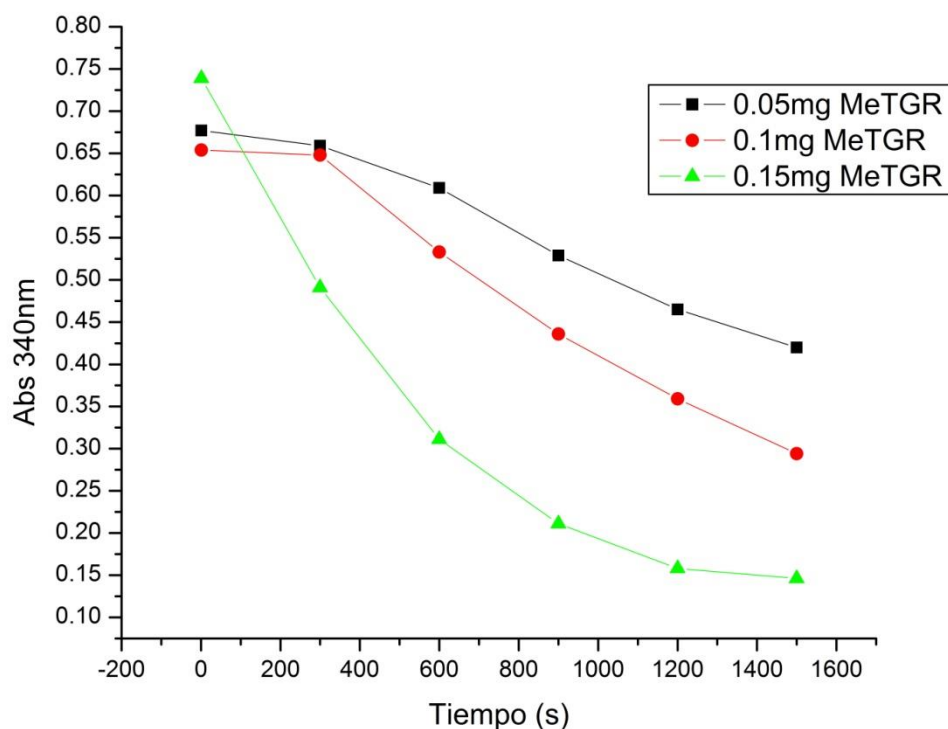


Figura 19: Ensayo de la actividad de glutatión reductasa. Se realizaron lecturas de absorbancia a 340 nm, empleando tres concentraciones diferentes de enzima en presencia cada una de 2 mM de disulfuro de glutatión (GSSG).

6.6.2 Ensayo de la actividad de GR de la TGRMe para obtener el desarrollo completo de la reacción (kinetic full-time courses) empleando diferentes concentraciones de GSSG.

La figura 20, presenta una gráfica donde se miden las variaciones de absorbancia a 340 nm, utilizando cuatro concentraciones distintas de (GSSG). En todos los casos se observa un período en el que los valores de absorbancia se mantienen relativamente constantes, seguido de una repentina caída en dichos valores. El período que precede a la caída de los valores de absorbancia, es más prolongado conforme mayor es la concentración de GSSG. Este rezago es la manifestación de la actividad de GR de la TGRMe y corresponde al fenómeno de histéresis.

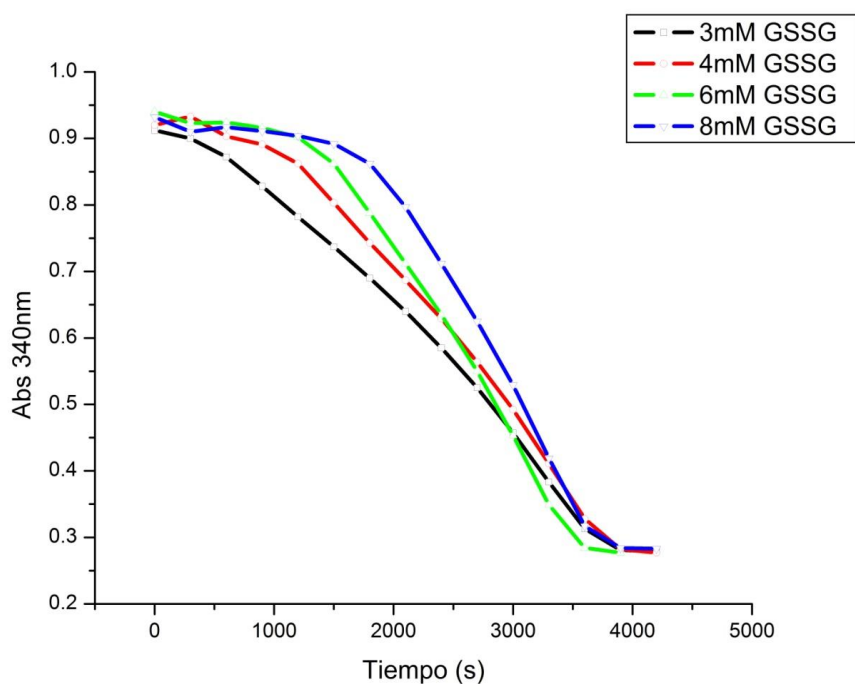


Figura 20: Comportamiento histérico observado en la TGRMe.

VII. Discusión.

Este trabajo permite ampliar la observación sobre la existencia de los sistemas tiorredoxina y glutatión en cestodos. Estos sistemas, juegan un papel central en la homeostasis redox tiol-disulfuro en las células, suministrando electrones a enzimas esenciales además de la defensa contra el estrés oxidativo.

Durante mucho tiempo estos sistemas fueron desconocidos en los helmintos, particularmente por no presentar en sus tejidos de manera independiente a las enzimas TR y GR. La primera es pilar en el sistema Trx junto con la Trx y el donador de equivalentes reductores NADPH. La segunda es fundamental en el sistema GSH en combinación con la GR, el NADPH, la Grx y la glutatión peroxidasa (Gpx). Es importante mencionar que tanto la Gpx como la catalasa también están ausentes en los cestodos, resaltando este hecho la importancia de los sistemas Trx y GSH en los sistemas antioxidantes relacionados con el H₂O₂ y peróxidos lipídicos.

A principios de este siglo (XXI) se mostraron las primeras evidencias sobre la caracterización en platelmintos de los sistemas Trx y GSH (Alger y Williams, 2002) Se descubrió que estos organismos evolucionaron hacia la creación de una proteína híbrida denominada tiorredoxina glutatión reductasa (TGR). Esta TGR presenta en su estructura primaria dominios de TR, GR y Grx, de tal forma que puede funcionar en ambos sistemas. Hasta el momento solo en las formas larvales de tres cestodos han sido purificadas y caracterizadas sus correspondientes TGRs (Agorio *et al.*, 2003)

Con el objetivo de identificar funcionalmente la existencia de una TGR en la forma adulta de *M. expansa* se desarrolló este trabajo. Para realizar tal objetivo se emplearon los

procedimientos de purificación de proteínas siguiendo los protocolos establecidos para enzimas similares (Rendón *et al.*, 2004.) (Plancarte y Nava, 2015).

Estos procedimientos incluyeron una cromatografía de intercambio aniónico y otra de afinidad para la co-enzima NADPH. Los resultados de la primera cromatografía mostraron que la TGRMe es una proteína aniónica debido a su capacidad de interactuar con la resina; la cromatografía de afinidad indicó que la enzima es dependiente del NADPH. La comparación de la secuencia de péptidos por espectroscopía de masas LC/MS/MS reveló que la TGRMe tuvo una alta identidad con las TGRs de *T. solium* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los datos obtenidos en las electroforesis de geles de poliacrilamida permitieron corroborar su naturaleza dimérica congruente con la de otras TGRs.

La actividad específica de TR y GR fue claramente mostrada por la TGRMe. Estas actividades fueron ligeramente menores a las correspondientes de *T. solium* así como a las actividades de las correspondientes enzimas de *E. granulosus* y testículos de ratón (Agorio *et al.*, 2003) (Sun *et al.*, 2001). De igual forma TGRMe fue menos activa para *T. crassiceps* (Rendón *et al.*, 2004) y diversos trematodos (Alger y Williams, 2002) (Song *et al.*, 2012)

La actividad de Grx desarrollada por la TGRMe fue tres veces menor que la encontrada en la cTsTGR y diez veces con la mTsTGR, sin embargo esta dentro del rango que presentan otros helmintos (Agorio *et al.*, 2003) (Alger y Williams, 2002) (Sun *et al.*, 2001). La actividad de Grx está asociada con la reducción del puente disulfuro de la ribonucleótido reductasa lo que le permite la síntesis de nuevos ácidos nucleicos (Holmgren y Aslund, 1995). También la actividad de Grx está involucrada en la defensa contra las M especies

reactivas de oxígeno (ERO) por medio del fenómeno de deglutinationilación (adicionar GSH a los tioles de las proteínas) (Graviana y Miyael, 1993).

Los valores obtenidos de K_M para la TGRMe con los sustratos DTNB y GSH relacionan indirectamente a las actividades catalíticas: a mayor actividad menor valor de K_M . De esta forma, la reductasa de *M. expansa*, a excepción de la isoforma mitocondrial para el DTNB, tiene la mayor afinidad tanto para el DTNB como para el NADPH en comparación con las isoformas citosólica y mitocondrial de TGR de *T. solium*.

Cuando la TGRMe se incubó en presencia de concentraciones nanomolares de auranofin sus actividades de Trx y GR fueron inhibidas. Estos resultados están de acuerdo con la capacidad de la AF para inhibir a miembros de la familia de enzimas que presentan el amino ácido selenocisteina en su sitio activo (Gly-Cys-SeCys-Gly) (Kuntz *et al.*, 2007). Adicionalmente, los valores inhibitorios de la TGRMe fueron menores a los obtenidos en ensayos similares por las dos isoformas de TsTGR, *T. crassiceps* y *S. mansoni* así como las selenocisteinas de mamíferos. Todas las enzimas mencionadas tienen o se sugiere que tienen un residuo de selenocisteina que juega un papel en su actividad catalítica. Esta observación es importante en *M. expansa* para explotarla como un sitio blanco a fármacos.

Al igual que todas las TGRs estudiadas hasta el momento, la TGRMe también mostró el fenómeno de histéresis (la aparición de un periodo de retardo (*lag*), durante los ensayos enzimáticos cuando se utiliza al GSSG como sustrato. Esto implica que el GSSG ejerce una fuerte inhibición: conforme mayor concentración de GSSG se utilizó en los ensayos una mayor actividad histerética se encontró. Adicionalmente, se observó una reversible actividad histerética en los ensayos con altas concentraciones de GSSG conforme se incrementaba la cantidad de enzima. Resultados semejantes se han encontrado en TGRs de *T. crassiceps* y *E. granulosus*. Las enzimas que muestran una conducta histerética pueden

ser clasificadas como enzimas regulatorias. Así, la TGRMe podría participar en el control de la homeostasis redox.

De esta forma la TGRMe presente en la forma adulta de este cestodo tiene un comportamiento cinético similar a las TGRs de las formas larvales. Esta última observación sugiere la versatilidad de las TGRs al enfrentarse a diferentes ambientes inflamatorios como son los tejidos vascularizados por un lado y los de las mucosas húmedas por el otro.

VIII. Referencias

Alger H.M. and Williams D.L. 2002. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. Mol. Biochem. Parasitol. 121, 129-139.

Agorio A, Chalar C, Cardoso S, Salinas G. 2003. Alternative mRNAs arising from *trans*-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase. J. Biol. Chem. 278, 12920-12928.

Arnér E, Zhong L, Holmgren A. 1999. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. Methods in Enzymology. 300: 226-239.

Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. 1997. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. J Biol Chem. 272: 30780-30786.

Bates D, Frieden C. 1973. Treatment of Enzyme Kinetic Data. III. The use of the full time course of a reaction, as examined by computer. J. of Biological Chemistry. 248: 7878-7884

Bartsch H, Nair J. 2005. Accumulation of lipid peroxidation-derived DNA lesions: potencial lead markers for chemoprevention of inflammation-driven malignancies. *Mutat Res.* 591: 34-44.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2005. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos. *Educ Química.*;12(2):164–73.

Comporti M. 1993. Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molec Aspects Med.* 14: 199-207

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A 2007. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 883–898.

Denegri GM. 1993) Review of oribatid mites as intermediate hosts of the Anoplocephalidae. *Experimental and Applied Acarology* 17: 567–580. doi: [10.1007/BF00053486](https://doi.org/10.1007/BF00053486)

Frieden C. 1970. Kinetic Aspects of Regulation of Metabolic Processes : The hysteretic enzyme concept. *The Journal of Biological Chemistry.* 245, 5788-5799

Guevara-Flores A, Del Arenal IP, Mendoza-Hernández G, Pardo JP, Flores-Herrera O, Rendón JL. Mitochondrial Thioredoxin-Glutathione Reductase from Larval *Taenia crassiceps* (Cysticerci). *J Parasitol Res* [Internet]. 2010. doi: 10.1155/2010/719856

Graviana SA, Miyael JJ. 1993. Thioltransferase is a specific glutathionyl mixed disulfide oxido reductase. *Biochemistry* 32: 3368-3376

Halliwell B, Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 57: 7155-7245.

Hardy P, Beauchamp M, Sennlaub F, Gobeil Jr,F, Tremblay L, Mwaikambo B, Lachpelle P, Chemtob S. 2005. New insights into the retinal circulation: inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 72: 301-325.

Herve M, Angeli V, Pinzar E, Wintjens R, Faveeuw Ch, Narumiya S, et al. 2003 Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur J immunol*. 33: 2764-2772.

Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. 2002. Thioredoxin Superfamily and Thioredoxin-Inducing Agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 957: 189–199

Holmgren A., Aslund F. 1995. Glutaredoxin. *Methods Enzymol*.252: 283-292

Jolman Vargas Jimmy. 2011. Gastroenteritis parasitarias en los animales domésticos. Colombia. *Biomédica*. 31:3-315.

Kadirvelraj R, Sennett NC, Custer GS, Phillips RS, Wood ZA. Hysteresis and negative cooperativity in human UDP-glucose dehydrogenase. 2013. *Biochemistry*. 52(8):1456–65.

Kuntz AN, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, et al. 2007 Correction: Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. *PLOS Medicine* 4(8): e264.<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040264>

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lozano J, Galindo J, García C, Martínez J, Peñafiel R, Solano M 2005. Bioquímica y Biología Molecular para ciencias de la salud tercera edición. Madrid España, MCGraw-Hill interamericana de España, (92 - 111)

Martin JL, 1995. Thioredoxin - a fold for all reasons. Structure 3: 245-250, Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. 2002. Thioredoxin Superfamily and Thioredoxin-Inducing Agents. Ann. N.Y. Acad. Sci. 957: 189–199

McGonigle S, Dalton JP, James ER 1998. Peroxidoxins: A New Antioxidant Family Parasitology Today 14: 139-145

Nava G, Robert L, Plancarte A. 2007. Characterization of *Taenia solium* cysticerci microsomal glutathione S-transferase activity. Parasitol Res, Volume 101, Issue 5, pp 1373-138

Nelson D., Cox M. 2009. Lehninger principios de bioquímica. Quinta edición. Barcelona España. Ediciones Omega S.A de C.V. pp. 189

Plancarte, A., Nava, G., 2015. Purification and kinetic analysis of cytosolic and mitochondrial thioredoxin glutathione reductase extracted from *Taenia solium* cysticerci. Exp. Par. 149, 65-73.

Quiróz Romero H. 2012. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, México, D.F.

Rendón, J. L., del Arrenal, P., 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.

Salinas G, Selkirk ME, Chalar C, Maizels RM, Fernández C. Linked thioredoxin-glutathione systems in platyhelminths. *Trends Parasitol.* 2004;20(7):340–6.

Salinas G. 2010. Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. *Mensaje Bioquímico.* XXXIV:121–33.

Segel I, 1976. *Biochemical calculations.* Jhon Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 441.

Sevanian A, McLeod M. *Free Radical Toxicology.* Primera edición. Washington DC, EE.UU. Taylor&Francis. 1997. pp. 47-70.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360: 1-16

Song L, Li J, Xie S, Qian C, Wang J, Zhang W. 2012. Thioredoxin glutathione reductase as a novel drug target: evidence from *Schistosoma japonicum*. *PlosOne* 7, e31456).

Sun Q, Kirnarsky L, Gladyshev VN. 2001. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 3673-3678

Tribble DL, Aw TY, Jones DP. 1987. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. *Hepatology.* 7: 377-386

Warren JS, Wrad PA, Johnson KJ. 1989. in *Handbook of Inflammation* Vol. 6, Henson, P. M. and Murphy, R. C., eds, Elsevier Science Publishers. pp. 159-176

Williams DL, Bonilla M, Gladyshev VN, Salinas G. Thioredoxin Glutathione Reductase-Dependent Redox Networks in Platyhelminth Parasites. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013;19(7):735–45

Xolalpa,W., Vallecillo, A.J., Lara, M., Mendoza-Hernandez, G., Comini, M., Spallek, R., Singh, M., Espitia, C., 2007. Identification of novel bacterial plasminogen binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7, 3332e3341

Anexo

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA TINCIÓN DE PLATA.

Solución	Reactivo	Volumen
Solución fijadora	Etanol	40 mL
	Ácido acético	10mL
	Agua MQ aforar a	10mL
Metanol 50%	Metanol	50 mL
	Agua MQ	50mL
Agua MQ formaldehizada	Formaldehído	100 µL
	Agua MQ	100mL
Solución teñidora	Hidróxido de sodio al 5.29%	1mL
	Hidróxido de amonio	1mL
	Nitrato de plata	400 µL
	Agua MQ aforar a	100mL
Solución reveladora	Stock de citratos (0.26g de citrato de Na dihidratado en 10mL de H ₂ O MQ)	100 µL
	Formaldehído	25 µL
Solución de paro	Metanol	112.5mL
	Ácido acético glacial	25mL
	Agua MQ aforar a	250mL
Solución de conservación	Glicerol al 87% (13.05mL de glicerol en 1.95mL de H ₂ O MQ)	11.5mL
	Etanol	75mL
	Ácido acético	250mL